



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cristiane Oliveira Curci Cesar

ZEARALENONA EM LEITE MATERNO
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE LACTENTES, EM ANGOLA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar
orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena
e coorientada pela Doutora Liliana J. G. Silva, apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Janeiro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cristiane Oliveira Curci Cesar

ZEARALENONA EM LEITE MATERNO

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE LACTENTES, EM ANGOLA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e coorientada pela Doutora Liliana J. G. Silva, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Janeiro de 2021

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo dom da vida e por me proporcionar saúde para prosseguir.

Ao Alessandro, meu esposo, companheiro em mais este desafio e ao nosso alicerce: toda a família.

Ao meu filho Davi, pela força transmitida em seu sorriso e à pequena Elise, que trouxe mais amor às nossas vidas e participou desta investigação, ainda, no meu ventre e no acalento do meu colo.

Ao meu Pai, que partiu sem vivenciar esta minha conquista.

À minha Mãe, por todo esforço, carinho e dedicação para minha vida e aos meus irmãos , simplesmente, por existirem.

Aos Doutores, Mestres e colegas do Mestrado, pelo compartilhamento do SABER.

À Professora Doutora Angelina Pena, pelo ensinamento transmitido durante todo o Mestrado, por despertar em mim o desejo de investigar em biomonitorização e por aceitar ser a minha orientadora.

À coorientadora Doutora Liliana Silva, pela clareza de seus ensinamentos e paciência ao longo de toda a investigação.

Ao Doutor André Pereira, sempre disposto a auxiliar no Laboratório e pela realização dos testes estatísticos.

À Escola Universitária Vasco da Gama pela colaboração no imunoensaio.

À Marta Gimbi, pela recolha das amostras.

Às amigas Lucy , Ana Azul, Brenda e aos amigos que nos aguardam no Brasil.

À amiga Marta Carvalho e família, por todo carinho.

E, especialmente, a elas que além da amizade, dividiram conhecimento, motivação e companhia: Ana Rita Seco, Vanessa Vidal e Myrella.

Finalmente, à Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra e Portugal: **Muito Obrigada!**

RESUMO

As micotoxinas, metabolitos fúngicos secundários, são consideradas ameaças à saúde humana. Quando as micotoxinas, entre as quais a zearalenona (ZEA), são ingeridas pela lactante, após absorção, podem ser transferidas do sangue para o leite materno. A ZEA é produzida por várias espécies do género *Fusarium*, sendo a principal espécie produtora o *F. graminearum*. Globalmente, a ZEA é mais prevalente em cereais, sobretudo no milho. No entanto, podem estar presentes, também, em produtos de origem animal devido ao chamado *carry-over*. Esta micotoxina é um agonista dos receptores de estrogénios, sendo, portanto, um xenoestrógeno. Em crianças, os principais efeitos da exposição à ZEA são o hiperestrogenismo, a telarca e a puberdade precoce.

No presente estudo, foi avaliada a ocorrência de ZEA em leite materno de 37 lactantes da província de Cabinda, em Angola, e posterior avaliação da exposição à ZEA dos lactentes. A quantificação de ZEA foi realizada através do ensaio imunoenzimático *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

A totalidade das amostras tiveram incidência de ZEA, com concentrações entre 72,5 e 1487,4 ng/L, com média de $380,7 \pm 256,7$ ng/L. Para a avaliação do risco, a ingestão diária estimada (EDI) dos lactentes foi calculada e verificou-se que 5,5% desta população apresentou um potencial risco devido a ingestão de ZEA acima da ingestão diária tolerável (TDI). A idade materna, o número de filhos e a idade dos bebés não apresentaram correlação com os teores de ZEA no leite humano. No entanto, as concentrações de ZEA foram associadas à frequência do consumo de bolachas pelas lactantes ($p=0,0003$).

Apesar da exposição referida nesta investigação, o leite materno continua sendo o alimento ideal, mais completo e seguro nos primeiros seis meses de vida e até, no mínimo, os dois anos de idade. A substituição por fórmulas infantis e alimentos à base de cereais pode proporcionar maior exposição à ZEA.

Palavras-chave: Zearalenona, aleitamento materno, exposição, ELISA.

ABSTRACT

Mycotoxins, secondary fungal metabolites, are considered threats to human health. When mycotoxins, among which zearalenone (ZEA), are ingested by breastfeeding mother, after absorption, can be transferred from the blood to breast milk. ZEA is produced by several fungi *Fusarium*, but the main species is *F. graminearum*. Globally, cereals are the main foods contaminated with ZEA, especially corn. This mycotoxin is an estrogen receptor agonist and, therefore, it's a xenoestrogen. In children, the main effects of exposure to ZEA are hyperestrogenism, telarche and precocious puberty. However, they can also be present in products of animal origin due to carry-over.

In the present study, the occurrence of ZEA in the breast milk of 37 lactating mothers in the province of Cabinda, in Angola, and subsequent assessment of the exposure to ZEA of infants was evaluated. The quantification of ZEA was performed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

ZEA occurred in all samples, at levels oscillating between 72.5 – 1487.4 ng/L and average of 380.7 ± 256.7 ng/L. For the risk assessment, the Estimated Daily Intake (EDI) of babies was calculated and 5,5% of the sample has a potential risk due to ingestion of ZEA above the Tolerable Daily Dose (TDI). Maternal age, number of children and baby age did not correlate with ZEA levels in human milk. However, ZEA concentrations were associated with the frequency of consumption of cookies by mothers ($p=0.0003$).

Despite the exposure, breast milk remains the ideal, most complete and safe food for the first six months of life and up to, at least, two years of age. Substituting infant formula and cereal-based foods may provide greater exposure to ZEA.

Keywords: Zearalenone, breastfeeding, exposure, ELISA.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix

PARTE A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO	9
2. MICOTOXINAS E A ZEARELENONA	11
3. ZEARELENONA	
3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	12
3.2 TOXICOCINÉTICA	14
3.3 TOXICIDADE	16
3.3.1 Toxicidade aguda.....	17
3.3.2 Toxicidade crónica.....	17
3.4 EXPOSIÇÃO ALIMENTAR	19
3.5 REGULAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ALIMENTAR HUMANA.....	23
3.6 SUSCETIBILIDADE INFANTIL ÀS MICOTOXINAS E À ZEARELENONA.....	26
3.7 BIOMONITORIZAÇÃO	27
3.7.1 Biomonitorização da zearalenona no leite materno.....	30

PARTE B - EXPERIMENTAL

1. JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS.....	35
2. METODOLOGIA.....	37
2.1 AMOSTRAGEM.....	37
2.1.1 Dados sociodemográficos, antropométricos e alimentares	37
2.2 MATERIAIS E MÉTODO ANALÍTICO.....	38
2.3 ANÁLISE DOS DADOS	39
2.4 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO À ZEARELENONA	
2.4.1 Avaliação do risco dos lactentes	39

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES	
3.1.1 Dados Antropométricos, características individuais das lactantes e dos lactentes ...	41
3.1.2 Dados sociodemográficos das lactantes.....	41
3.2 INCIDÊNCIA E OCORRÊNCIA DE ZEA	43
3.2.1 Comparação com outros estudos.....	46
3.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS LACTENTES	47
4. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
LISTA DE REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	
Anexo I.....	67
Anexo II.....	69
Anexo III.....	75
Anexo IV.....	79
Anexo V.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da zearalenona	13
Figura 2. Toxicocinética da zearalenona	16
Figura 3. Número de filhos	42
Figura 4. Escolaridade	42
Figura 5. Profissão	42
Figura 6. Tipo de aleitamento em crianças de até 6 meses de idade.....	43
Figura 7. Taxa de aleitamento materno exclusivo em <6 meses, em Angola	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características químicas da zearalenona e metabolitos	14
Tabela 2. Zearalenona em fórmulas infantis, alimentos para bebês e crianças	22
Tabela 3. Teores de zearalenona no milho em diversos países	23
Tabela 4. Limite máximo tolerável de zearalenona em alimentos na UE	25
Tabela 5. Zearalenona e metabolitos na urina humana	29
Tabela 6. Estudos de ocorrência de zearalenona em leite materno.....	32
Tabela 7. Características individuais das lactantes e dos lactentes	41
Tabela 8. Incidência e concentrações de zearalenona no leite materno.....	44
Tabela 9. Concentrações de zearalenona por faixas etárias das lactantes	44
Tabela 10. Concentrações de zearalenona e número de filhos das lactantes	45
Tabela 11. Concentrações de zearalenona por faixas etárias dos lactentes	45
Tabela 12. Concentrações de zearalenona e peso dos lactentes	45
Tabela 13. Estimativa de Ingestão Diária (EDI) de ZEA pelos lactentes	48
Tabela 14. Estimativa de Ingestão Diária (EDI) de ZEA pelos lactentes de até 111 dias	48
Tabela 15. Quociente de risco (EDI/TDI ajustada para lactentes).....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AME: Aleitamento materno exclusivo

AMM: Aleitamento materno misto

CE: Comissão Europeia

Células MCF-7: linhas celulares de cancro de mama com receptores de estrogénio

Células PALM: linhas celulares sensíveis a andrógenos

EDCs: Compostos disruptores endócrinos

EDI: Estimativa de Ingestão Diária

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EUVG: Escola Universitária Vasco da Gama

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FDA: Food and Drug Administration

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

hAR: receptor de androgénio

HBM: Biomonitorização humana

hER α : receptor de estrogénio α

HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho

HRMS: Espectrometria de massa de alta resolução

HSD: Hidroxil esteróide desidrogenase

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional de Pesquisa em Cancro)

IDH: Índice de Desenvolvimento humano

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IIMS: Inquérito de Indicadores Múltiplos e de Saúde

IMC: Índice de Massa Corporal

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares)

LC/FD: Cromatografia líquida com detecção por Fluorescência

LC/MS-MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem

LM: Leite materno

MLs: limites máximos tolerados

MW: Mass Weight (Peso molecular)

n: número de amostras ou de participantes da investigação científica

OMS: Organização Mundial da Saúde

OTA: Ocratoxina A

pc: peso corporal

PNUD: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento

QR: Quociente de Risco

Ref: Referências

TDI: Tolerable daily intake (Ingestão Diária Tolerável)

UE: União Europeia

UNICEF: Fundo das Nações Unidas para a Infância

UV: ultravioleta

WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

ZEA: Zearalenona

α -ZAL: α -zearalanol

α -ZEL: α -zearalenol

β -ZAL: β -zearalanol

β -ZEL: β -zearalenol

PARTE A – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. INTRODUÇÃO

O Leite Materno é o alimento ideal, completo e mais adequado para promover o crescimento e desenvolvimento desde o nascimento até os primeiros seis meses de vida (WHO, 2001; Warth *et al.*, 2016; WHO, 2020). Até esta idade, a ingestão do leite humano provê a energia, proteína e demais nutrientes necessários ao lactente (WHO, 2002; Degen *et al.*, 2017; Butts *et al.*, 2018). Portanto, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a recomendação global de Saúde Pública é a de que os bebês sejam amamentados exclusivamente até o sexto mês de vida (WHO, 2001; WHO, 2020). Após este período, devem receber alimentos nutricionalmente adequados e seguros enquanto o aleitamento materno continua por até os 2 anos de idade ou mais (WHO, 2001; WHO, 2020; Lassi *et al.*, 2020).

O aleitamento materno é , também , a estratégia - de vínculo, afeto, proteção, e nutrição - mais sensível, económica e eficaz de intervenção permitindo a promoção da saúde integral materno-infantil. O ato de amamentar, devido à interação entre a mãe e o filho, repercute de forma positiva na condição imunológica, fisiológica, no desenvolvimento cognitivo e comportamental da criança (Innis, 2014; Lassi *et al.*, 2020). Há inúmeros outros benefícios, destacando-se a redução de infeções gastrointestinais, doenças respiratórias e , portanto, da mortalidade infantil (Ministério da Saúde, 2019; Lassi *et al.*, 2020); reduz a chance de obesidade, dislipidemia, hipertensão, diabetes e há possível efeito positivo na inteligência (WHO, 2007). Dentre as vantagens para a lactante, destacam-se: proteção contra o cancro de mama, ovário e útero; redução do risco de desenvolver diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares, obesidade e depressão pós-parto. E, por fim, reduz os custos financeiros e gera melhor qualidade de vida (Ministério da Saúde, 2015).

O aleitamento materno exclusivo é possível, exceto em poucas condições clínicas. Os bebês que não recebem aleitamento materno devem ser alimentados com substitutos adequados, por exemplo, uma fórmula infantil preparada de acordo com os padrões do *Codex Alimentarius*. Estas crianças que não são amamentadas devem receber especial atenção do sistema social e de saúde pois constituem um grupo de risco (WHO, 2001).

Além da composição em macronutrientes - hidratos de carbono, proteínas e ácidos gordos - e de micronutrientes - vitaminas e minerais, o leite humano possui fatores imunológicos que protegem a criança contra infeções (Lassi *et al.*, 2020). A IgA é o principal anticorpo, atuando contra microrganismos presentes nas superfícies mucosas. Estes anticorpos no leite humano são um reflexo dos antígenos entéricos e respiratórios da mãe,

ou seja, ela produz anticorpos contra agentes infecciosos com os quais já teve contato, proporcionando, dessa maneira, proteção à criança contra os microrganismos prevalentes no meio em que a mãe vive. Ademais, o leite materno contém outros fatores de proteção, como anticorpos IgM e IgG, macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T, lactoferrina, lisosima e fator bífido (Ministério da Saúde, 2019).

Apesar de todos benefícios e das recomendações gerais do aleitamento materno, o leite humano pode conter contaminantes devido aos possíveis químicos presentes na dieta materna. As micotoxinas são de específico interesse devido à sua distribuição ubíqua como contaminantes em alimentos e seus perfis toxicológicos (Degen *et al.*, 2017). Portanto, apesar do leite materno ser considerado o melhor e ideal forma de nutrição, as micotoxinas ingeridas pela mãe, após serem absorvidas, podem ser transferidas do sangue para o leite. No entanto, os benefícios de saúde do aleitamento materno provavelmente superam em muito o risco de saúde de níveis modestos de transferência, especialmente em regiões mundiais altamente regulamentadas (Warth *et al.*, 2016).

Embora os limites dessas toxinas na alimentação infantil sejam muito restritivos e controlados por programas de vigilância, o leite materno raramente é avaliado. A avaliação precisa de toxinas ou tóxicos no leite materno é complexa (Renfrew *et al.*, 2008). Alguns estudos relatam dados sobre níveis e frequência de contaminação, mas não fornecem detalhes suficientes relacionados à precisão da colheita e, principalmente, da metodologia analítica. Isso pode gerar uma preocupação, principalmente se dados imprecisos desencorajarem a amamentação de crianças. Ressalta-se que são necessárias ferramentas precisas para entender melhor padrões, níveis e frequência de contaminação (Warth *et al.*, 2016).

2. MICOTOXINAS E A ZEARELENONA

O termo "micotoxina" é uma combinação do grego "mykes", fungo, e do latim "toxicum", que significa veneno. É geralmente reservado para os produtos químicos tóxicos relativamente pequenos (MW ~ 700 daltons). As micotoxinas, são, portanto, produtos do metabolismo secundário dos fungos que colonizam uma variedade de alimentos desde o campo, durante o cultivo ou após a colheita. São consideradas ameaças à saúde humana e animal através da ingestão de produtos alimentares preparados a partir dessas matérias-primas. Embora existam 300 a 400 micotoxinas, as mais estudadas em relação à saúde humana são as aflatoxinas, as fumonisinas, a ocratoxina A, o desoxinivalenol e a zearalenona (ZEA) (Lombard, 2014).

Uma variedade de fungos do Género *Fusarium*, comuns no solo, produz inúmeras micotoxinas da classe dos tricotecenos, como o nivalenol, e outras como as fumonisinas e a ZEA. Estes fungos são, provavelmente, os mais prevalentes fungos micotoxigênicos encontrados em cereais cultivados em regiões temperadas da América, Europa e Ásia. As espécies de *Fusarium* são encontrados em plantas, por exemplo, o milho e inúmeros outros grãos, que crescem em temperaturas de zonas de clima temperado (Rogowska et al., 2019).

A ZEA é, portanto, uma micotoxina produzida por várias espécies de *Fusarium*, nomeadamente, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. esquiseti*, *F. crookwellense*, *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. Oxysporum*, *F. Moniliforme*, *F. cerealis* e *F. semitectum* (Hagler et al., 2001; Agag, 2004; Maragos, 2010 ; Chilaka et al., 2017; James e Zikankuba, 2018; Rogowska et al., 2019), sendo o *F. graminearum* o maior produtor (Rupollo et al., 2006). Na literatura científica é abreviada como ZEA, ZON (EFSA, 2011) ou ZEN (Agag , 2004; Mally, Solfrizzo, Degen, 2016; Mousavi Khaneghah et al. , 2018; Lorenz et al., 2019).

A ocorrência natural de ZEA é favorecida pela alta humidade pois *F. graminearum* requer um mínimo de 22-25% de humidade para crescer nos grãos de cereais. As temperaturas entre 12°C a 14°C são necessárias para a formação significativa de ZEA, mas também ocorre a temperaturas abaixo de 10°C e até abaixo de congelamento. Altas quantidades de ZEA normalmente acumulam em grãos de cereais que não foram suficientemente secos durante a colheita ou nos grãos que foram estocados molhados (por exemplo, teor de humidade do milho >22%) (Agag, 2004). No laboratório, foram produzidos em temperaturas entre 5 e 30°C (ótimo: 21,7°C), mas amadureceram apenas a 20 e 25°C (Manstretta e Rossi, 2015). Além disso, produção de ZEA foi reportada em grãos no campo,

durante colheita, processamento comercial do grão e/ou subsequentemente, durante a estocagem de qualquer alimento contendo o grão (Agag, 2004).

3. ZEARALENONA

3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A ZEA é uma micotoxina estrogénica não-esteroidal, com a estrutura semelhante ao 17- β -estradiol, portanto, pertence aos xenoestrógenos (Warth *et al.*, 2019; Rogowska *et al.*, 2019).

A estrutura da ZEA foi primeiramente determinada por Urry *et al.* (1966). O nome, *Zearalenone* em inglês, é derivado parcialmente do nome genérico da planta hospedeira infectada por *Fusarium* (**Zea**) e outra parte da sua estrutura química - **ral**: *resorcylic acid lactone*; **en**: dupla ligação entre C1-C2 e **one**: *ketone* (Urry *et al.*, 1966; Agag, 2004).

A sua nomenclatura química é: lactona do ácido 6 - (10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil) - β -resorcílico (Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016; Al Jaal *et al.*, 2019), com fórmula empírica $C_{18}H_{22}O_5$, e possui um peso molecular de 318,4 g/mol (FDA, 1979; Agag, 2004). Sua estrutura, que se apresenta na **Figura 1**, sugere que ela seja sintetizada pela via do acetato-polimalonato, resultando na condensação de unidades de acetato produzida pelo *Fusarium* (Rupollo *et al.*, 2006). A ZEA contém uma cadeia insaturada no C1-C2 e uma função cetona no C6. Tanto a dupla cadeia ou a cetona, ou ambas, podem reduzir como séries de congéneres e esteroisómeros. As reduções são importantes pois elas afetam a atividade biológica, bem como as propriedades físicas da molécula. Redução também é importante porque representa um mecanismo no qual organismos biotransformam ZEA (Maragos, 2010).

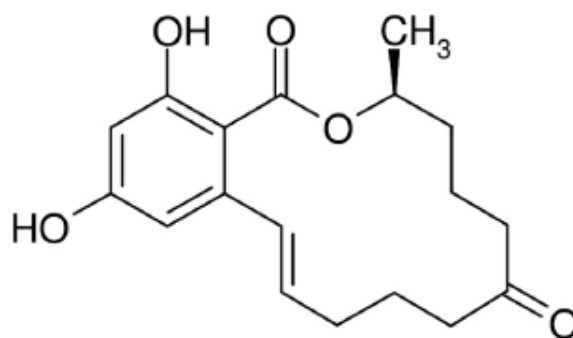


Figura 1. Estrutura da zearalenona (URRY *et al.*, 1966; ROGOWSKA *et al.*, 2019).

A ZEA e alguns de seus derivados fluorescem verde-azulado quando expostos à radiação UV (360nm) e verde mais intensa quando irradiados a 260nm (Agag, 2004; Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016). Esta propriedade pode ser usada como teste confirmatório conveniente e simples para ZEA em cromatografia em camada fina (Agag, 2004).

A ZEA é um composto fracamente polar, de baixo peso molecular e em forma de cristais brancos. O seu ponto de fusão é 164–165°C. A ZEA é solúvel em acetona, acetonitrila, benzeno, cloreto de metila, álcoois, éteres e solução aquosa alcalina (JECFA, 2001; Rai, Das e Tripathi, 2020). Na **Tabela I** pode-se observar as principais características químicas da ZEA e de seus principais metabolitos. Durante o armazenamento/moagem e o processamento/cocção do alimento, a ZEA apresenta estabilidade, não se degradando a altas temperaturas (Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016; Rogowska *et al.*, 2019), nem é destruída pelo processo de pasteurização. No entanto, sofre degradação sob a influência de radiação UV e em um ambiente alcalino (Rogowska *et al.*, 2019).

Tabela I. Características químicas da zearalenona e metabolitos

Composto	Fórmula molecular	Massa molar g/mol	Solubilidade em água (25° C) (g/L)
ZEA	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318,4	0,12
ZEA-14-GlcA	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	494,5	-
α -ZEL	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	320,4	0,15
β -ZEL	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	320,4	0,15
ZAN	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	320,4	0,00253
ZAN-14-GlcA	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₁	496,5	-
α -ZAL	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	322,4	0,16
β -ZAL	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	322,4	0,16

Adaptado de ARCE-LÓPEZ *et al.* (2020).

3.2 TOXICOCINÉTICA

Estudos de administração de ZEA em suínos demonstrou que seus metabolitos podem principalmente ser detectados na urina e fezes, entre 24 e 48h depois da administração (Al-Jaal *et al.*, 2019). A absorção em suínos após dose oral única de 10mg/kg peso corporal foi estimada em 80–85% (Biehl *et al.*, 1993; Rogowska *et al.*, 2019). A ZEA é distribuída a vários tecidos incluindo os rins, fígado, tecido adiposo, útero e folículos do ovário ou testículos (Biehl *et al.*, 1993; Mally, Solfrizzo, Degen, 2016).

Após a ingestão e absorção, a ZEA é absorvida no trato gastrointestinal pelos enterócitos e hepatócitos. É metabolizada principalmente nos hepatócitos (Zinedine *et al.*, 2007; Rogowska *et al.*, 2019), em duas vias principais de biotransformação conhecidas em animais, como se pode observar na **Figura 2**.

A primeira é a redução enzimática da ZEA em dois estereoisômeros: α -zearalenol (α -ZEL), pela 3 α -hidroxil esteróide desidrogenase (HSD), e β -zearalenol (β -ZEL), pela 3- β -HSD (Njumbe Ediage *et al.*, 2012). Também foi sugerido que os metabolitos, α -ZEL e β -ZEL, podem estar presentes na bile e na urina como produtos do metabolismo de ZEA que são provavelmente convertidos pela mucosa intestinal (Metzler, Pfeiffer e Hildebrand, 2010).

A segunda via de biotransformação envolve a conjugação de ZEA e seus metabolitos – mecanismo de detoxificação hepática (Pfeiffer *et al.*, 2011; Njumbe Ediage *et al.*, 2012;

Lorenz *et al.*, 2019). Normalmente, a glucuronidação, conjugação com ácido glucurônico, ocorre no grupo fenólico 14-hidroxila estericamente livre (Frizzell *et al.*, 2011; Frizzell *et al.*, 2015) pela enzima UGT - glucuronosiltransferase. Os metabolitos da ZEA podem ser conjugados com ácido sulfônico pela enzima SULT - sulfotransferase (Mally, Solfrizzo, Degen, 2016).

Os metabolitos conjugados seguem por extensiva excreção biliar e recirculação entero-hepática e, finalmente, eliminados, principalmente, pela via urinária (Molina-Molina *et al.*, 2014; Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016). A taxa de excreção de ZEA urinária é por volta de 9% e aparece principalmente na forma de glucuronídeo (Warth *et al.*, 2013 ; Rogowska *et al.*, 2019).

Uma outra, menos importante, via metabólica é a oxidação de ZEA pela citocromo P450 que produz composto alifático C6/C8 ZEA hidroxilada e aromático C13/C15 ZEA hidroxilada (Pfeiffer *et al.*, 2009; Mally, Solfrizzo, Degen, 2016).

Sumarizando, após a ingestão, a ZEA é rapidamente degradada, principalmente, em α -ZEL e β -ZEL, que sofrem redução adicional para α -zearalanol (α -ZAL) e β -zearalanol (β -ZAL). A α -ZAL é metabolizada em seu isômero β -ZAL e, em menor grau, em zearalanona (ZAN). Esses metabolitos são parcialmente conjugados com ácido sulfônico ou glucurônico e excretados na urina (Li *et al.*, 2018).

Em humanos, encontram-se ZEA, na sua forma livre e os seguintes metabolitos: α -ZEL e β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL e ZEA14GlcA (Mally, Solfrizzo, Degen, 2016; Al-Jaal *et al.*, 2019). Ressalta-se que, até o momento não há dados sobre a toxicocinética das formas modificadas de ZEA em humanos (Lorenz *et al.*, 2019).

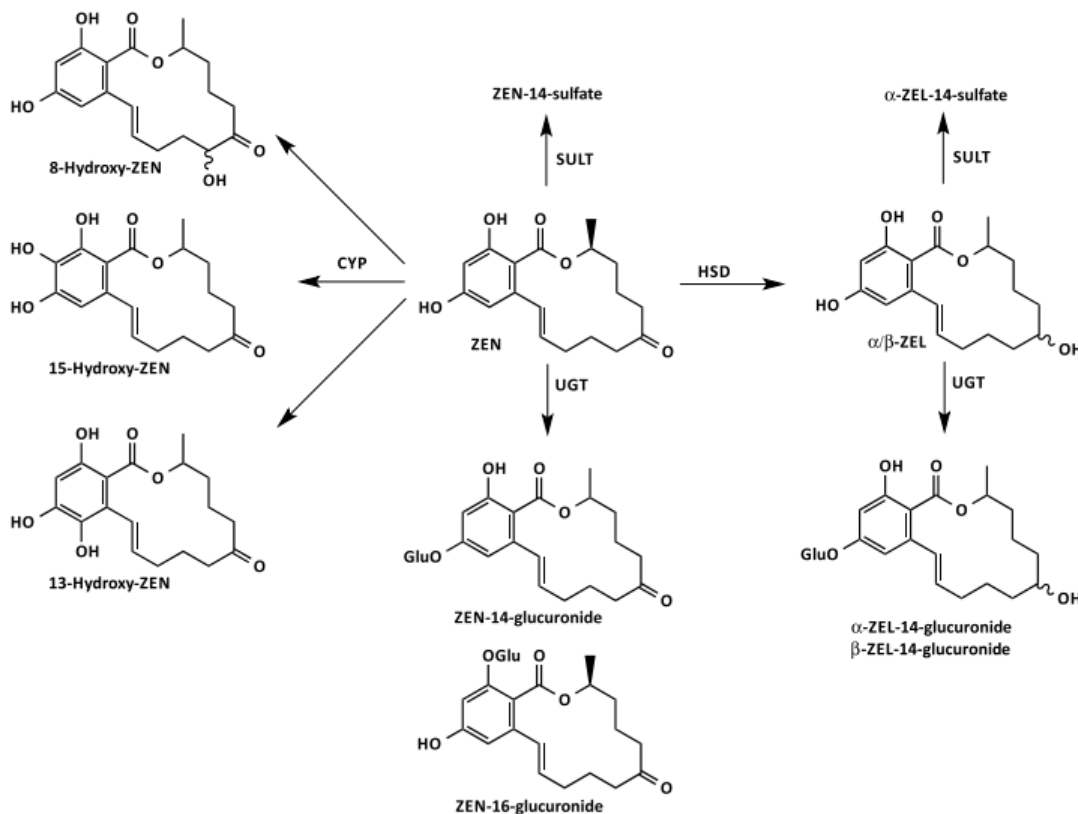


Figura 2. Toxicocinética da zearalenona (MALLY, SOLFRIZZO, DEGEN, 2016).

3.3 TOXICIDADE

Devido à estrutura química da ZEA ser semelhante à do 17- β -estradiol, principal hormona produzida pelos ovários, a ZEA pode se ligar aos receptores de estrogénio ocasionando distúrbio no balanço hormonal e levando a inúmeras doenças do sistema reprodutor (Bennett e Klich, 2003; Massart e Saggese, 2010; Frizzell *et al.*, 2015; Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016; Rogowska *et al.*, 2019; Braun *et al.*, 2020).

Molina-Molina *et al.* (2014) investigaram as interações de ZEA e seus metabolitos com outros receptores nucleares - o receptor estrogénico α (hER α) e o receptor androgénico (hAR). O efeito na função do hER α e hAR foi examinado em células MCF-7 e PALM, respectivamente. Os compostos testados demonstram efeito anti-androgénico e estrogénico, portanto, podem ser disruptores endócrinos (Rogowska *et al.*, 2019). O potencial estrogénico dos metabolitos formados pela biotransformação de ZEA é diferente. A forma α possui uma afinidade muito mais elevada pelos receptores de estrogénio, sendo muito mais tóxica que a própria ZEA, enquanto a forma β tem afinidade mais baixa por estes receptores e é praticamente inofensiva (Rogowska *et al.*, 2019).

3.3.1 Toxicidade Aguda

ZEA apresenta baixa toxicidade aguda (oral LD50 de mais de 2000mg por kg de peso corporal) após administração oral e peritoneal em camundongos, ratos e porcos (FAO/WHO, 2001; EFSA, 2011). Não há relatos de envenenamento agudo devido à ZEA em humanos (IARC, 2012). Portanto, o termo "toxina" no caso da ZEA pode ser enganoso, embora tenha forte efeito biológico, não é venenoso, apresentando baixa toxicidade aguda (Rogowska *et al.*, 2019).

3.3.2 Toxicidade Crônica

A ZEA foi avaliada pela primeira vez pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC), em 1993. A exposição à ZEA resultou em aumento da incidência de tumores hepatocelulares e pituitário em camundongos, consistente com um modo de ação carcinogénico hormonal. Nenhum efeito carcinogénico foi observado em ratos, portanto, com limitada evidência em animais experimentais. A ZEA foi alocada, juntamente com outras toxinas de *Fusarium*, no grupo 3, sendo classificada como não carcinogénica para humanos (IARC, 1993), classificação esta que perdura até a atualidade (IARC, 2012; Ostry *et al.*, 2017; Claeys *et al.*, 2020).

Claeys *et al.* (2020), em revisão sistemática, analisaram dois estudos de caso-controle em África que investigaram a associação entre ZEA e seus metabolitos, nomeadamente, α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL e ZAN com o risco de cancro de mama. Não foram encontrados resultados sugestivos de uma relação causal entre a presença de ZEA no sangue e o cancro na população estudada. No entanto, o potencial da ZEA para induzir a proliferação de células de cancro da mama humano foi demonstrado *in vitro* (Belhassen *et al.*, 2015).

Em relação à imunotoxicidade, a ZEA exerce efeitos imunotóxicos em modelos *in vitro*. Esses efeitos consistem na inibição da proliferação de linfócitos do sangue periférico humano e aumento da produção de interleucina em linfócitos T cultivados. Em células mononucleares de sangue periférico humano e neutrófilos suínos, a proliferação celular e a produção de citocinas foram inibidas. Em alguns desses estudos, a ZEA pareceu ser menos imunotóxica do que seus metabolitos α - e β -ZEL (EFSA, 2011).

Os efeitos adversos da ZEA como xenoestrógeno foram reportados em humanos (EFSA, 2011; Rogowska *et al.*, 2019). Mauro *et al.* (2018) avaliaram 48 mulheres obesas ou com sobrepeso. Os resultados mostraram que a ZEA e seus metabolitos estavam presentes

em quase todas mulheres pesquisadas e a concentração foi dependente da ingestão de carne bem como do Índice de Massa Corporal (IMC). A exposição natural à ZEA por meio do consumo de alimentos contaminados tem sido reconhecida como sendo a causa de mudanças nos órgãos reprodutivos de mulheres tais como o desenvolvimento de cancro do colo do útero (Hueza *et al.*, 2014). O α -ZEL é 3-4 vezes mais estrogénico que ZEA (Azcona, Abouzied e Pestka, 1990; Huang *et al.*, 2014).

Em crianças, os principais efeitos dos compostos ZEA são observados, também, no sistema reprodutivo, onde afetam a estrutura e função dos órgãos, levando ao hiperestrogenismo, telarca e puberdade precoce (Zinedine *et al.*, 2007; Massart e Saggese, 2010; Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016). A ZEA foi investigada em amostras sanguíneas de meninas para avaliar o início precoce da puberdade, na Hungria (Szuets *et al.*, 1997) e na Itália (Massart *et al.*, 2008). Na Itália, níveis séricos elevados de ZEA e α -ZEL foram associados com puberdade precoce em 35% das meninas oriundas de uma área rural. No entanto, nenhuma amostra positiva foi encontrada em quinze participantes oriundas de uma área urbana (Massart *et al.*, 2008; IARC, 2012).

ZEA e seus metabolitos, ZAN, α -ZAL, β -ZAL, α -ZEL e β -ZEL, são prejudiciais à saúde e são considerados como compostos disruptores endócrinos (EDCs), que podem alterar o processo mediado por receptor de esteróides imitando ou neutralizando hormonas naturais (Välimaa *et al.*, 2010; Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016). A incubação com ZEA, α -ZEL e β -ZEL induziu a produção de progesterona, estradiol, testosterona e cortisol em uma linha celular H295R, indicando que não apenas ZEA, mas também seus metabolitos podem atuar como disruptores endócrinos (Frizzell *et al.*, 2015; Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016). Este efeito disruptor endócrino também pode ser um fator causal na carcinogénese (Kowalska, Habrowska-Górczyńska e Piastowska-Ciesielska, 2016).

Há outros efeitos intracelulares causados pela ZEA, além de disrupção endócrina, podendo, também, induzir dano oxidativo, dano ao DNA, apoptose, necrose e finalmente morte celular (Zheng *et al.*, 2018; Rivera-Núñez *et al.*, 2019; Rai, Das e Tripathi, 2020).

Cao *et al.* (2019) reportaram que a ZEA exibe forte toxicidade embriogénica e induz apoptose e stress oxidativo em células-tronco embrionárias humanas (Cao *et al.*, 2019; Rogowska *et al.*, 2019).

Portanto, apesar da ZEA e seus metabolitos apresentam baixa toxicidade aguda, são considerados perigos potenciais para a saúde humana, especialmente quando absorvidos em

grandes quantidades ou durante um longo tempo de exposição (Zinedine *et al.*, 2007; Raiola *et al.*, 2015).

3.4 EXPOSIÇÃO ALIMENTAR

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estima que até 25% das culturas cerealíferas alimentares do mundo estejam contaminadas com metabolitos de fungos toxigênicos (FAO, 2004; Duarte, Lino e Pena, 2010).

A exposição alimentar às micotoxinas pode ser maior em países em desenvolvimento devido ao ambiente favorável ao crescimento de fungos, dependência da agricultura de subsistência, pobre qualidade do monitoramento e da aplicação dos regulamentos nos mercados locais (Ortiz *et al.*, 2018).

A ZEA é uma das principais micotoxinas que ocorrem em produtos agrícolas e seus níveis em alimentos são constantemente inspecionados em todo o mundo (Solfrizzo, Gambacorta e Visconti, 2014). É a micotoxina de *Fusarium* mais distribuída globalmente (Beukes *et al.*, 2017; James e Zikankuba, 2018), muito encontrada em milho e culturas de grãos tais como o cevada, aveia, trigo, arroz, sorgo e painço (Ismaiel e Papenbrock, 2015; Al-Jaal *et al.*, 2019). A ZEA foi encontrada produzida em milho contaminado por *Fusarium* nos continentes da Austrália, Europa e Norte América, bem como Nova Zelândia, Sudeste da Ásia, América do Sul e África. Fungos do género *Fusarium* isolados de bananas também se mostraram hábeis em produzir ZEA (European Commission, 2000).

Ortiz *et al.* (2018) investigaram a exposição dietética à ZEA em crianças de 0-23 meses de idade, no Equador, provenientes da zona rural e da urbana. No geral, a exposição foi modesta, mas maior para crianças da área rural devido à dieta monótona à base de cereais. Em particular, isso foi evidenciado como aumento da exposição durante a transição de alimentação até o desmame.

A ingestão de ZEA pode ocorrer, também, pelo consumo de alimentos de origem animal, como ovos, leite e carne que foram derivados de animais expostos à ZEA - é o denominado “carry-over” (Belhassen *et al.*, 2015; Välimaa *et al.*, 2010). A concentração média de ZEA no leite bovino foi estimada em 0,125µg /L (Signorini *et al.*, 2012).

Mousavi Khaneghah *et al.* (2018) realizaram uma meta-análise para estimar a prevalência e a concentração de multimicotoxinas, dentre elas, ZEA em pães, flocos de milho, cereais matinais e produtos à base de massas. A prevalência de ZEA nos alimentos à

base de cereais foi de 37%, nas massas, cereais, pão, biscoitos e cereais matinais foi de 17%, 55%, 41%, 22%, e 37%, respectivamente. A ordem de classificação de alimentos à base de cereais pela prevalência de ZEA foi flocos de milho (55%)> pão (41%)> cereais matinais (37%)> biscoito (22%)> pasta (17%).

Em Portugal, a ZEA foi detectada em 48% das amostras de cereais matinais, cereais infantis e biscoitos consumidos por crianças na região de Lisboa (Assunção *et al.*, 2018). Outros estudos de ocorrência de ZEA em fórmulas infantis, alimentos para bebés e crianças constam na **Tabela 2**.

Aldana *et al.* (2014) investigaram a contaminação de ZEA em farinhas comercializadas em Portugal (Coimbra) e Países Baixos (Utrecht). Quarenta e oito amostras foram analisadas dentre farinha de trigo (17), farinha de milho (12), farinha mista com predominância do trigo (13) e farinha destinada à alimentação de bebés (6). Na farinha de trigo, 31,6% continha ZEA com concentrações que variaram entre 7,4 e 15,3µg/kg. Relativamente à farinha de milho, 50% apresentava ZEA numa concentração que variava entre 5,9 – 111,7µg/kg. Por fim, 35,2% da farinha mista apresentava ZEA em concentrações que variavam entre 5,4 e 39,4µg/kg. Portanto, a maior incidência, e as concentrações máxima e média mais elevadas ocorreram na farinha de milho. Em relação às farinhas para uso na dieta de bebés, metade estava contaminada com ZEA. Outro estudo, também realizado em Portugal, analisou a incidência e níveis de ZEA em broa, tanto as preparadas apenas com a farinha de milho como as feitas com farinha mista, de milho e trigo. Do total das 52 amostras, 13,5% continham ZEA e as concentrações variaram entre 9,6 e 50,4µg/kg (Ribeiro *et al.*, 2015). Duarte *et al.* (2020) analisaram micotoxinas em chás e plantas medicinais comercializados em Portugal e, do total das 37 amostras, 62% estava contaminada com ZEA, atingindo concentração máxima de 19,02µg/kg.

Rai, Das e Tripathi (2020), revisaram a ocorrência de ZEA em cereais em diversos estudos em nível global. O milho foi o principal alimento contaminado, em diversos países. Relativamente a Angola os dados publicados na literatura científica são escassos. Panzo (2013) relata incidência de 8,3% de ZEA no milho em concentrações no intervalo de 0,7 a 143µg/kg.

No entanto, dentre as investigações realizadas em países africanos, no Egito, as concentrações para o milho foram as mais elevadas variando entre 9800 e 38400µg/kg, conforme se observa na **Tabela 3**. Ekwomadu e Mwanza (2016) em sua revisão acerca das micotoxinas em África destaca incidência de ZEA nos seguintes alimentos: malte, milho,

coco, cerveja e amendoim. Destaca-se ainda a incidência de 92,5% de ZEA no milho e de 90% no feijão da República Democrática do Congo (Mulunda *et al.*, 2013). Na República dos Camarões, no milho processado em casa, em preparação típica “fufu” 100% estava contaminado com ZEA, com concentrações variando de 5 a 150µg/kg. ZEA-cis e ZEA sulfato-cis foram reportados pela primeira vez em alimentos de Camarões (Abia *et al.*, 2017). Ainda no continente Africano, em Nigéria, a incidência de ZEA foi de 32% no melão fermentado, 62,5% na goma de alfarroba, 31% no feijão fermentado e 33% no mingau de milho (Adekoya *et al.*, 2017).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) considera as principais fontes de exposição humana à ZEA: produtos à base de grãos, como grãos para consumo humano, produtos de moagem de grãos, cereais matinais, novos produtos de padaria e lanches, alimentos infantis, óleo de gérmen de milho e óleo de gérmen de trigo, pão, pãezinhos e massas (EFSA, 2011).

Estimativas de exposição humana com base em dados analíticos sobre a ocorrência de ZEA em várias categorias de alimentos e dados de consumo de alimentos sugerem que a exposição humana à ZEA e metabolitos pode estar próximo ou mesmo exceder a ingestão diária tolerável (TDI) derivada da EFSA para alguns grupos de consumidores (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016).

Em consulta ao Portal do RASFF, há apenas uma notificação relacionada à ZEA no ano de 2020, em trigo proveniente da República Checa e duas no ano de 2018, sendo uma em granola proveniente da Suíça e outra em ração proveniente da China.

Tabela 2. Zearalenona em fórmulas infantis, alimentos para bebês e crianças

País	Alimento	Amostras n	Incidência n positivos (%)	LOD (ng/kg)	Mínimo-máximo (ng/kg)	Metodologia	Referências
Coreia do Sul	Fórmulas infantis	36	9(25)	250	3300-17600	UHPLC	Ok et al., 2014
Tunísia	Alimentos à base de Cereais	32	11(34)	8800	< LOD- 44000	LC-MS/MS	Oueslati et al., 2018
EUA	Alimentos à base de Cereais	147	18(12)	2700	8900-26000	LC-MS/MS	Zhang et al., 2018
Itália	Alimentos à base de cereais	75	β -ZEL:5(7)	1500	< LOD- 23200	LC-MS/MS	Juan et al., 2014
Espanha	Alimentos à base de cereais	35	2(6)	2000	10000-15000	LC-MS/MS	Rubert, Soler e Mañes, 2012
Qatar	Multigrãos	7	2(33)	1330	1000- 5000	LC-MS/MS	UI Hassan et al., 2018
Portugal	Farinha para alimentação de bebês	6	3(50)	3750	11800-25200	LC/FD	Aldana et al., 2014
Nigéria	Alimentos à base de cereais	42	4(9,5)	120	500-6800	LC-MS/MS	Ezequiel et al., 2020
Itália	Fórmulas infantis à base de leite	185	ZEA:17(9) α -ZEL:49(26) β -ZEL:53(28) α -ZAL:0 β -ZAL:0		- 760 - 12910 - 73240	LC/FD	Meucci et al., 2011
	Alimentos à base de carnes	44	ZEA:0 α -ZEL:12(27) β -ZEL:0 α -ZAL:1 β -ZAL:0		- 30500 - 950000		

Tabela 3. Teores de zearalenona no milho em diversos países

País	Cereal	µg/kg
Egito	Milho	9800-38400
Nigéria	Milho	Até 17500
Marrocos	Milho	14-17
Brasil	Milho	653-9830
USA	Milho	100-21600

Adaptado de RAI, DAS e TRIPATHI (2020)

3.5 REGULAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ALIMENTAR HUMANA

A segurança e o impacto económico decorrente da comercialização de alimentos contaminados por micotoxinas são consideráveis e reconhecidos (Udomkun *et al.*, 2017). Portanto, para proteger os consumidores dos riscos para a saúde humana, muitos países adotaram regulamentos ou diretrizes para limitar a exposição (Duarte, Lino, Pena, 2010).

Comitês científicos têm emitido valores de ingestão diária tolerável - *Tolerable Daily Intake* (TDI). Estes valores são baseados em estudos animais aplicando um fator de correção de 100 ou mais para contabilizar as diferenças interespecies e variações intraespecies (Degen *et al.*, 2017). A TDI não aborda especificamente o cenário da criança que é amamentada com leite materno. No entanto, a amamentação não deve expor o bebé a doses mais elevadas que a TDI (Degen *et al.*, 2017).

O Painel Científico dos Contaminantes na Cadeia Alimentar da EFSA estabeleceu uma TDI para ZEA de 0,25µg/kg peso corporal/dia baseado em um NOEL de 10µg/kg peso corporal/dia, pelos efeitos estrogénicos em fêmeas de suínos, a espécie mais sensível à toxicidade de ZEA, e um fator de incerteza de 40, sendo 4 para diferenças na toxicocinética interespecies e 10 para variabilidade inter-humana (EFSA, 2011). Devido à vulnerabilidade dos bebés, a EFSA orienta para a avaliação de substâncias químicas em lactentes com idades de até 16 semanas, que deve-se considerar um fator adicional. Assim, a TDI para a população adulta tem que ser ajustada por um fator de 3 para derivar uma TDI infantil apropriada, a resultar em 0,083µg/kg peso corporal/dia ou 83ng/Kg P corporal (Degen *et al.*, 2017 ; EFSA, 2017; Braun *et al.*, 2018).

Os riscos de exposição a micotoxinas em humanos estão fortemente relacionados às infraestruturas regulatórias (James e Zikankuba, 2018). Para salvaguardar a saúde pública, os

MLs (Limites máximos tolerados) de micotoxinas foram estabelecidas por diferentes instituições nacionais e organizações internacionais. Várias nações estabeleceram níveis de recomendação ou níveis máximos permitidos para ZEA em alimentos, variando de 50 a 1000µg/kg (ppb) (FAO, 2004; Maragos, 2010). O Regulamento (CE) n.º 1126/ 2007 dispõe sobre o teor máximo de ZEA em alimentos (µg/kg), conforme **Tabela 4**.

Níveis mais restritivos são definidos para alimentos destinados aos bebés, sendo de 20µg/kg para ZEA, na União Europeia (Huang *et al.*, 2014). Apesar do leite ser um alimento básico em muitos países e nutricionalmente importante devido ao seu alto teor de cálcio, nenhum nível máximo foi definido para concentração de ZEA em produtos lácteos (Välilä *et al.*, 2010).

Em Angola, por meio do Decreto Presidencial n.º 179 de 2/08/2018, foi publicado o “Regulamento sobre a sujeição a análises laboratoriais dos produtos destinados ao consumo humano e animal”. O Artigo 14 dispõe que “Os limites máximos de resíduos tolerados para as micotoxinas em alimentos”, dentre outros, são objeto de regulação específica. E, ainda, dispõe que enquanto não for aprovada a regulamentação referida, os laboratórios devem aplicar as regras recomendadas, em termos de limites máximos tolerados, estabelecidas internacionalmente como as constantes do *Codex Alimentarius* e as definidas pela FAO/OMS. Portanto, em Angola, não há Legislação específica para ZEA.

James e Zikankuba (2018) recomendam que os países da África Subsariana priorizem prevenção e controle de micotoxinas no milho como tem sido praticado para atender aos rígidos requisitos regulamentares para exportações para Europa e outras nações. Além disso, conscientização e defesa são necessários ao formulador de políticas e à comunidade em geral para garantir sua atenção e participação na prevenção de micotoxinas e controle em sistemas alimentares, protegendo a população local.

Tabela 4. Limite máximo tolerável de zearalenona em alimentos na UE

UE	REGULAMENTO (CE) 1126/2007 - fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que se refere às toxinas <i>Fusarium</i> no milho e nos produtos à base de milho.	
I	Cereais não transformados com exceção do milho	100
II	Milho não transformado, com exceção do milho não transformado destinado à moagem por via húmida (*)	350
III	Cereais destinados ao consumo humano direto, farinha, sêmola e gérmen de cereais, enquanto produto final comercializado para consumo humano direto, com exceção dos géneros alimentícios referidos nos pontos VI, VII, VIII, IX, X	75
IV	Óleo de milho refinado	400
V	Pão (incluindo pequenos produtos de panificação), produtos de pastelaria, bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para pequeno-almoço, com exceção de refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho	50
VI	Milho destinado ao consumo humano direto, refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho	100
VII	Alimentos transformados à base de cereais (com exceção de alimentos transformados à base de milho) e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	20
VIII	Alimentos transformados à base de milho destinados a lactentes e crianças jovens	20
IX	Frações de moagem do milho com partículas de dimensões >500 micron abrangidas pelos códigos NC 1103 13 ou 1103 20 40 e outros produtos da moagem do milho com partículas de dimensões >500 micron que não se destinem ao consumo humano direto abrangidos pelo código NC 1904 10 10	200
X	Frações de moagem do milho com partículas de dimensões ≤500 micron abrangidas pelo código NC 1102 20 e outros produtos da moagem do milho com partículas de dimensões ≤500 micron que não se destinem ao consumo humano direto abrangidos pelo código NC 1904 10 10	300

3.6 SUSCETIBILIDADE INFANTIL ÀS MICOTOXINAS E À ZEARALENONA

A exposição no início da vida afeta a saúde na vida adulta. O desenvolvimento dos bebês pode ser criticamente afetado por contaminantes artificiais ou naturais, incluindo, nestes, as micotoxinas (Braun *et al.*, 2020). Bebês e crianças estão em risco e são cerca de três vezes mais suscetíveis que os adultos aos efeitos adversos das micotoxinas devido à relação elevada entre a ingestão e o seu peso corporal, alta taxa metabólica e baixa capacidade de detoxificação (Ortiz *et al.*, 2018; Braun *et al.*, 2020). Portanto, podem ser mais sensíveis aos efeitos neurotóxicos, endócrinos e imunológicos. Por essas razões, uma análise de risco específica e atualizada para esta faixa etária é de grande interesse (Raiola *et al.*, 2015).

Além disso, apresentam dietas mais restritas (Assunção *et al.*, 2018) com consumo de cereais matinais, cereais infantis e biscoitos entre os primeiros alimentos sólidos (Amezdroz *et al.*, 2015). Dessa forma, o potencial risco à saúde em alimentos usualmente consumidos por crianças é significativo e requer atenção especial (Assunção *et al.*, 2018).

A exposição à ZEA durante a gravidez pode resultar na exposição do feto demonstrada pela transferência placentária de ZEA e seus metabolitos (Warth *et al.*, 2019).

Degen *et al.* (2017) investigaram a relação entre a ingestão materna de micotoxinas - dentro dos valores de TDI - e a exposição, via leite materno, em crianças em amamentação exclusiva. Os investigadores fizeram ajustes da TDI para a idade de crianças de acordo com o guia da EFSA de 2017. O resultado do estudo demonstrou a segurança do aleitamento materno exclusivo em um cenário contínuo de exposição respeitando a TDI. Chuisseu *et al.* (2018) relataram a qualidade do leite materno em relação a algumas fórmulas infantis e alimentos complementares, reafirmando a superioridade do leite materno do ponto de vista das micotoxinas.

Portanto, o risco da exposição às micotoxinas em crianças depende da magnitude e frequência da exposição. Um alto risco é esperado quando há o consumo de dietas monótonas à base de cereais que são tipicamente contaminados com várias micotoxinas (Ortiz *et al.*, 2018). A diversidade alimentar pode mitigar a exposição às micotoxinas (IARC, 2015).

3.7 BIOMONITORIZAÇÃO

A prevenção dos danos à saúde causados por contaminantes presentes no meio ambiente, fazendo com que os níveis dessas exposições sejam mantidos em valores que não constituem risco inaceitável à saúde do homem é um objetivo da Saúde Pública. Para isso tornam-se necessárias a identificação e a quantificação desses riscos pela avaliação da exposição humana, que pode ser determinada por meio da mensuração de parâmetros biológicos denominados biomarcadores (Bando *et al.*, 2007). A biomonitorização de ZEA tem sido objeto de diversos estudos em diversas matrizes biológicas como urina (**Tabela 5**), sangue e leite materno (**Tabela 6**).

Uma vez que 10–20% de uma dose oral de ZEA são excretados, pela via urinária, em 24h, os metabolitos urinários de ZEA podem apresentar-se como biomarcadores adequados para monitorar a exposição humana (Metzler, Pfeiffer e Hildebrand, 2010; Lorenz *et al.*, 2019). Vários estudos empregaram métodos sensíveis como LC-MS/MS para quantificar ZEA e seus metabolitos na urina. As investigações medem diretamente a excreção de ZEA usando padrões analíticos para os principais metabolitos urinários ou realizam abordagens indiretas que empregam a desconjugação enzimática e enriquecimento de analitos antes da análise. Os métodos diretos, normalmente estabelecidos como métodos multimicotoxinas, são geralmente menos sensíveis do que os métodos indiretos (Mally, Solfrizzo, Degen, 2016; Lorenz *et al.*, 2019). A porcentagem de amostras positivas em estudos de biomonitorização humano (HBM), portanto, depende em grande parte do método analítico empregado. Uma análise comparativa de urinas de um estudo coorte sul-africano destacou diferenças marcantes na porcentagem de amostras positivas usando abordagens diretas vs. indiretas (2 vs. 98% das amostras testadas positivas, respectivamente) devido à maior sensibilidade do método analítico indireto (Shephard *et al.*, 2013; Lorenz *et al.*, 2019). Portanto, as abordagens diretas podem detectar ZEA e seus metabolitos em indivíduos altamente expostos, mas parecem ser menos adequadas para monitorar exposições médias à ZEA. Em estudos realizados na África do Sul, onde o milho é o principal alimento básico, as concentrações de biomarcadores urinários de ZEA foram significativamente mais altas quando comparadas aos resultados europeus, refletindo a maior ingestão dietética de ZEA. Assim, a excreção urinária de ZEA e seus metabolitos parecem ser indicadores adequados da exposição humana à ZEA (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016). Na **Tabela 5** constam estudos de excreção urinária de ZEA com foco nos realizados em países africanos. Na literatura pesquisada, não se encontraram dados relativos à Angola.

Arce-López *et al.* (2020) revisaram estudos que pesquisaram ZEA, α -ZEL, β -ZEL,

ZAN, α -ZAL, β -ZAL em plasma humano. Diversos métodos analíticos são empregados para esta matriz, utilizando extração em fase líquida (LLE) ou em fase sólida (SPE) e alguns com etapa adicional de *cleanup*. As metodologias de detecção e quantificação variam entre cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* - LC-MS/MS, cromatografia líquida com espectrometria de massa de alta resolução - LC-HRMS, entre outras.

Outras metodologias, comumente utilizadas na detecção de ZEA em matrizes biológicas e alimentares, são aquelas baseadas na utilização de anticorpos (imunoensaios), em particular ensaios de imunoabsorção enzimática como ELISA (Maragos, 2010). O ensaio imunoenzimático ELISA é amplamente utilizado para detecção de micotoxinas (Huang *et al.*, 2014). O ELISA oferece uma triagem rápida e muitos kits estão comercialmente disponíveis para a detecção e quantificação de todas as principais micotoxinas, incluindo ZEA. Esta técnica é rápida, específica e relativamente fácil de usar para a análise de micotoxinas em alimentos (Dinleyieci *et al.*, 2018).

Em estudos em amostras de leite materno, cerca de 70% dos estudos usaram a LC para quantificar as concentrações de micotoxinas no leite materno e cerca de 25% por ensaio imunoenzimático “ELISA” (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016). O ELISA é um método analítico sensível, rápido e confiável. Existem diversos formatos, tais 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 em ensaios de segurança alimentar. O ELISA competitivo é classificado em duas categorias de acordo com o princípio de funcionamento: ELISA competitivo direto e ELISA competitivo indireto (Huang *et al.*, 2014). No ELISA competitivo direto, a microplaca é sensibilizada com anticorpo. No ELISA competitivo indireto, a sensibilização da microplaca é realizada com o antígeno (Meirelles *et al.*, 2006). Os kits ELISA comercialmente disponíveis para detecção de micotoxinas são normalmente baseados em um formato de ensaio competitivo. O imunocomplexo formado irá então interagir com um substrato cromogénico para dar um resultado mensurável (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009).

Tabela 5. Zearalenona e seus metabolitos na urina humana

País	Amostras n	Incidência n positivos (%)	Concentrações mínima-máxima (ng/L)	Metodologia	Referência
Camarões	220 crianças	ZEA:8(3,6)	650-5000	LLE/ HPLC	Njumbe Ediage <i>et. al</i> , 2013
		α -ZEL:9(4)	260-1300		
		β -ZEL:18(8)	20-12500		
Nigéria	120 crianças, adolescentes e adultos	ZEA:1(0,8)	LOD - 300	LC-MS/MS	Ezequiel <i>et. al</i> , 2014
		ZEA-14GlcA:8(6,7)	LOD-44500		
Nigéria	120 adultos	ZEA:98(81,7)	30-19990	SPE/UHPLC	Šarkanj <i>et. al</i> , 2018
		α -ZEL:5(4,2)	520-2520		
Tunísia	42 adultos	β -ZEL:7(5,8)	60-2740	LLE/UHPLC- MS/MS	Belhassen <i>et. al</i> , 2014
		α -ZAL:8(19)	760-3170		
		ZEA:62(100)	17-84		
Bangladesh	62 (verão) adultos	α -ZEL:62(100)	170-346	IAC/LC-MS/MS	Ali e Degen, 2019
		β -ZEL:11(18)	<LOD - 22		
		ZEA:62(100)	15-201		
	62 (inverno) adultos	α -ZEL:62(100)	100-286		
		β -ZEL:55(89)	<LOD-90		

3.7.1 Biomonitorização de zearalenona no leite materno

Com o objetivo de avaliar o risco associado à exposição das crianças às micotoxinas por via do aleitamento materno, muitos investigadores, desde o início dos anos 80, estabeleceram métodos analíticos para determinar aflatoxinas e ocratoxina nesta matriz. Mais recentemente foram reportadas metodologias para a determinação de FB₁ e ZEA.

Existem lacunas significativas no conhecimento sobre a captação e transferência de micotoxinas e seus metabolitos para o leite materno. A transferência de micotoxinas do alimento ao leite materno pode depender da diversidade da dieta e da hidratação materna, das propriedades físico-químicas do tóxico para absorção e distribuição, e da frequência da alimentação infantil (Warth *et al.*, 2016).

O conhecimento sobre taxas de transferência lactacional de ZEA em humanos é limitado, a transferência de ração para leite em gado leiteiro pode fornecer uma aproximação aproximada do que esperar (Mirocha *et al.*, 1981; Degen, Muñoz, Hengstler, 2013). No entanto, é importante considerar que (a) a conversão bacteriana em ruminantes é diferente e isso pode impactar fortemente a disposição de uma determinada micotoxina e que (b) as taxas de produção de leite / kg de peso corporal em rebanhos leiteiros excedam em muito a de uma mãe que amamenta, modificando significativamente a distribuição de tóxicos disponíveis no sistema. Neste contexto, os dados sobre as taxas de transferência são limitados para as micotoxinas de interesse para a saúde pública. Além de taxas lactacionais de transferência, o conhecimento sobre potenciais correlações entre concentrações de micotoxinas no leite materno e na urina de ambos a mãe e/ou o bebê seria útil (Warth *et al.*, 2016). Mais esforços de pesquisa são necessários para correlacionar a exposição alimentar materna, plasma sanguíneo e níveis no leite materno de maneira adequada, usando metodologias analíticas avançadas e robustas, incluindo procedimentos de amostragem adequados e coleta de dados longitudinais (Warth *et al.*, 2016).

Até o momento, não temos conhecimento de nenhum resultado adverso à saúde relacionado à transferência materna de micotoxinas para bebês, embora alguns níveis relatados excedam as TDIs recomendados para algumas toxinas. Não há dúvida de que o leite materno é a dieta inicial ideal para bebês. Isso pode ser particularmente verdadeiro para populações em regiões economicamente menos desenvolvidas, onde as alternativas carecem de nutrientes essenciais encontrados no leite materno; e, mais importante, essas alternativas ao leite materno podem ser menos higiênicas, conter menos componentes benéficos não nutritivos e provavelmente estar contaminadas com micotoxinas em níveis

significativamente mais elevados do que o leite materno (Warth *et al.*, 2016).

Na **Tabela 6** apresentam-se os estudos com ZEA em leite materno. Pode-se concluir que a ocorrência de ZEA no leite humano está presente em diferentes continentes - América, África e Europa. As concentrações mais elevadas de ZEA encontram-se nas amostras da investigação realizada na Nigéria (Braun *et al.*, 2018), com o valor de 60000ng/L muito superior às demais populações, sendo aproximadamente 87 vezes a concentração máxima da Turquia (Dinleyci *et al.*, 2018). Entre as coortes, o valor mínimo foi observado na Turquia, sendo de 35,7ng/L (Dinleyci *et al.*, 2018). Em relação às taxas de incidência, a Itália (Massart *et al.*, 2016) e Turquia (Dinleyci *et al.*, 2018; Memiş, Yalçın e Yalçın, 2020) encontram-se com a totalidade das amostras positivas.

Tabela 6. Estudos de ocorrência de zearalenona em leite materno

País	n	Incidência n positivos (%)	Concentrações mínima-máxima (ng/L)	Média/mediana (ng/L)	LOD/LOQ (ng/L)	% recuperação	Metodologia	Ref.
Itália	47	47(100)	260-1780	1130±340/ -	60/ - 20/50	78 90±2	ELISA e IAC/ LC-FD	Massart <i>et al.</i> , 2016
Turquia	90	90(100)	35,7-682	/173,8	-	-	ELISA	Dinleyci <i>et al.</i> , 2018
Espanha	35	ZEA:13(37) α -ZEL:1(3) β -ZEL:1(3)	2100-14300 16700 39800	-	-	84 88 91	QuEChERS/UH PLC-HRMS	Rubert <i>et al.</i> , 2014
Austria	87 15	0 0	-	-	- / 32	-	AOH/LC- MS/MS	Braun <i>et al.</i> , 2020
Nigéria	75	ZEA α -ZEL β -ZEL	200-60000 133-80000 133-80000	-	93 /190 73/150 68/40	97 99 100	QuEChERS/LC- MS/MS	Braun <i>et al.</i> , 2018
Itália	275 178	12(4) 15(8)	2000-17000 2000-22000	2100/2900 2700/2200	-4000	-	IAC/HPLC/FD	Valitutti <i>et al.</i> , 2018
Irão	90	0	-	-	5 / -	-	ELISA	Samiee <i>et al.</i> , 2020
Turquia	79	79(100)	-	- /340	-	87	ELISA	Memiş, Yalçın e Yalçın, 2020

PARTE B – EXPERIMENTAL

I. JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS

Considerando a vulnerabilidade e suscetibilidade dos lactentes e que os efeitos crónicos da exposição à ZEA são os mais preocupantes, podendo a exposição iniciar-se ainda no útero, é indiscutível a necessidade de investigações científicas neste grupo etário e com esta micotoxina. A maioria dos estudos analisam teores de aflatoxinas e de OTA, no entanto, os efeitos estrogénicos da ZEA não devem ser negligenciados, particularmente, na infância. Além disso, a recolha de leite materno não é um método invasivo, sendo de baixo custo e possibilitando, em simultâneo, a avaliação da exposição à ZEA tanto para a mãe quanto para o filho.

Os níveis de micotoxinas em África frequentemente excedem os limites máximos estabelecido pela União Europeia (Kebede *et al.*, 2020). Questões de segurança alimentar em regiões em desenvolvimento, especialmente em África, são desafios devido a várias razões, como o uso de matérias-primas agrícolas de baixa qualidade durante a pré-colheita e a má gestão do manuseio e processamento de alimentos. Além disso, há uma grande tendência de se usar cereais caseiros pois grande parte da população são agricultores de subsistência que cultivam, estocam e preparam seus próprios alimentos básicos. Consequentemente, uma ampla proporção de bebés e crianças pequenas recebem estes alimentos contaminados com micotoxinas (Lombard, 2014; Warth *et al.*, 2016). Dados recentes em alimentos em países africanos sugerem frequente contaminação de ZEA como discorrido anteriormente.

Em relação a Angola, o Relatório de Desenvolvimento Humano de 2019 mostra um Índice de Desenvolvimento Humano - IDH de 0,579 para este país (PNUD, 2019). Em 2018, a população era de 30,81 milhões de habitantes. Este país possui uma taxa de pobreza de 36%, o que representava, em 2014, um universo de 9,44 milhões de habitantes (UNICEF, 2018). Segundo o Inquérito de Indicadores Múltiplos e de Saúde (IIMS) de 2015-2016, a província de Cabinda, local onde vivem as doadoras de leite materno da presente investigação científica, possui uma prevalência de 22% de desnutrição crónica em crianças de 6-59 meses, sendo esta classificada como prevalência média (UNICEF, 2018). A mortalidade infantil de Angola, segundo o IIMS de 2015-2016, é de 68 em cada 1000 crianças dos 0 aos 5 anos de idade (UNICEF, 2018). Em relação aos alimentos, a agricultura familiar é responsável pela produção de 95% de alimentos nacionais consumidos (UNICEF, 2018). Portanto, torna-se evidente a vulnerabilidade das crianças de Angola, especificamente da população de Cabinda.

O presente estudo tem como objetivo geral: avaliar a exposição dos lactentes à ZEA, em Angola.

E os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecer a incidência e as concentrações de ZEA nas amostras de leite humano pelo método ELISA;
- Estimar a ingestão de ZEA pelos lactentes e comparar com a TDI;
- Avaliar a correlação da contaminação da amostra com dados sociodemográficos, antropométricos e alimentares;
- Comparar a exposição de ZEA da população estudada com estudos realizados previamente.

2. METODOLOGIA

Este estudo teve a aprovação do Conselho Científico e Comissão de Ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra - FFUC e da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Escola Universitária Vasco da Gama - EUVG (Parecer no 2009/001). Foi considerada a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial de 1975, revista em 2013 (WMA, s.d.) e demais normas relacionadas em vigor.

2.1. AMOSTRAGEM

Amostras de leite materno de 37 lactantes (n=37) foram colhidas entre Agosto/Setembro de 2018 e em agosto de 2019, na região de Belize, província de Cabinda, Angola.

As amostras foram colhidas por um profissional de saúde, uma enfermeira, em consultas de acompanhamento infantil, por extração manual e armazenadas em sacos estéreis, congeladas e transportadas por via aérea para Portugal, sendo armazenadas a -20°C .

Para poderem participar deste estudo as lactantes apresentavam-se saudáveis, foram informadas, assinaram o termo de consentimento (Anexo I), e responderem a um questionário (Anexo II e III). Foram excluídas participantes que apresentavam doença mamária infecciosa ou tumoral, idade inferior a 18 anos e parto ocorrido em intervalo inferior a um mês, para evitar colostro ou leite de transição.

2.1.1 Dados sociodemográficos, antropométricos e alimentares

Por meio do preenchimento do questionário (Anexo II e III) foram colhidos dados antropométricos e características individuais da mãe e bebé (idade e número de filhos; idade, peso na recolha, respetivamente), dados sociodemográficos da mãe (escolaridade, profissão e local de residência), dados relativos a alimentação (origem dos alimentos consumidos, local de consumo e questionário semi-quantitativo de frequência alimentar). Nas amostras colhidas em 2018, as características da amamentação (exclusiva ou mista) também foram abordadas.

2.2 MATERIAIS E MÉTODO ANALÍTICO

O método de detecção de ZEA nas amostras de Leite Materno foi o ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA, competitivo. Utilizou-se o *Kit RIDASCREEN® Zearalenon* (Art. n.º RI401 da R- Biopharm AG, Darmstadt, Germany) com a nota de aplicação específica para leite (Anexo IV). Em relação à validação do método para este *kit*, o limite de detecção - LOD é de 60ng/L .

A extração das amostras realizou-se de acordo com as instruções do fabricante do *Kit*. Assim, cada amostra de leite, previamente descongelada, foi centrifugada (Sigma 3-16k; FFUC), por 15 minutos, a 4°C, 3025g. O sobrenadante lipídica foi removido com uma pipeta de Pasteur. Da fração restante, 1,5ml foram transferidos para um tubo Eppendorf® para nova centrifugação, nas condições anteriormente referidas. Retirou-se 1ml que foi sujeito a tratamento enzimático com 20µL de β-glucuronidase /Arylsulfatase (de *Helix pomatia*) da Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Em seguida, agitou-se brevemente no vortex e incubou-se por 3 horas, a 37°C. Após o período de incubação, retirou-se 0,1ml da amostra e adicionou-se 0,1ml de metanol a 0,9ml da amostra hidrolisada e desnatada.

Para o ensaio imunoenzimático foram adicionados 50µL da solução resultante às microplacas revestidas com anticorpos contra ZEA.

Registaram-se as posições, em poços duplicados, das soluções padrão (seis concentrações: 0ng/L, 50ng/L, 150ng/L, 450ng/L, 1350ng/L e 4050ng/L) e das amostras. Foram adicionados 50µL da soluções padrão ou amostra preparada, nos respetivos poços. Em seguida, adicionou-se 50µL do conjugado enzimático diluído com tampão em cada poço e misturou-se suavemente agitando a placa manualmente e incubando por 2 horas à temperatura ambiente (20-25°C), no escuro. Após a incubação, o líquido dos poços foi descartado invertendo vigorosamente a placa, por três vezes, contra um papel absorvente. Em seguida, adicionou-se aos poços 250µL de solução de lavagem (água bidestilada) e descartou-se o líquido novamente. O procedimento de lavagem realizou-se duas vezes. Posteriormente, 50µL de cromógeno foram adicionados a cada célula e agitou-se a placa manualmente que, em seguida, foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Por fim, adicionou-se 100µL de solução *STOP* a cada célula. Misturou-se suavemente movimentando a placa manualmente e foi medida a absorvância a 450nm (Microplate reader 2100-C, Optic Ivymen System®). Esta leitura realizou-se após 30 minutos da adição da solução *STOP*.

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise estatística, utilizou-se o *GraphPad Prism 6.01*. Para a avaliação da normalidade dos dados foram aplicados os testes *D'Agostino & Pearson omnibus*, *Shapiro-Wilk* e *KS*. A comparação de dois grupos de dados foi feita utilizando o teste *t de Student* com o teste *Mann Whitney*. Para analisar três ou mais conjuntos de dados, utilizou-se ANOVA com o teste de comparações múltiplas de *Dunn*. Nos testes de correlação, foi usado o teste de *Spearman*.

Os dados foram considerados estatisticamente significativos se o $p < 0,05$. As concentrações de ZEA das amostras foram testadas para verificar se havia correlação com a dieta (grupos alimentares e frequência semanal: nunca; 1- 2 x na semana; 3 - 4 x na semana ou 5 - 6 x na semana), paridade, idade, profissão; níveis de instrução maternos. Também se avaliaram as diferenças de contaminação nos dois períodos distintos de colheita (agosto de 2018 e agosto/setembro de 2019) e se os lactentes estariam mais expostos de acordo com a faixa etária.

2.4 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO À ZEARALENONA

2.4.1 Avaliação do risco dos lactentes

A avaliação do risco dos lactentes foi mensurada pelo quociente de risco (QR), o qual estabelece a relação entre a ingestão diária estimada (EDI) e a ingestão diária tolerável (TDI). A fórmula utilizada é $QR: EDI/TDI$. Uma razão >1 implica um nível de exposição não tolerável (Martins *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2018; EFSA, 2013). Este valor do $QR > 1$ equipara-se a um % de TDI acima de 100. Ressalta-se que a referência da TDI infantil apropriada é a TDI ajustada de 83ng/Kg de Peso corporal (Degen *et al.*, 2017; EFSA, 2017; Braun *et al.*, 2018). Portanto, esta TDI corrigida que será utilizada no cálculo do QR.

Dentre os lactentes, não dispomos do peso de um deles, portanto, esta estimativa será efetuada para 36 participantes. Para o cálculo da EDI (ng/kg de peso corporal/dia), inicialmente, é necessário estabelecer o volume de leite materno consumido por cada lactente.

1) Segundo Bogalho *et al.* (2018):

- Peso corporal do lactente de até 7kg:

Volume de leite ingerido em um dia = 150ml x kg de peso corporal

- Peso corporal do lactente > 7kg:

Volume de leite ingerido em um dia = 1 litro

Após a estimativa do volume de leite materno ingerido por cada lactente, aplica-se a seguinte fórmula para a estimativa de ingestão diária (EDI) de ZEA:

$$EDI = (\text{Volume de leite ingerido (em L)} \times [\text{ZEA}]) / \text{peso corporal}$$

2) Para lactentes de até 111 dias, adicionalmente, foi calculada a EDI por outra referência: 185ml de leite ingerido/kg de peso corporal ao dia (EFSA, 2017; Degen *et al.*, 2017). Posteriormente, a EDI de ZEA foi calculada conforme fórmula de EDI acima referida.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES

3.1.1 Dados Antropométricos, características individuais das lactantes e dos lactentes

Os lactentes de nossa amostra estavam compreendidos entre 1-18 meses. Possuir, ao menos, um mês também era um critério de inclusão uma vez que a composição do colostro difere do leite maduro o que poderia ser um viés para as comparações das concentrações de ZEA.

A média de idade dos lactentes da nossa amostra é 6 meses e o peso médio de 7,5kg – **Tabela 7**. A faixa etária das lactantes incluídas no nosso estudo foi de 18-40 anos, reiterando que os 18 anos, no mínimo, era, também, um dos critérios de inclusão.

Tabela 7. Características individuais das lactantes e dos lactentes

Lactantes				Lactentes			
	Mínimo-máximo	Média	Mediana		Mínimo-máximo	Média	Mediana
Idade (anos)	18-40	26,7±7,1	26	Idade (meses)	1-18	6,4±3,4	7
Número de filhos	1-9	3±1,9	3	Peso na recolha do LM (kg)	3,5-11,4	7,5±1,8	7,7

3.1.2 Dados sociodemográficos das lactantes

Conforme a **Figura 3**, percebe-se que a maior parte das participantes são múltiparas. Em relação ao grau de instrução, **Figura 4**, aproximadamente 70% da amostra possui o nível básico/primário e cerca de metade da amostra é composta por estudantes, conforme **Figura 5**.

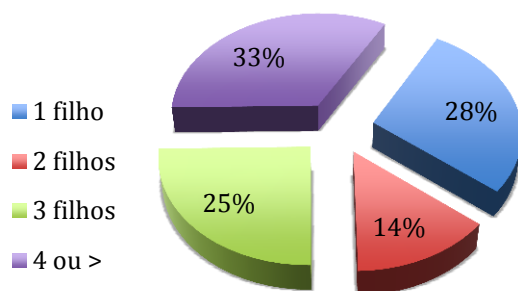


Figura 3. Número de filhos

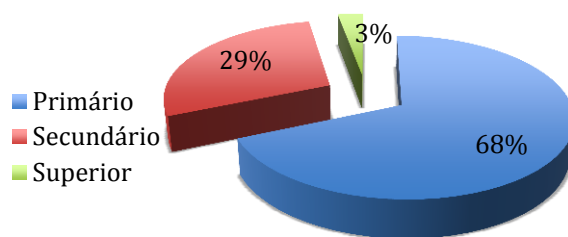


Figura 4. Escolaridade

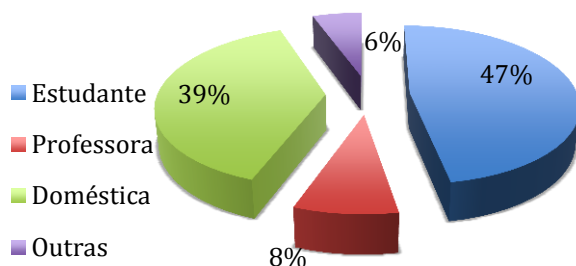


Figura 5. Profissão

Na **Figura 6**, constam os dados relativos ao tipo de aleitamento dos lactentes de até 6 meses de idade da colheita de 2018. Desta amostra (n=10), 80% estavam em aleitamento misto (AMM) e 20% em aleitamento materno exclusivo (AME). Portanto, a recomendação do aleitamento materno exclusivo da OMS de se manter até os 6 meses de idade, para esta população do estudo, se encontra aquém dos dados oficiais de aleitamento materno exclusivo em Angola, que é de 37% (**Figura 7**).

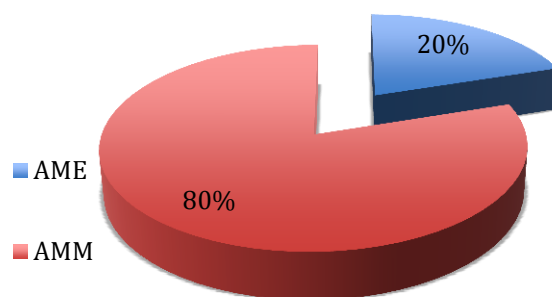


Figura 6. Tipo de aleitamento em crianças de até 6 meses de idade

Rates of Exclusive Breastfeeding in Infants <6 Months

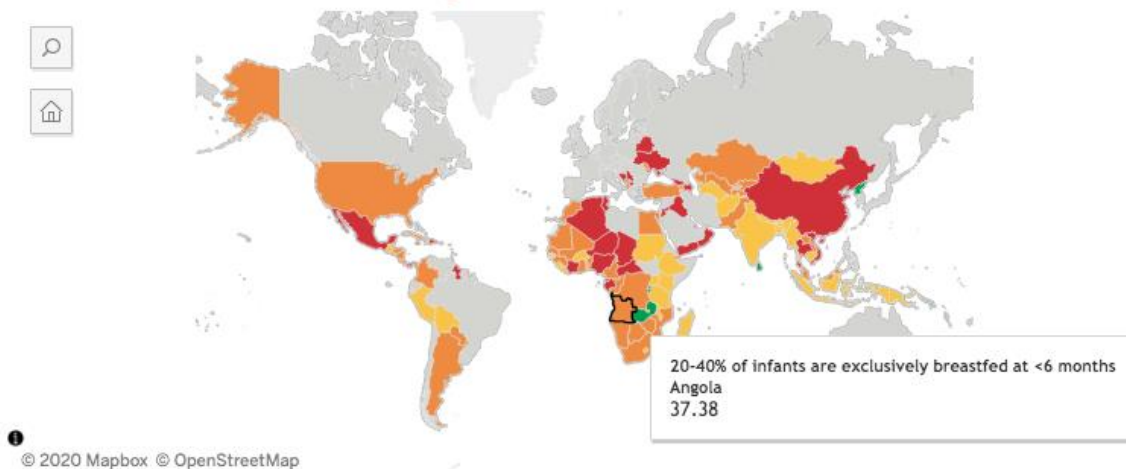


Figura 7. Taxa de aleitamento materno exclusivo em <6 meses, em Angola
(UNICEF, WHO, 2020)

3.2 INCIDÊNCIA E OCORRÊNCIA DE ZEA

Para avaliação dos resultados de absorvâncias obtidas no imunoensaio enzimático foi utilizado o software RIDASOFT.Win.net. O cálculo do teor de ZEA no leite materno foi realizado em determinações duplas através de uma função *spline* cúbica.

Em relação à incidência de ZEA nas amostras, as 37 amostras (n) foram positivas, portanto 100% apresentou concentrações maiores que o LOD de 60ng/L do método ELISA utilizado. A **Tabela 8** apresenta a incidência, concentrações mínima, máxima, média e mediana de ZEA encontradas nas amostras de leite materno.

Tabela 8. Incidência e concentrações de zearalenona no leite materno

		Concentrações de ZEA		
Amostras	Incidência	Mínima-máxima	Média	Mediana
n	n positivos (%)	(ng/L)	(ng/L)	(ng/L)
37	37/100%	72,5-1487,4	380,7±256,7	317

Em relação às concentrações de ZEA nas amostras de 2018 e de 2019, não houve diferença estatisticamente significativa.

A idade materna, a profissão, a escolaridade e o número de filhos também não se correlacionaram com o teor de ZEA no respectivo leite. E por fim, para a correlação da concentração de ZEA com a idade do lactente não houve diferenças estatisticamente significativas. No entanto, na **Tabela 9** verifica-se que a concentração média mais elevada se refere à faixa etária materna dos 26-33 anos: 436±360ng/L. Também para este intervalo etário, tivemos a amostra com a maior concentração de ZEA: 1487,4ng/L. Na **Tabela 10**, observa-se que a concentração média mais elevada ocorreu nas mães primíparas: 612±318 ng/L. Relativamente à faixa etária dos lactentes, conforme **Tabela 11**, entre os 7-10 meses de idade, observamos a concentração máxima de ZEA, 1487,4ng/L, e também a média de concentração de ZEA mais elevada por intervalo etário dos lactentes, 416,2± 297,3ng/L. Relativamente ao peso dos lactentes, na **Tabela 12**, podemos observar que o intervalo entre 9,1 e 11,4kg apresentou a máxima concentração de ZEA deste estudo e a concentração média de ZEA mais elevada por peso dos lactentes: 1487,4ng/L e 598±501ng/L respectivamente.

Tabela 9. Concentrações de zearalenona por faixas etárias das lactantes

		Concentrações de ZEA	
Amostras	Faixa etária	Mínima- máxima	Média
n	(anos)	(ng/L)	(ng/L)
17	18-25	72,5-1077,9	377±219
12	26-33	185,2-1487,4	436±360
7	34-40	138,2-476,6	310±124

Tabela 10. Concentrações de zearalenona e número de filhos das lactantes

Amostras n	Número de filhos	Concentrações de ZEA	
		Mínima- máxima (ng/L)	Média (ng/L)
10	1	166,2-1077,9	612±318
5	2	212,2-575,1	325±148
8	3	72,5-1487,4	494±429
13	> 4	138,2-476,6	291±98

Tabela 11. Concentrações de zearalenona por faixas etárias dos lactentes

Amostras n	Faixa etária (meses)	Concentrações de ZEA	
		Mínima- máxima (ng/L)	Média (ng/L)
8	1-3	138,2-1077,9	372,1±305,5
10	4-6	72,5-600,2	323,1±164
17	7-10	186,93-1487,4	416,2±297,3
2	12-18	342,2-460,2	401,2±83,5

Tabela 12. Concentrações de zearalenona e peso dos lactentes

Amostras n	Intervalo de pesos (kg)	Concentrações de ZEA	
		Mínima- máxima (ng/L)	Média (ng/L)
10	3,5-6,9	138,2-460,2	299±95
21	7-9	72,5-1077,9	382±216
5	9,1-11,4	314,9-1487,4	598±501

Em nossa amostra, as análises estatísticas, para a frequência dos alimentos, evidenciaram correlação direta entre o consumo de bolachas e as concentrações de ZEA, com $p=0,0003$. Sabendo que há bolachas produzidas a partir de uma grande diversidade de

cereais, conclui-se que estes constituem uma fonte de exposição humana à ZEA. Ressalta-se, também, que é prática usual das mães oferecerem bolachas às crianças após o início da diversificação alimentar.

3.2.1 Comparação com outros estudos

Relativamente aos resultados de incidência, conforme se pode comparar com os dados apresentados na **Tabela 6**, a amostra aqui estudada apresentou a totalidade de positivos como também foi encontrada no estudo na Itália (Massart *et al.*, 2016) e em dois estudos na Turquia (Dinleyici *et al.*, 2018; Memiş, Yalçın e Yalçın, 2020). Estes estudos, também, utilizaram a metodologia ELISA. Valitutti *et al.* (2018), apesar de encontrarem concentrações mais elevadas do que as do presente estudo, observaram uma menor incidência. Estudos realizados no Irão (Samiee *et al.*, 2020) e Áustria (Braun *et al.*, 2020) não encontraram amostras positivas.

Em relação à comparação dos resultados de ocorrência do presente estudo com os encontrados na literatura científica, verifica-se que estudos realizados em Espanha (Rubert *et al.*, 2014), Nigéria (Braun *et al.*, 2018) e Itália (Valitutti *et al.*, 2018) encontraram valores mais elevados: 2100-14300ng/L, 200-60000ng/L, 2000-22000ng/L respetivamente, nas amostras de leite materno estudadas. No entanto, esses autores utilizaram metodologias mais sensíveis como UHPLC-HRMS e LC-MS/MS para a deteção e quantificação de ZEA. Ademais, diferenças climáticas, origem dos alimentos, entre outras, podem explicar as grandes variações entre os estudos. Os dois estudos realizados em Itália (Massart *et al.*, 2016; Valitutti *et al.*, 2018) apresentaram também concentrações médias mais elevadas, 1130 ng/L e 2700ng/L, respetivamente, do que as da nossa amostra. Em Espanha (Rubert *et al.*, 2014) e em Itália (Massart *et al.*, 2016; Valitutti *et al.*, 2018) as concentrações máximas observadas, 14300ng/L, 1780ng/L e 22000ng/L, respetivamente, também foram superiores.

No entanto, ao compararmos os presentes resultados com outras investigações que utilizaram ELISA, nossa mediana de concentração de ZEA, 317ng/L, se aproxima da mediana de 340ng/L de Memiş, Yalçın e Yalçın (2020), na Turquia.

Tal como no presente estudo, Dinleyici *et al.* (2018) também não encontraram correlação dos níveis de ZEA do leite humano com a idade materna. Massart *et al.* (2016) encontraram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de ZEA em relação

ao peso, IMC pré-gestacionais e pós-parto. No entanto, em nossa amostra, não dispomos de dados antropométricos maternos.

Massart *et al.* (2016) não comprovaram a correlação entre a dieta materna com as concentrações de ZEA no leite humano. No entanto, na Turquia a concentração de ZEA foi correlacionada ao consumo de carne, peixe, figo seco, damasco seco, flocos de pimenta vermelha e pimenta pelas lactantes (Dinleyici *et al.*, 2018).

Em Angola, o milho é o cereal com maior produção e um dos mais consumidos (Paim, 2016). Ressalta-se que fungos do género *Fusarium*, produtores de ZEA, dependem de uma humidade alta e de chuva (Manstretta e Rossi, 2016). A estação de maior precipitação, na província de Cabinda, ocorre desde meados de outubro a meados de maio (Weather Spark). A sementeira do milho em Angola ocorre em novembro, a colheita em maio a junho, a secagem não dura mais que um mês e a debulha entre julho e agosto (Paim, 2016). Associados ao milho, esses fungos invadem a planta no estágio de floração, especialmente no período chuvoso e, se os níveis de humidade permanecerem altos após a colheita, o fungo se desenvolve e produz a toxina (Mistura, 2019). Não dispomos nos questionários de frequência alimentar de dados específicos de consumo de milho, mas ao considerar a sua produção e consumo em Angola, este cereal pode ser, também, um dos ingredientes das bolachas.

Ainda, em relação à correlação da dieta com os níveis de contaminação, outros alimentos, nomeadamente alimentos típicos do consumo local, que não constavam no questionário, mas que fazem parte da dieta das lactantes que participaram neste estudo, poderiam estar contaminados com ZEA, contribuindo para estes resultados de ocorrência.

A incidência de 100% de ZEA no leite materno, no presente estudo, reflete que houve ingestão recente desta micotoxina por todas as lactantes. No entanto, não temos como estimar a ingestão diária (EDI) materna pois não temos o peso corporal materno e nem está elucidada em literatura científica a taxa de transferência lactacional da ZEA.

3.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO RISCO DOS LACTENTES

Na **Tabela 13** constam os resultados das Estimativas de ingestão diária - EDI (ng/kg peso corporal/dia) de ZEA utilizando a estimativa para o consumo de leite materno segundo Bogalho *et al.* (2018) e na **Tabela 14**, segundo EFSA (2017), conforme discorrido na

metodologia. As 36 amostras referem-se à totalidade dos lactentes que informaram o peso e as 8 amostras referem-se apenas aos lactentes com até os 111 dias.

Tabela 13. Estimativa de Ingestão Diária (EDI) de ZEA pelos lactentes

Amostras		EDI de ZEA (ng/kg de pc/dia)		
		Mínima-máxima (ng/kg P)	Média (ng/kg P)	Mediana (ng/kg P)
Todos lactentes*	36	10,1-159,9	47,6±29,7	40,3
Lactentes até 7kg	11	20,7-69	44,9±15,7	40,8
Lactentes >7 kg	25	10,1-159,9	50±35	37,6

*Peso de um lactente não informado

Podemos verificar que, de acordo com a **Tabela 13**, os valores de EDI variaram entre 10,1 e 159,9ng/kg pc/dia, com uma média de 47,6±29,7ng/kg pc/dia. A EDI máxima de ZEA, 159,9ng/kg pc/dia, ocorreu para os lactentes com peso superior aos 7kg.

Comparando com outros estudos, Dinleyici *et al.* (2018) reportaram uma EDI que variou entre 10,4 e 120,5ng/kg pc/dia, na Turquia.

Tabela 14. Estimativa de Ingestão Diária (EDI) de ZEA pelos lactentes de até 111 dias

Amostras		EDI de ZEA (ng/kg de peso corporal/dia)		
		Mínima-máxima (ng/kg P)	Média (ng/kg P)	Mediana (ng/kg P)
Lactentes até 111 dias	8	25,6-199,4	68,8±56,5	52,8

Relativamente aos lactentes com menos de 111 dias, **Tabela 14**, a EDI foi superior: 199,4ng/kg pc/dia, com uma média de 68,8±56,5ng/kg pc/dia e variou entre 25,6 e 199,4ng/kg pc/dia.

A **Tabela 15** apresenta os quocientes de risco (QR) e o percentual com QR >1.

Tabela 15. Quociente de risco (EDI/TDI ajustada para lactentes)

Amostras	QR >1	Quociente de risco		
	n (%)	Mínimo-máximo	Média	Mediana
36	2(5,5)	0,12-1,93	0,58	0,48
8	2(25)	0,31-2,4	0,83	0,64

Em nossa amostra, 5,5% dos bebês encontram-se em risco devido uma possível exposição à ZEA acima da TDI ajustada. O pior cenário refere-se à concentração mais elevada de ZEA de toda as amostras: 1487,4ng/L. Neste cenário, a EDI foi de 159,9ng/kg pc/dia, portanto, o quociente de risco foi de 1,93 ou 193% da TDI.

Nos lactentes de até 111 dias de vida (n=8), houve uma maior frequência de ingestão acima da TDI: 25% da amostra, fato preocupante devido à faixa etária destes bebês.

Deve-se ressaltar que, apesar da ZEA apresentar baixa toxicidade aguda, a ingestão crônica pode resultar em efeitos importantes, já anteriormente mencionados. Também não podemos desconsiderar a possibilidade de realização de dietas monótonas, com baixa variação de alimentos ingeridos pela população investigada.

4. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo podemos verificar que a população estudada encontra-se exposta à ZEA, com 5,5% dos lactentes em risco. A totalidade das mães foram expostas, recentemente, à ZEA, em quantidades suficientes para serem transferidas ao leite materno.

As investigações envolvendo uma população tão vulnerável, crianças oriundas de um país em desenvolvimento, devem prosseguir para que a Saúde Pública seja melhorada, a regulamentação específica seja, realmente, implementada e os efeitos crónicos da exposição à ZEA sejam mitigados. As pesquisas científicas com o leite materno são de grande vantagem por avaliar a ingestão direta, com relativa facilidade de colheita, não invasiva e económica. Comparativamente, a recolha de urina de bebés, que ainda utilizam fraldas, é de extrema dificuldade. Por outro lado, amostras sanguíneas são invasivas e de alto custo. Além disso, o leite materno poderá proporcionar a avaliação da exposição de ambas populações: mãe e filho.

No futuro seria importante a avaliação da urina das lactantes para uma melhor avaliação da exposição materna à ZEA. É necessário que os alimentos destinados à diversificação alimentar também sejam investigados pois não dispomos, em publicação científica, de dados de ocorrência de ZEA em alimentos para crianças em Angola.

Em relação à redução da contaminação de alimentos por ZEA em Angola, seria importante, para além de implementar medidas de regulamentação e inspeção, implementar medidas educativas e de boas práticas agrícolas, tanto na pré quanto na pós-colheita, tais como a secagem completa dos grãos, colheita precoce das safras, higiene durante colheita, armazenamento e processamento.

Apesar dos resultados deste estudo indicarem uma exposição dos lactentes, deve referir-se que o leite materno continua sendo o alimento ideal, mais completo e seguro nos primeiros seis meses de vida e até, no mínimo, os dois anos de idade. A substituição por fórmulas infantis e alimentos à base de cereais pode proporcionar maior exposição à ZEA e outras micotoxinas e, ainda, ser deficiente na proteção das imunoglobulinas presentes no leite e de todas vantagens do vínculo mãe-filho inerentes ao aleitamento materno.

LISTA DE REFERÊNCIAS

ABIA, Wilfred A. *et al.* - Uncommon toxic microbial metabolite patterns in traditionally home-processed maize dish (fufu) consumed in rural Cameroon. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 107 (2017) 10–19. doi: 10.1016/j.fct.2017.06.011.

ADEKOYA, Ifeoluwa *et al.* - Awareness and prevalence of mycotoxin contamination in selected nigerian fermented foods. **Toxins**. . ISSN 20726651. 9:11 (2017) 1–16. doi: 10.3390/toxins9110363.

AGAG, B. I. - Mycotoxins in Foods and Feeds 3-Zearalenone. Ass. Univ. Bull. **Environ. Res.** 7:2 (2004) 159–176.

ALDANA, Juan Ramos *et al.* - Occurrence and risk assessment of zearalenone in flours from Portuguese and Dutch markets. **Food Control**. . ISSN 09567135. 45 (2014) 51–55. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.04.023.

ALI, Nurshad; DEGEN, Gisela H. - Biomonitoring of zearalenone and its main metabolites in urines of Bangladeshi adults. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 130:May (2019) 276–283. doi: 10.1016/j.fct.2019.05.036.

AL-JAAL, Belqes Ahmad *et al.* - Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: A systematic literature review, 2001–2018. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 129:April (2019) 211–228. doi: 10.1016/j.fct.2019.04.047.

AMEZDROZ, E. *et al.* - Transition from milks to the introduction of solid foods across the first 2 years of life: Findings from an Australian birth cohort study. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. . ISSN 1365277X. 28:4 (2015) 375–383. doi: 10.1111/jhn.12313.

ARCE-LÓPEZ, Beatriz *et al.* - Human biomonitoring of mycotoxins in blood, plasma and serum in recent years: A review. **Toxins**. . ISSN 20726651. 12:3 (2020). doi: 10.3390/toxins12030147.

ASSUNÇÃO, Ricardo *et al.* - Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – An overview of risk assessment under MYCOMIX project. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 118:May (2018) 399–408. doi: 10.1016/j.fct.2018.05.040.

AZCONA, Juan I.; ABOUZIED, Mohamed M.; PESTKA, James J. - Detection of zearalenone by tandem immunoaffinity-enzyme-linked immunosorbent assay and its application to milk.

Journal of Food Protection. . ISSN 19449097. 53:7 (1990) 577–580. doi: 10.4315/0362-028x-53.7.577.

BANDO, Érika *et al.* - Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** . ISSN 16762444. 43:3 (2007) 175–180. doi: 10.1590/s1676-24442007000300006.

BELHASSEN, H. *et al.* - Validation of a UHPLC-MS/MS method for quantification of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol and zearalanone in human urine. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.** . ISSN 1873376X. 962:(2014) 68–74. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.05.019.

BELHASSEN, H. *et al.* - Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case-control study in Tunisia. **Chemosphere.** . ISSN 18791298. 128: (2015) 1–6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.12.055.

BENNETT, J. W. ; Klich , M. - Mycotoxins. **Clin Microbiol Rev** (2003) ; 16: 497-516.

BEUKES, Ilze *et al.* - Mycotoxigenic Fusarium species associated with grain crops in South Africa-A review. **South African Journal of Science.** . ISSN 19967489. 113:3–4 (2017) 1–12. doi: 10.17159/sajs.2017/20160121.

BIEHL, M.L. *et al.*. Biliary-excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 121, 152–159. (1993) <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1140>.

BOGALHO, Fernando *et al.* - Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. **Food Control.** . ISSN 09567135. 90: (2018) 140–145. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.02.043.

BRAUN, Dominik *et al.* - Longitudinal assessment of mycotoxin co-exposures in exclusively breastfed infants. **Environment International.** . ISSN 18736750. 142:(2020). doi: 10.1016/j.envint.2020.105845.

BRAUN, Dominik *et al.* - Unraveling Early-Life Mycotoxin Exposures via LC-MS / MS Breast Milk Analysis. 2 (2018). doi: 10.26434/chemrxiv.6391121.v1.

BUTTS, Christine A. *et al.* - Human milk composition and dietary intakes of breastfeeding women of different ethnicity from the manawatu-wanganui region of New Zealand. **Nutrients.** . ISSN 20726643. 10:9 (2018) 1–16. doi: 10.3390/nu10091231.

CAO, Hanwen *et al.* - Zearalenone causes embryotoxicity and induces oxidative stress and apoptosis in differentiated human embryonic stem cells. **Toxicology in Vitro**. . ISSN 18793177. 54:September 2018 (2019) 243–250. doi: 10.1016/j.tiv.2018.09.020.

CHERKANI-HASSANI, Abha; MOJEMMI, Brahim; MOUANE, Nezha - Occurrence and levels of mycotoxins and their metabolites in human breast milk associated to dietary habits and other factors: A systematic literature review, 1984-2015. **Trends in Food Science and Technology**. . ISSN 09242244. 50(2016) 56–69. doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.024.

CHILAKA, Cynthia Adaku *et al.* - The status of fusarium mycotoxins in sub-Saharan Africa: A review of emerging trends and post-harvest mitigation strategies towards food control. **Toxins**. . ISSN 20726651. 9:1 (2017). doi: 10.3390/toxins9010019.

CHUISSEU, Pascal Dieudonné *et al.* - Safety of breast milk vis-a-vis common infant formula and complementary foods from western and centre regions of Cameroon from mycotoxin perspective. **Recent Advances in Food Science**. 1:April (2018) 23–31.

CLAEYS, Liesel *et al.* - Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. . ISSN 15414337. 19:4 (2020) 1449–1464. doi: 10.1111/1541-4337.12567.

Comissão Europeia. RASFF - Food and feed safety alerts . Acedido em 14/10/2020, em : https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en

DA COSTA, Teresa H. M. *et al.* - How much human milk do infants consume? Data from 12 countries using a standardized stable isotope methodology. **Journal of Nutrition**. . ISSN 00223166. 140:12 (2010) 2227–2232. doi: 10.3945/jn.110.123489.

Decreto Presidencial nº 179 de 2 de agosto de 2018. Diário da República n.º 114/2018 – I Série . República de Angola

DEGEN, G. H. *et al.* - Daily uptake of mycotoxins – TDI might not be protective for nursed infants. **Toxicology Letters**. . ISSN 18793169. 277:May (2017) 69–75. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.06.002.

DEGEN, G., MUÑOZ, K., and HENGSTLER, J. - Occurrence of Mycotoxins in Breast Milk. **Handbook of Dietary and Nutritional Aspects of Human Breast Milk** (Zibadi, S., Watson, R. R., and Preedy, V. R., Eds.) pp 813–831, (2013) Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

DUARTE, S. C.; LINO, C. M.; PENA, A. - Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin a: A review of the worldwide status. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440049. 27:10 (2010) 1440–1450. doi: 10.1080/19440049.2010.497166.

DUARTE, Sofia C. *et al.* - Mycotoxins in teas and medicinal plants destined to prepare infusions in Portugal. **Food Control**. . ISSN 09567135. 115:March (2020). doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107290.

DINLEYICI, Meltem *et al.* - Human mature milk zearalenone and deoxynivalenol levels in Turkey. **Neuroendocrinology Letters**. . ISSN 0172780X. 39:4 (2018) 325–330.

EFSA Panel on Contaminantes in the Food Chain- Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. **EFSA Journal**. . ISSN 18314732. 9:6 (2011) 1–124. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2197.

EFSA. International frameworks dealing with human risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. **EFSA Journal** 11, 3313 (2013). [Acedido em 09/10/2020]. Disponível na Internet: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3313>.

EKWOMADU, TI e MWANZA, M. A DECADE OF MYCOTOXINS RESEARCH IN AFRICA: A REVIEW . In: **Mycotoxins: Ocurrence, Toxicology and Management Strategies**. Nova Science Publishers. New York, 2015. ISBN: 978-1-63483-581-7 (eBook). Chapter 9. p169-213.

EUROPEAN COMISSION - Scientific Committee On - Opinion of the Committee on Food on Fusarium toxins. Part 2: Zearalenone (ZEA). **EFSA Journal**. June (2000) 12 pp.

European Food Safety Authority Scientific Committee (EFSA), 2017. EFSA Guidance on the risk assessment of substances present in food intended for infants below 16 weeks of age. **EFSA Journal**. [Acedido em 10/09/2020]. Disponível na Internet <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4849>

EUROPEAN COMISSION - Scientific Committee On - Opinion of the Committee on Food on Fusarium toxins. Part 2: Zearalenone (ZEA). **EFSA Journal**. June (2000) 12 pp.

EZEKIEL, Chibundu N. *et al.* - Comprehensive mycotoxin exposure biomonitoring in breastfed and non-exclusively breastfed Nigerian children. (2020) 1–45. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.28.20115055>

EZEKIEL, Chibundu N. *et al.* - Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: A pilot study using multi-urinary biomarkers. **Environment International**. . ISSN 18736750. 66:(2014) 138–145. doi: 10.1016/j.envint.2014.02.003.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series 47; FAO Food and Nutrition Paper 74.

FAO. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. In H. P. van, H. P. Egmond, & M. A. Jonker (Eds.), Food and nutrition paper 81 (p. 165). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAO/WHO. (2015). General standard for contaminants and toxins in food and feed (CODEX STAN 193-1995). In CODEX ALIMENTARIUS international food standards (p. 59). Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.

FDA, Food and Drug Administration (1979): "Conference on mycotoxins in animal feeds and grains related to animal health. "June, 8, 1979, Rockville, Maryland.

FRIZZELL, Caroline *et al.* - Biotransformation of zearalenone and zearalenols to their major glucuronide metabolites reduces estrogenic activity. **Toxicology in Vitro**. . ISSN 18793177. 29:3 (2015) 575–581. doi: 10.1016/j.tiv.2015.01.006.

FRIZZELL, Caroline. *et al.* - Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. **Toxicology Letters**. . ISSN 03784274. 206:2 (2011) 210–217. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.07.015.

HAGLER Jr., W.M., Towers, N.R., Mirocha, C.J., Eppley, R.M. and Bryden, W.L., (2001). Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? In: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L. and Burgess, L.W. (eds.) *Fusarium*. **American Phytopathological Society Press**, St. Paul, MN, USA, pp. 321–331.

HUANG, L. C. *et al.* - Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 146:(2014) 242–249. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.047.

HUEZA, Isis M. *et al.* - Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. **Toxins**. . ISSN 20726651. 6:3 (2014) 1080–1095. doi: 10.3390/toxins6031080.

IARC - Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. "IARC" 56 (1993) 489–524.

IARC - Mycotoxins and human health. - IARC scientific publications. . ISSN 03005038. 158 (2012) 87–104.

IARC (International Agency for Research on Cancer) A.J.D.G. Christopher, P. Wild, J. David Miller (Eds.), Mycotoxin control in low and middle income countries, International Agency for Research on Cancer (2015), pp. 1–6.

INNIS, Sheila M. - Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. **American Journal of Clinical Nutrition**. . ISSN 00029165. 99:3 (2014) 734–741. doi: 10.3945/ajcn.113.072595.

ISMAIEL, Ahmed A.; PAPENBROCK, Jutta - Mycotoxins: Producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. **Agriculture**. . ISSN 13384376. 5:3 (2015) 493–537. doi: 10.3390/agriculture5030492.

JAMES, Armachius; ZIKANKUBA, Vumilia Lwoga - Mycotoxins contamination in maize alarms food safety in sub-Sahara Africa. **Food Control**. . ISSN 09567135. 90:(2018) 372–381. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.03.018.

JECFA 2001. Evaluation of certain food additives and contaminants: Fifty-fifth report of the JOINT FAO WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

JUAN, Cristina *et al.* - Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. **Food Control**. . ISSN 09567135. 39:1 (2014) 227–236. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.10.036.

KEBEDE, Haftom *et al.* - Current status of major mycotoxins contamination in food and feed in Africa. **Food Control**. . ISSN 09567135. 110:October 2019 (2020) 106975. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106975.

KOWALSKA, Karolina; HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA, Dominika Ewa; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, Agnieszka Wanda - Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. . ISSN 18727077. 48 (2016) 141–149. doi: 10.1016/j.etap.2016.10.015.

LASSI, Zohra S. *et al.* - Impact of infant and young child feeding (lycf) nutrition interventions on breastfeeding practices, growth and mortality in low-and middle-income countries:

Systematic review. **Nutrients**. . ISSN 20726643. 12:3 (2020). doi: 10.3390/nu12030722.

LI, Chenglong *et al.* - High-throughput and sensitive determination of urinary zearalenone and metabolites by UPLC-MS/MS and its application to a human exposure study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. . ISSN 16182650. 410:21 (2018) 5301–5312. doi: 10.1007/s00216-018-1186-4.

LOMBARD, Martani J. - Mycotoxin exposure and infant and young child growth in Africa: what do we know? **Annals of nutrition & metabolism**. . ISSN 14219697. 64:(2014) 42–52. doi: 10.1159/000365126.

LORENZ, Nicole *et al.* - A critical evaluation of health risk assessment of modified mycotoxins with a special focus on zearalenone. **Mycotoxin Research**. . ISSN 18671632. 35:1 (2019) 27–46. doi: 10.1007/s12550-018-0328-z.

MALLY, Angela; SOLFRIZZO, Michele; DEGEN, Gisela H. - Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: current state-of-the art and application to human exposure assessment. **Archives of Toxicology**. . ISSN 14320738. 90:6 (2016) 1281–1292. doi: 10.1007/s00204-016-1704-0.

MANSTRETTA, Valentina; ROSSI, Vittorio - Effects of temperature and moisture on development of *Fusarium graminearum* perithecia in maize stalk residues. **Applied and Environmental Microbiology**. . ISSN 10985336. 82:1 (2016) 184–191. doi: 10.1128/AEM.02436-15.

MARAGOS, C. M. - Zearalenone occurrence and human exposure. **World Mycotoxin Journal**. . ISSN 18750796. 3:4 (2010) 369–383. doi: 10.3920/WMJ2010.1240.

MARTINS, Carla *et al.* - Exposição da população Portuguesa a micotoxinas : o contributo da biomonitorização humana. **Observações Boletim Epidemiológico**. Special Issue 11 (2019) 33–38.

MASSART, Francesco *et al.* - High Growth Rate of Girls with Precocious Puberty Exposed to Estrogenic Mycotoxins. **Journal of Pediatrics**. . ISSN 00223476. 152:5 (2008). doi: 10.1016/j.jpeds.2007.10.020.

MASSART, F.; SAGGESE, G. - Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. **International Journal of Andrology**. . ISSN 01056263. 33:2 (2010) 369–376. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.01009.x.

MASSART, Francesco *et al.* - Zearalenone screening of human breast milk from the Naples

area. **Toxicological and Environmental Chemistry**. . ISSN 10290486. 98:1 (2016) 128–136. doi: 10.1080/02772248.2015.1101112.

MAURO, T. *et al.* - Circulating zearalenone and its metabolites differ in women due to body mass index and food intake. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 116:April (2018) 227–232. doi: 10.1016/j.fct.2018.04.027.

MEIRELLES, Paula Garcia *et al.* - Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. Semina: **Ciências Agrárias**. . ISSN 1676-546X. 27:4 (2006) 613. doi: 10.5433/1679-0359.2006v27n4p613.

MEMIŞ, Esra Yasemin; YALÇIN, Siddika Songül; YALÇIN, Suzan - Mycotoxin carry-over in breast milk and weight of infant in exclusively-breastfed infants. **Archives of Environmental and Occupational Health**. . ISSN 21544700. 0:0 (2020) 1–6. doi: 10.1080/19338244.2020.1828242.

MEUCCI, Valentina *et al.* - Mycoestrogen pollution of Italian infant food. **Journal of Pediatrics**. . ISSN 10976833. 159:2 (2011) 278-283.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.01.028.

METZLER, M.; PFEIFFER, E.; HILDEBRAND, A. A. - Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. **World Mycotoxin Journal**. . ISSN 18750796. 3:4 (2010) 385–401. doi: 10.3920/WMJ2010.1244.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar. BRASIL. Brasília, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Direção- Geral da Saúde – Alimentação Saudável dos 0 aos 6 anos. Linhas de Orientação para profissionais e educadores. PORTUGAL. Lisboa, 2019.

MIROCHA CJ, PATHRE SV and ROBISON TS,. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine-milk. **Food and Cosmetics Toxicology**, 19, (1981)25–30.

MISTURA, Marcelo. Avaliação da incidência de Aflatoxina, Fumonisina e Zearalenona em milho produzido entre 2016 e 2018 nos estados do Paraná, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química. Toledo, Paraná, Brasil, 2019.

MOLINA-MOLINA, José Manuel *et al.* - Assessment of estrogenic and anti-androgenic activities of the mycotoxin zearalenone and its metabolites using in vitro receptor-specific bioassays. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 74:2014) 233–239. doi: 10.1016/j.fct.2014.10.008.

MOUSAVI KHANEGHAH, Amin *et al.* - Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: A systematic review and meta-analysis. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 118:June (2018) 830–848. doi: 10.1016/j.fct.2018.06.037.

MULUNDA, Mwanza *et al.* - Mycotoxins occurrence in selected staple food in main markets from Lubumbashi, Democratic Republic of Congo. **Journal of Food, Agriculture and Environment**. . ISSN 14590263. 11:3–4 (2013) 51–54.

NJUMBE EDIAGE, Emmanuel *et al.* - A direct assessment of mycotoxin biomarkers in human urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 00032670. 741:(2012) 58–69. doi: 10.1016/j.aca.2012.06.038.

NJUMBE EDIAGE, Emmanuel *et al.* - Multimycotoxin analysis in urines to assess infant exposure: A case study in Cameroon. **Environment International**. . ISSN 18736750. 57–58:(2013) 50–59. doi: 10.1016/j.envint.2013.04.002.

OK, Hyun Ee *et al.* - HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 163:2014) 252–257. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.111.

ORTIZ, Johana *et al.* - Multiple mycotoxin exposure of infants and young children via breastfeeding and complementary/weaning foods consumption in Ecuadorian highlands. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 118:June (2018) 541–548. doi: 10.1016/j.fct.2018.06.008.

OSTRY, Vladimir *et al.* - Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**. . ISSN 18671632. 33:1 (2017) 65–73. doi: 10.1007/s12550-016-0265-7.

OUESLATI, S. *et al.* - Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. **Food Control**. . ISSN 09567135. 84:2018) 362–369. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.08.021.

PAIM, Laurinda Maria Rosa Fernando. A Fitossanidade de Cereais armazenados em Angola. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica - Proteção de Plantas. Universidade de Lisboa, 2016. [Acedido em 10/10/2020]. Disponível na Internet: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/12961>

PANZO, Josue Domingos. The incidence of fungi and their mycotoxins in Angolan food and crops with particular reference to maize. University of Johannesburg. 2013. Dissertation for Degree Master Technology. [Acedido em 10/09/2020]. Disponível na Internet :<https://ujcontent.uj.ac.za/vital/access/services/Download/uj:8876/CONTENT1?view=true>

PFEIFFER, Erika *et al.* - Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zearanol in Caco-2 cells in vitro. **Molecular Nutrition and Food Research**. . ISSN 16134125. 55:4 (2011) 560–567. doi: 10.1002/mnfr.201000381.

PFEIFFER, Erika *et al.* - Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. **Molecular Nutrition and Food Research**. . ISSN 16134125. 53:9 (2009) 1123–1133. doi: 10.1002/mnfr.200800584.

RAI, Ankita; DAS, Mukul; TRIPATHI, Anurag - Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 15497852. 60:16 (2020) 2710–2729. doi: 10.1080/10408398.2019.1655388.

RAIOLA, Assunta *et al.* - Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 84:(2015) 169–180. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.023.

Regulamento (CE) N° 1126/2007 da Comissão de 28 de setembro de 2007 . Jornal Oficial da União Europeia. Bruxelas.

RENFREW, Mary J. *et al.* - Assessing levels of contaminants in breast milk: Methodological issues and a framework for future research. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**. . ISSN 02695022. 22:1 (2008) 72–86. doi: 10.1111/j.1365-3016.2007.00893.x.

RIBEIRO, Nuno M. C. *et al.* - Occurrence and risk assessment of zearalenone through bread consumption, typical maize bread from Portugal. **Food Control**. . ISSN 09567135. 57 (2015) 147–151. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.03.043.

RIVERA-NÚÑEZ, Zorimar *et al.* - Urinary mycoestrogens and age and height at menarche in New Jersey girls. *Environmental Health: A Global Access Science Source*. . ISSN 1476069X. 18:1 (2019) 1–8. doi: 10.1186/s12940-019-0464-8.

ROGOWSKA, A. *et al.* - Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. **Toxicon**. . ISSN 18793150. 162:October 2018 (2019) 46–56. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.03.004.

RUBERT, Josep; SOLER, Carla; MAÑES, Jordi - Application of an HPLC-MS/MS method for

mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 133:1 (2012) 176–183. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.035.

RUBERT, Josep *et al.* - Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 18734324. 820 (2014) 39–46. doi: 10.1016/j.aca.2014.02.009.

RUPOLLO, Galileu *et al.* - Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. **Ciência e Agrotecnologia**. . ISSN 1413-7054. 30:1 (2006) 118–125. doi: 10.1590/s1413-70542006000100017.

SAMIEE, Fateme *et al.* - An assessment of the occurrence and nutritional factors associated with aflatoxin M1, ochratoxin A, and zearalenone in the breast milk of nursing mothers in Hamadan, Iran. **Toxicon**. . ISSN 18793150. 187:September (2020) 209–213. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.09.011.

ŠARKANJ, Bojan *et al.* - Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 18734324. 1019:(2018) 84–92. doi: 10.1016/j.aca.2018.02.036.

SENGLING CEBIN COPPA, Carolina Fernanda *et al.* - The occurrence of mycotoxins in breast milk, fruit products and cereal-based infant formula: A review. **Trends in Food Science and Technology**. . ISSN 09242244. 92:August (2019) 81–93. doi: 10.1016/j.tifs.2019.08.014.

SHEPHARD, Gordon S. *et al.* - Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 62:(2013) 217–225. doi: 10.1016/j.fct.2013.08.040.

SIGNORINI, M. L. *et al.* - Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 50:2 (2012) 250–257. doi: 10.1016/j.fct.2011.09.036.

SOLFRIZZO, Michele; GAMBACORTA, Lucia; VISCONTI, Angelo - Assessment of multi-mycotoxin exposure in southern Italy by urinary multi-biomarker determination. **Toxins**. . ISSN 20726651. 6:2 (2014) 523–538. doi: 10.3390/toxins6020523.

SZUETS, P. Mesterhazy, A.; FALKAY, G.Y. and Bartok, T. "Early thelarche symptoms in

children and their relations to zearalenone contamination in feedstuffs." **Cereal Res. Commun.**, 25: (1997) 429–436

TURNER, Nicholas W.; SUBRAHMANYAM, Sreenath; PILETSKY, Sergey A. - Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 00032670. 632:2 (2009) 168–180. doi: 10.1016/j.aca.2008.11.010.

UDOMKUN, Patchimaporn *et al.* - Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: Present situation, socio-economic impact, awareness, and outlook. **Food Control**. . ISSN 09567135. 72:(2017) 110–122. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.039.

UL HASSAN, Zahoor *et al.* - Co-occurrence of mycotoxins in commercial formula milk and cereal-based baby food on the Qatar market. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**. . ISSN 19393229. 11:3 (2018) 191–197. doi: 10.1080/19393210.2018.1437785.

UNICEF. Orçamento Geral do Estado 2018. - Nutrição , Segurança alimentar e Agricultura. (2018). [Acedido em 12/12/2020]. Disponível na Internet: <https://www.unicef.org/angola/relatorios/nutri%C3%A7%C3%A3o-seguran%C3%A7a-alimentar-e-agricultura-no-or%C3%A7amento-geral-do-estado-2018>

URRY, W.H.; Wehrmeister, H.L.; Bodge, E.B. and Hidy, P.H. (1966):"The structure of zearalenone." *Tetrahedron Lett.*, 27: 3109–3114. Vanyi,

VÄLIMAA, Anna Liisa *et al.* - A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk. **Journal of Microbiological Methods**. . ISSN 01677012. 80:1 (2010) 44–48. doi: 10.1016/j.mimet.2009.10.017.

VALITUTTI, Francesco *et al.* - Assessment of mycotoxin exposure in breastfeeding mothers with celiac disease. **Nutrients**. . ISSN 20726643. 10:3 (2018) 1–9. doi: 10.3390/nu10030336.

WARTH, Benedikt *et al.* - Biomonitoring of Mycotoxins in Human Breast Milk: Current State and Future Perspectives. **Chemical Research in Toxicology**. . ISSN 15205010. 29:7 (2016) 1087–1097. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00125.

WARTH, Benedikt *et al.* - New insights into the human metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. **Toxicology Letters**. . ISSN 03784274. 220:1 (2013) 88–94. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.04.012.

WARTH, Benedikt *et al.* - Transfer and metabolism of the xenoestrogen zearalenone in human perfused placenta. **Environmental Health Perspectives**. . ISSN 15529924. 127:10 (2019) 1–10. doi: 10.1289/EHP4860.

Wheather Spark. [Acedido em 10/10/2020]. Disponível na Internet: <https://pt.weatherspark.com/y/71668/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Cabinda-Angola-durante-o-ano>

WHO - Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analyses. (2007) 1–52.

WHO - Global strategy for infant and young child feeding. Fifty-fourth world health assembly. 1 (2001) 5.

WHO – Infant and Young Child Feeding (2020). [Acedido em 10/10/2020]. Disponível na Internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding> .

WHO, BUTTE, Nf; LOPEZ-ALARACON, Mg; GARZA, C. - Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life. World Health Organization. (2002) 47. doi: ISBN 92 4 156211 0.

YEUNG, Cindy H. T. *et al.* - Quantifying breast milk intake by term and preterm infants for input into paediatric physiologically based pharmacokinetic models. **Maternal and Child Nutrition**. . ISSN 17408709. 16:2 (2020) 1–33. doi: 10.1111/mcn.12938.

ZHANG, Kai *et al.* - Mycotoxins in infant/toddler foods and breakfast cereals in the US retail market. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**. . ISSN 19393229. 11:3 (2018) 183–190. doi: 10.1080/19393210.2018.1451397.

ZHENG, Wanglong *et al.* - Zearalenone promotes cell proliferation or causes cell death? **Toxins**. . ISSN 20726651. 10:5 (2018). doi: 10.3390/toxins10050184.

ZINEDINE, Abdellah *et al.* - Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 45:1 (2007) 1–18. doi: 10.1016/j.fct.2006.07.030.

ANEXOS

ANEXO I



CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO INTITULADO

“BIOMONITORIZAÇÃO DE MICOTOXINAS E OUTROS CONTAMINANTES EM LEITE MATERNO”

DE ACORDO COM A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE¹, A DECLARAÇÃO DE HELSÍNQUIA² E A CONVENÇÃO DE OVIEDO³

Investigador Principal: Professora Doutora Angelina Pena

Organização do I.P.: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

NOTA PRÉVIA: Leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claramente explicado, solicite mais informações ao investigador presente. Antes de decidir, poderá falar com qualquer pessoa com a qual se sinta confortável. Se concordar com a proposta que lhe é apresentada, valide o presente documento assinando o Termo de Consentimento.

PARTE I: PÁGINA DAS INFORMAÇÕES

Introdução

O presente estudo é conduzido pelo LAQV-REQUIMTE, Laboratório de Bromatologia e Farmacognosia, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e pelo Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG)/ Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), no âmbito da investigação na biomonitorização de pesticidas, bisfenóis, poluentes, micotoxinas e outros contaminantes nas populações.

O grau de exposição a alguns contaminantes, de origem natural (como as micotoxinas) ou artificial (como os agroquímicos) de um grupo da população vulnerável como as lactentes e crianças lactantes não é atualmente conhecido, não sendo por isso possível relacioná-los com outros fatores de saúde ou doença.

Objetivos

O objetivo do presente projeto é analisar amostras de leite materno e quantificar a eventual presença de contaminantes de origem natural e artificial, que refletem a exposição a estes contaminantes por parte de lactentes.

Tipo de intervenção

Recolha autónoma e voluntária de leite materno e preenchimento de um questionário.

Seleção de participantes

As participantes incluídas no estudo devem cumprir os seguintes critérios: terem mais de 18 anos (inclusive); parto à pelo menos um mês (para evitar análise de colostro ou leite de transição); em aleitamento; sem registo de doença sistémica ou mamária.

Procedimento

A recolha do leite é realizada conforme o procedimento descrito pelo Profissional de Saúde ou membro da Equipa de Investigação, antes ou após a alimentação do bebé. Após a recolha, a amostra é refrigerada e entregue pela participante até 24 horas após a colheita, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e na Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG). No dia de recolha da amostra de leite é também preenchido o questionário, composto por 3 partes: I. Dados antropométricos e características individuais; II. Dados sociodemográficos e III. Dados relativos à

alimentação. O questionário demora cerca de 10 minutos a preencher.

Condições de Participação

A participação no presente estudo é voluntária e facultativa. A qualquer momento a participante poderá abandonar o estudo, sem qualquer prejuízo.

Benefícios

Não existirá nenhum benefício imediato e direto para o participante, sob a forma de pagamento ou de outras contrapartidas.

Confidencialidade e partilha dos resultados de investigação

A confidencialidade das participantes é garantida ao abrigo da Lei 58/2019, de 8 de agosto, relativo à proteção das pessoas singulares:

- O questionário e a amostra serão identificadas por um código, com um número correspondente, que não será do conhecimento de ninguém, para além da equipa de investigação.

- Será garantida a confidencialidade e anonimato no tratamento dos dados, assegurando que nunca será tornada pública a identificação das participantes em nenhum momento da investigação ou em nenhuma publicação que eventualmente se venha a produzir.

Os dados e amostras recolhidos servirão para a elaboração deste trabalho científico, sem prejuízo de poderem vir a ser incluídos em estudos retrospectivos e prospetivos relacionados com o tema. No final dos estudos, serão partilhados os resultados com as participantes (informação individual) e a comunidade científica (informação coletiva, sem identificação das participantes).

Quem contactar

Em caso de alguma dúvida ou questão adicional, em qualquer momento do desenvolvimento do estudo, deverá ser contactada a Professora Doutora Angelina Pena, através do e-mail apena@ci.uc.pt ou telefone 239 488 400.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Escola Universitária Vasco da Gama (CEBEA-EUVG), em 29 de Novembro de 2019.

¹ http://www.who.int/rpc/research_ethics/informed_consent/en/

² Declaração de Helsínquia <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

³ Convenção de Oviedo <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/235127/details/maximized>

PARTE II: TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que:

Fui questionada sobre a possibilidade de participação no estudo de biomonitorização de agroquímicos e micotoxinas em leite materno.

Li a informação anterior ou a informação anterior foi-me lida.

Tive a oportunidade de colocar questões e, se eventualmente coloquei questões, foram respondidas satisfatoriamente.

Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências.

Recebi o material necessário para a recolha da amostra de leite: saco estéril de conservação com etiqueta de identificação.

Tomei conhecimento do(s) procedimento(s) a adotar antes, durante e após a recolha do leite, bem como da pessoa e local onde devo entregar a amostra de leite.

Assim, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos dados e amostras que, de forma voluntária, forneço, confiando que apenas serão utilizados para os fins indicados e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pela equipa de investigação.

Nome (legível) da participante: _____

Assinatura da participante: _____

Data: ____/____/20__

Se participante legal iletrada:

(será assinado por uma testemunha, letrada, selecionada pela participante e sem relação com a equipa de investigação)

Eu testemunhei a leitura exata do formulário de consentimento à potencial participante, a qual teve oportunidade de colocar questões. Eu confirmo que a mesma concedeu o consentimento livremente.

Nome (legível) da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: ____/____/20__

Declaração do investigador/ colaborador da investigação que obteve consentimento

Eu li de forma exata a página de informações ao potencial participante ou seu tutor legal, e que todas as questões colocadas foram respondidas corretamente. Eu confirmo que o consentimento foi cedido livre e voluntariamente.

Uma cópia deste Formulário de Consentimento foi entregue ao participante ou seu tutor legal.

Nome (legível) do investigador/ colaborador da investigação que obteve consentimento:

Assinatura do investigador/ colaborador da investigação: _____

Data: ____/____/20__

A preencher conforme questionário correspondente:

Nome (próprio) da participante: _____

Código interno: _____

ANEXO II



Questionário para participantes no estudo intitulado

“BIOMONITORIZAÇÃO DE MICOTOXINAS E OUTROS CONTAMINANTES EM LEITE MATERNO”

Nome (próprio) da participante: _____	Recolha de leite materno: Data: ___/___/20__ Hora: __h__
Código interno: _____	

O questionário é composto por 3 partes e o tempo para o seu preenchimento é de cerca de 10 minutos.

Por favor, responda às questões de uma forma sincera e de acordo com as instruções fornecidas.

É antecipadamente agradecido o seu interesse e disponibilidade em participar.

I. DADOS ANTROPOMÉTRICOS E CARACTERÍSTICAS INDIVIDUAIS DA MÃE E BÉBE

Idade: _____ anos

Número de filhos: _____

Data do (último) parto: ___/___/___

Peso do bebé (aquando da recolha de leite): _____ kg

Medicação na última semana: Não Sim: qual: _____

Fumadora activa/passiva: Não Sim

II. DADOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS DA MÃE

ESCOLARIDADE: *(Assinalar o último ano/nível de escolaridade)*

Ensino Primário/Básico

Ensino Secundário (≤12º ano)

Ensino Superior (Bacharelato/Licenciatura)
Doutoramento

Mestrado/

PROFISSÃO: _____

RESIDÊNCIA: Localidade: _____ Concelho: _____ Distrito: _____

Distância da residência à **indústria/ zona industrial** mais próxima:

≤100m 500m ≥1km

Distância da residência ao **campo agrícola** (cultivado) mais próximo:

≤100m 500m ≥1km

Distância da residência à **autoestrada/via rápida** mais próxima:

≤100m 500m ≥1km

Utilização de agroquímicos (*quando aplicável*):

Não Sim

Se sim, no: Jardim Quintal/ horta

Se sim, os seguintes agroquímicos:

Pesticidas Fungicidas Herbicidas

Outros, quais: _____

III. DADOS RELATIVOS À ALIMENTAÇÃO

Responder com base na sua alimentação nos **últimos sete (7) dias**:

ORIGEM dos alimentos consumidos:

<25% 50% 75% 100% Caseiro/ Produtores locais

<25% 50% 75% 100% Superfícies comerciais/ Supermercado

LOCAL:

Casa: _____ número/ semana

Restauração/ Cantinas escolares: _____ número/ semana

QUESTIONÁRIO ALIMENTAR:

Este questionário tem como objectivo avaliar uma potencial correlação entre o consumo de determinados alimentos e os níveis de agroquímicos e micotoxinas presentes no leite materno.

Procure responder às questões de uma forma sincera, indicando aquilo que realmente comeu e não o que pensa que seria correcto comer.

O questionário pretende identificar o consumo de alimentos da última semana, i.e. dos últimos sete dias previamente à recolha de leite. Assim para cada alimento, deve assinalar, preenchendo com um X a respectiva opção, quantas vezes por semana, comeu, em média, cada um dos alimentos referidos nesta lista, ao longo da última semana (sete dias). Não se esqueça de assinalar, na opção respectiva, os alimentos que nunca come, ou come menos de 1 vez por semana.

Não se esqueça de ter em conta as vezes que o alimento é consumido sozinho e aquelas em que é adicionado a outros alimentos ou pratos (exemplo: os ovos das omeletas, etc.).

Nos **últimos sete (7) dias** qual foi a **frequência** e a **quantidade** consumida de (assinale com X):

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
LACTICÍNIOS	LEITE (1 chávena = 250 ml)								
	IOGURTE (Um = 125 g)								
	QUEIJO (Uma fatia=30g)								
	GELADO (Um ou 2 bolas)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
PÃO E CEREAIS	PÃO BRANCO OU TOSTAS (1-2 UNIDADES)								
	PÃO (OU TOSTAS) INTEGRAL OU OUTROS (1-2 UNIDADES)								
	BROA (1 fatia = 80 g)								
	FLOCOS DE CEREAIS (1 chávena sem leite)								
	ARROZ e MASSAS (½ prato)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
DOCES	BOLACHAS (3 unidades)								
	CHOCOLATE E DERIVADOS (3 quadrados; 1 colher de sobremesa)								

Grupo	Porção média (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
FRUTOS SECOS	½ chávena (descascados)								

ANEXO III

Questionário Alimentar

AFM1 - _____

DECLARAÇÃO

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

Coimbra, de de 2016

Assinatura:

I

Questionário Alimentar

Este questionário tem como objectivo avaliar uma potencial correlação entre o consumo de determinados alimentos, normalmente associados à presença de **Aflatoxina B1**, e o teor 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)

II

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 (1copo)								
Leite (1copo)								
Iogurte (1emb)								
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 unid)								

Mycotoxins



Application Note

RIDASCREEN® Zearalenon (Art. No. R1401) Milk

Procedure

1. centrifuge milk: 15 min / approx. 3,000 g / preferably in refrigerated centrifuge or cool samples prior to centrifugation
2. the upper cream layer is removed by absorbing through a pasteur pipette
3. add 20 µl of glucuronidase / arylsulphatase Helix pomatia (Merck, Art. No.: 4114) to 1.0 ml sample and incubate the solution for 3 h at 37 °C
4. add 0.1 ml of methanol to 0.9 ml of hydrolyzed and defatted milk and use 50 µl of the resulting solution per well in the assay

Dilution factor	1.1
Detection limit	approx. 60 ppt

Remark

Standards must be prepared in skim milk containing 10 % methanol.

Prepare standards according to the following scheme:

- dissolve 1 g of skim milk powder in 8 ml distilled water + 1 ml methanol (100 %) by stirring
- add 100 µl of zearalenon standard solution (40.5 ng/ml) to 900 µl of this skim milk-methanol-mixture, which results in milk standard 6 (4050 ppt)
- take 200 µl of this milk standard 6 and dilute with 400 µl of skim milk-methanol-mixture, which results in milk standard 5 (1350 ppt)
- continue diluting milk standard 5 in the same way to obtain milk standards 4 (450 ppt), dilute standard 4 to obtain standard 3 (150 ppt) and dilute standard 3 to obtain standard 2 (50 ppt)
- pure skim milk-methanol-mixture is used as milk standard 1 (0 ppt)

Prepare both skim milk-methanol-mixture and standards freshly each test day!

Storage of samples:

Sample extracts can be stored at 2-8 °C for 2 days.

08-01-24

R-Biopharm AG
Landwehrstraße 54, 64293 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 8102-0 / Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
E-mail: info@r-biopharm.de / www.r-biopharm.com



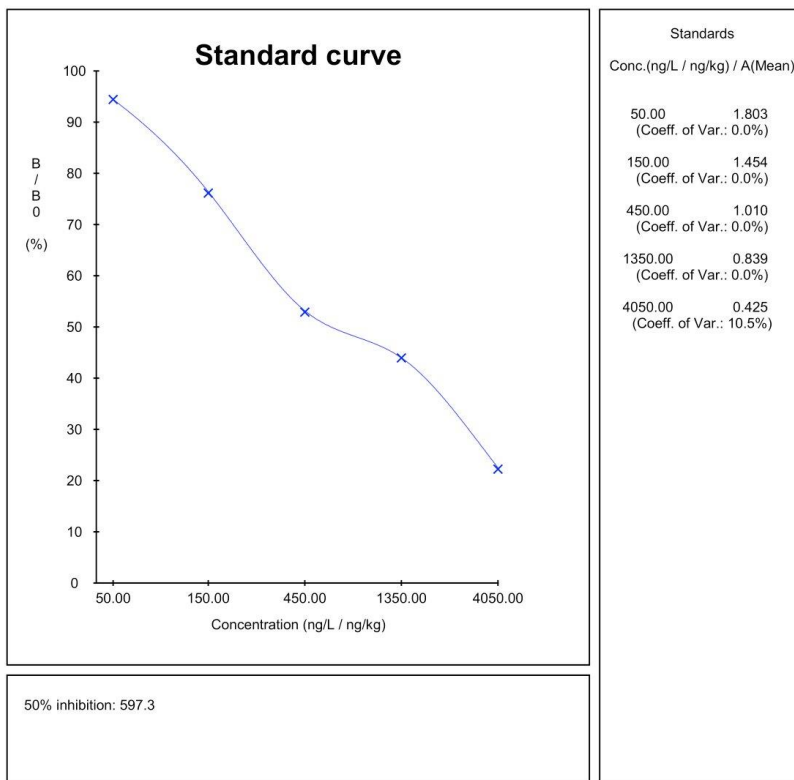
ANEXO V

Zearalenon

25. Feb. 2020, 17:48:52, Spline, Ser.No: 123, Version: 1.106.0.0240

Plate Values

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.067E	0.808E	1.371E	1.315E	1.235E	1.128E	1.282E	1.194E	1.071E	1.425E	1.163E	1.809E
B	2.140E	0.869E	1.436E	1.191E	1.127E	1.244E	1.306E	1.302E	0.993E	1.375E	1.040E	1.797E
C	2.067E	0.456E	1.010E	1.230E	1.135E	1.397E	1.144E	0.949E	1.198E	0.933E	1.360E	1.422E
D	2.031E	0.393E	1.034E	1.236E	1.061E	1.120E	1.068E	0.995E	1.074E	0.854E	1.314E	1.515E
E	1.512E	1.045E	0.953E	0.967E	1.079E	1.358E	1.287E	1.118E	0.994E	1.679E	0.898E	1.003E
F	1.486E	1.220E	1.111E	1.248E	0.896E	1.329E	1.188E	1.159E	1.091E	1.782E	1.041E	0.970E
G	1.146E	1.274E	1.112E	1.313E	0.871E	1.198E	1.306E	0.945E	1.410E	1.614E	1.765E	0.616E
H	1.017E	1.065E	1.122E	1.254E	0.802E	1.136E	1.171E	1.010E	1.491E	1.432E	1.668E	0.563E



C:\Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins\ZEA leite materno angola fev2020 (método c escolha de 2 padroes).met,
C:\Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins\ZEA leite materno angola fev2020 (dados c escolha de 2 padroes).mes

Zearalenon
25. Feb. 2020, 17:48:52, Spline, Ser.No: 123, Version: 1.106.0.0240

Ser. No.	Concentration ng/L / ng/kg	Absorbance		Standards		calculated ng/L / ng/kg	Deviation (%)
		(Mean)	(CV)	B/B0 (%)			
1	0.00	1.910E	12.0	100.0			
2	50.00	1.803E	0.0	94.4	50.03	0.1	
3	150.00	1.454E	0.0	76.1	149.66	0.2	
4	450.00	1.010E	0.0	52.9	453.21	0.7	
5	1350.00	0.839E	0.0	43.9	1340.36	0.7	
6	4050.00	0.425E	10.5	22.3	4055.81	0.1	

Ser. No.	ID	Absorbance			Samples		* =	ng/L / ng/kg
		(Mean)	(CV)	(%)	calculated ng/L / ng/kg			
1	1	1.132E	10.9	59.3	314.24	1.10	345.66	
2	2	1.170E	12.6	61.3	286.24	1.10	314.86	
3	3	1.404E	3.3	73.5	168.38	1.10	185.22	
4	5	1.022E	1.7	53.5	433.29	1.10	476.62	
5	6	1.032E	10.8	54.0	418.40	1.10	460.24	
6	7	1.117E	0.6	58.5	326.54	1.10	359.19	
7	8	1.253E	7.0	65.6	236.32	1.10	259.95	
8	9	1.233E	0.3	64.6	247.24	1.10	271.97	
9	10	1.107E	17.9	58.0	335.22	1.10	368.74	
10	11	1.284E	3.2	67.2	220.48	1.10	242.52	
11	12	1.181E	6.5	61.8	278.84	1.10	306.73	
12	14	1.098E	4.8	57.5	343.39	1.10	377.72	
13	15	0.988E	13.1	51.7	497.84	1.10	547.62	
14	16	0.837E	5.8	43.8	1352.14	1.10	1487.36	
15	17	1.186E	6.9	62.1	275.57	1.10	303.13	
16	18	1.259E	15.6	65.9	233.15	1.10	256.47	
17	19	1.344E	1.5	70.4	192.89	1.10	212.17	
18	20	1.167E	3.8	61.1	288.31	1.10	317.14	

C:\Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins\ZEA leite materno angola fev2020 (método c escolha de 2 padroes).met,
C:\Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins\ZEA leite materno angola fev2020 (dados c escolha de 2 padroes).mes

Zearalenon
25. Feb. 2020, 17:48:52, Spline, Ser.No: 123, Version: 1.106.0.0240

Ser. No.	ID	Absorbance			Samples		ng/L / ng/kg
		(Mean)	(CV)	(%)	calculated	*	
19	A	1.294E	1.3	67.7	215.62	1.10	237.18
20	B	1.106E	4.9	57.9	336.11	1.10	369.72
21	C	1.237E	5.7	64.8	245.01	1.10	269.51
22	D	1.239E	7.7	64.9	243.90	1.10	268.29
23	E	1.248E	6.1	65.3	238.99	1.10	262.89
24	F	0.972E	3.3	50.9	539.70	1.10	593.67
25	G	1.139E	2.5	59.6	308.76	1.10	339.64
26	H	0.978E	4.7	51.2	522.84	1.10	575.12
27	I	1.032E	5.3	54.0	418.40	1.10	460.24
28	J	1.136E	7.7	59.5	311.09	1.10	342.20
29	L	1.043E	6.6	54.6	403.43	1.10	443.78
30	M	1.450E	4.0	75.9	151.11	1.10	166.23
31	N	1.400E	2.5	73.3	169.94	1.10	186.93
32	O	0.893E	6.3	46.8	979.88	1.10	1077.87
33	P	1.731E	4.2	90.6	65.92	1.10	72.51
34	Q	1.523E	8.4	79.7	125.66	1.10	138.22
35	R	1.102E	7.9	57.7	339.71	1.10	373.68
36	S	1.337E	2.4	70.0	195.93	1.10	215.52
37	T	0.970E	10.4	50.8	545.68	1.10	600.24

C:\Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins\ZEA leite materno angola fev2020 (método c escolha de 2 padroes).met,
C:\Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins\ZEA leite materno angola fev2020 (dados c escolha de 2 padroes).mes

