



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marta Ester Kudeia Gimbi

BIOMONITORIZAÇÃO DE OCRATOXINA A EM LEITE
MATERNO: AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS LACTENTES

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

Setembro de 2019

Marta Ester Kudeia Gimbi

**BIOMONITORIZAÇÃO DE OCRATOXINA A EM LEITE
MATERNO: AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS LACTENTES.**

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

Setembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar começo por agradecer a Deus pai todo-poderoso, pelo folego de vida e por permitir que esse sonho fosse concretizado.

Ao Instituto Nacional de Gestão de Bolsas de Estudos (INAGBE) pela atribuição da bolsa de estudo para frequentar o presente mestrado na Universidade de Coimbra em Portugal, oportunidade esta que se revelou de capital importância.

A minha família que apesar da distância, em especial o meu esposo e aos meus filhos, pela paciência, pois foram a minha maior motivação para concluir o mestrado.

Aos meus pais Francisco Gimbi e Carlota Kudeia pelo apoio e incentivos ao longo dessa jornada de dois anos.

Aos meus irmãos, fonte de amor, alegria e motivação pelo apoio em todo meu percurso académico e proporcionaram a realização do mesmo.

Faço um agradecimento especial à Professora Doutora Angelina Pena, Coordenadora do Mestrado em Segurança Alimentar, por ter aceitado o convite para orientar esta dissertação e assumido com profissionalismo, apoio, carinho, incentivo nos momentos difíceis, onde sempre me incentivou a buscar alternativas para as dificuldades, e que não foram poucas.

De igual forma, agradeço ao Professor Doutor Fernando Ramos, pela força e coragem.

Devo, ainda, agradecer:

À Professora Doutora Sofia Cancela Duarte que se disponibilizou para co-orientar este trabalho e que apoiou desde o princípio, sou grata pela sua contribuição nessa fase da minha formação, e aos restantes professores deste curso, pelos ensinamentos recebidos.

Quero agradecer também os meus/as amigos/as, colegas pelo apoio, carinho e por me encorajarem a construir um destino melhor.

Quero também agradecer ao Colega e amigo Almerindo Adriano Chiquete, pelas contribuições, comentários valiosos e sugestões muito úteis e práticas.

Uma palavra de gratidão para todas as lactantes que com a sua participação tornaram possível a realização deste trabalho.

Desde já, o meu muito obrigado a todos que direta ou indiretamente, de algum modo estiveram envolvidas durante a realização dessa caminhada.

Obrigada.

RESUMO

Atualmente, o leite humano é considerado essencial para o crescimento e a saúde normais do bebê, de preferência como a única fonte de alimento durante os primeiros seis meses de vida. No entanto, através do leite materno podem ser veiculados diferentes contaminantes alimentares e ambientais que podem levar a uma exposição toxicologicamente relevante dos bebês amamentados. Estes são considerados uma população particularmente vulnerável devido, em parte, à fisiologia, uma dieta bastante restrita e um maior consumo relativamente ao peso corporal. A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina com efeitos nefrotóxicos reconhecidos, além de atuar como uma toxina hepática, um supressor imunológico, um agente possivelmente carcinogénico em humano (grupo 2B da IARC). Estudos anteriores de biomonitorização em relação à População Portuguesa em geral confirmaram que a exposição à OTA existe e é generalizada.

Pelo que antecede, foram recolhidas 42 amostras (de conveniência) de leite materno, juntamente com um termo de consentimento informado por escrito, um questionário sociodemográfico e um questionário alimentar (semiquantitativo). A recolha de amostras de leite considerou as orientações e os critérios de inclusão e exclusão descritos em estudos anteriores. A determinação da OTA foi realizada através de ELISA competitivo e a avaliação do risco foi efectuada através de método determinístico.

Os resultados mostraram uma contaminação generalizada, com 41 (97,6 %) das 42 amostras acima do limite de detecção (50 ng/L), variando de 59 a 560 ng/L, com nível médio de 305 ± 114 ng/L. A ocorrência e os níveis de OTA determinados nas amostras de leite materno analisadas foram superiores aos relatados recentemente, como por exemplo na Nigéria e no Chile. A amostra de leite materno com maior teor de OTA foi proveniente de uma mãe com elevado consumo de pão e café, enquanto a amostra com menor valor foi proveniente de uma mãe que nunca consumiu frutas secas. A exposição estimada dos recém-nascidos através do consumo de leite foi de 41,8 ng/kg p.c./dia, para bebês com menos de 7 kg e 37,8 ng/kg p.c./dia, para bebês com peso corporal de pelo menos 7 kg. Considerando a ingestão diária tolerável ajustada para bebês com menos de 16 semanas, recentemente proposta pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, observou-se que a percentagem da ingestão diária tolerável corresponde a 720,7 %. Desta forma, os resultados do presente estudo apontam a necessidade de reforçar os programas nacionais de vigilância e monitorização de estudos sobre a OTA, em particular, bem como conceber medidas

profiláticas e de controlo para diminuir a presença de OTA no leite humano e a resultante exposição de recém-nascidos em lactação.

Palavras-chave: leite materno; ocratoxina A; micotoxina; alimentos; exposição; recém-nascidos

ABSTRACT

Human milk is currently deemed essential for normal infant growth and health, preferably as the only source of food during the first six months of life. Nevertheless, maternal milk can be a source of different food and environmental contaminants that can lead to toxicologically relevant exposure of the breastfed infants. These are considered a particularly vulnerable population due, in part, to physiology, a fairly restricted diet and a higher consumption relative to body weight. Ochratoxin A (OTA), is a mycotoxin with recognized primary nephrotoxic effects besides acting as a liver toxin, a possibly carcinogenic agent in human (IARC group 2B). Previous biomonitoring surveys regarding the general Portuguese population confirmed that OTA exposure exists and is widespread. Given the above, 42 breast milk (convenience) samples were collected, along with a written informed consent, a socio-demographic and a (semi-quantitative) food questionnaire. Milk sample collection considered the guidelines and the inclusion and exclusion criteria as previously described. Determination of OTA was carried out through a competitive ELISA and risk assessment followed a deterministic method. Results showed a widespread contamination, with 41 (97.6 %) of the 42 samples above the detection limit (50 ng/L), ranging from 59 to 560 ng/L, with an average level of 305 ± 114 ng/L. The OTA occurrence and levels determined in the analysed maternal milk samples were higher than the ones recently reported, as for instance in Nigeria and Chile. The breast milk sample with the highest OTA level was from a mother that reported a high consumption of both bread and coffee, whereas the sample with the lowest value was from a mother that never consumed dried fruits. The estimated exposure of the newborns through milk consumption was 41.8 ng/kg b.w./day, for babies with less than 7 kg and 37.8 ng/kg b.w./day, for babies with a body weight of at least 7 kg. Considering the adjusted tolerable daily intake for babies with less than 16 weeks recently proposed by European Food Safety Authority, it was observed that the percentage of the tolerable daily intake corresponds to 720.7 %. Thus the findings of the present study point out the need to reinforce national surveillance programs and monitoring studies regarding this mycotoxin in particular, as well as devise prophylactic and control measures to decrease OTA presence in human breast milk and the resulting exposure of lactating newborns.

Keywords: breast milk; ochratoxin A; mycotoxin; food; exposure; newborns

COMUNICAÇÕES

No âmbito dos trabalhos conducentes à presente dissertação, foram apresentados os resultados preliminares, em comunicação oral:

Marta Gimbi, Sofia Duarte, Anabela Almeida, Liliana J. G. Silva, André Pereira, Celeste Lino, Angelina Pena. Human Breastmilk Biomonitoring: A Study To Assess Exposure Of Nursing Infants To Ochratoxin A. 41st Mycotoxin Workshop, 5-8 de Maio de 2019, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Portugal.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fungos produtores de micotoxinas (adaptado de Soares <i>et al.</i> , 2013).....	7
Figura 2. Estrutura química básica das ocratoxinas (adaptado de Almela <i>et al.</i> , 2007).....	10
Figura 3. Metabolismo da OTA (adaptado de Abreu, 2011).....	15
Figura 4. O consumo de alimentos como principal via de exposição humana directa e indirecta à OTA (adaptado de Ribeiro, 2007).....	18

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Propriedades químicas da ocratoxina A.....	11
Tabela II. Características socio-demográficas das mães participantes no estudo.....	28
Tabela III. Dados de estudos prévios de determinação de OTA em leite materno.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

10-OH-OTA - 10-hidroxi-ocratoxina A

4-OH OTA - 4-hidroxi-ocratoxina A

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AFs - Aflatoxinas

ATP - Adenosina Tri-Fosfato

aw - Water activity (Atividade de água)

BCRP - Proteína de resistência ao câncer de mama

bw - Body weigh

CE - Comissão Europeia

CE - Critério de exclusão

CI - Critério de inclusão

DL50 - Dose Letal 50

DON - Desoxivalenol

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

ELISA - Ensaio imunoenzimático

ELL - Extração líquida-líquida

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

FD-HPCL - Cromatografia líquida de alta pressão acoplada e detector de fluorescência
g/l - Gramas/litros

HPLC-FLD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência

IAC - Coluna de imunoafinidade

IAC - Coluna de imunoafinidade

IARC - International Agency for Research of Cancer (Agência Internacional de Pesquisa em Cancro)

IARC - Agencia internacional de investigação do cancro

HPLC - Cromatografia Líquida de alta resolução

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO / OMS)

LLE-HPCL-FD - Extração líquido-líquido e Cromatografia líquida acoplada à detecção de fluorescência

LM - Leite materno

LOAEL - Lowest Observed Adverse Effect Level (Nível mais baixo de efeito adverso observado)

LOD - Limites de detecção

LOQ - Limites de quantificação

mL - Mililitros

ng - Nanograma

ng/kg p.c./dia – Nanograma por quilograma de peso corporal por dia

ng/L- Nanograma por litro

ng/ml- Nanograma por mililitro

OMS - Organização Mundial da Saúde

OT β - Ocratoxina β

OTA - Ocratoxina A

OTB - Ocratoxina B

OTC - Ocratoxina C

p.c - peso corporal

pH - Potencial hidrogénico

QFA - questionários de frequência alimentar

QuEChERS - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro)

RASFF - The Rapid Alert System for Food and Feed (Sistema de alerta rápido para alimentos e rações)

RNA - Ácido ribonucleico

SI - Sem informação

SNC - Sistema nervoso central

TDI - Ingestão diária tolerável

TLC - Chromatografia analítica de camada fina

UE - União Europeia

UV - Luz ultravioleta

WHO - World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

ZEA - Zearalenona

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
COMUNICAÇÕES	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
ÍNDICE	1
PARTE A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Aleitamento materno	4
1.1. Composição do Leite Materno	6
1.2. Possibilidade de transferência de contaminantes	6
2. Micotoxinas	7
3. Ocratoxina A	9
3.1. Caracterização da família das Ocratoxinas	10
3.2. Fungos produtores	13
3.3. Toxicocinética	14
3.4. Toxicidade	17
3.5. Vias de exposição e ocorrência	19
3.6. Avaliação da exposição e Biomonitorização	20
3.7. Métodos Analíticos Aplicados na biomonitorização	22
3.8. Limites e Legislação	23
1. Justificação e objetivos do estudo	26
2. Material e Métodos	27
2.1. Amostragem	27
2.2. Dados socio-demográficos	27
2.3. Determinação analítica	28
2.4. Avaliação de risco	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

4. CONCLUSÕES	35
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36
ANEXO I	52
ANEXO II	54

PARTE A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. Aleitamento materno

O leite materno (LM) é o alimento mais seguro, eficaz, completo, e adequado da criança até o sexto mês de vida após o nascimento (Santiago *et al.*, 2003). É a fonte principal de nutrientes para o crescimento, desenvolvimento da criança e também possui grande importância em todas as fases da vida do ser humano, por conter elementos indispensáveis em mistura com água, nomeadamente enzimas, sais minerais, vitaminas, lactose, oligossacarídeos, caseína, anticorpos, hormonas, pigmentos, azoto, dióxido de carbono e oxigénio (Barros, 2014; Navas, 2003). O aleitamento materno é por isso necessário para o crescimento, desenvolvimento, sobrevivência de bebés e sempre foi a prática de alimentação ideal que atende às necessidades fisiológicas e psicológicas do bebé (Memis *et al.*, 2019). É um alimento completo e natural, adequado para quase todos os recém-nascidos, salvo raras exceções. Desta forma, a amamentação deve ser apoiada, protegida e promovida uma vez que o leite possui componentes imunológicos que o tornam inimitável e único (Cunha, 2009). Acresce que está sempre disponível, com a temperatura ideal, pronto para ser consumido (Santos *et al.*, 2006).

Após o parto aparece o colostro, também chamado primeiro leite, que é mais grosso e amarelado do que o leite maduro, muito rico em proteínas indispensáveis para um crescimento mais rápido do bebé, sobretudo a Imunoglobulina A secretora e outras classes de anticorpos especialmente importantes na proteção do bebé contra infeções (Levy, 2011). Segundo Mathieu (2019) a IgM e IgG são importantes porque desempenham um papel fundamental na defesa da mucosa intestinal da criança. A IgG pode ligar-se aos vírus e evitar a adesão dos agentes patogénicos à superfície da mucosa. A IgM têm sido identificada no intestino das crianças, contudo o papel desta classe na defesa imunitária, na mucosa infantil. O colostro é ainda muito rico em fatores de crescimento que estimulam o desenvolvimento do intestino imaturo do bebé. Depois da produção de colostro, segue-se o leite de transição, após três a cinco dias de vida do bebé, promovendo a habituação a um menor conteúdo em proteínas e maior quantidade de açúcares, sendo mais claro e menos denso do que o colostro. Finalmente, ao fim de duas semanas de vida, surge o leite maduro, mais calórico que o colostro, parecendo mais aguado e por vezes transparente (Levy, 2011; Romão *et al.*, 2017).

Para uma amamentação prolongada, segura e ideal é recomendado, de forma praticamente unânime entre médicos pediatras, em que a forma correta do aleitamento materno exclusivo, ou seja não adicionar qualquer outro alimento até aos primeiros seis meses de vida (Levy *et al.*, 2012) com exceção de suplementos vitamínicos, minerais ou

eventualmente fármacos. O aleitamento será predominante se, além do leite materno, o lactente receber outros líquidos não lácteos, tais como água e chás sem conteúdo energético. O aleitamento será misto se, além do leite materno, o lactente receber uma fórmula infantil e será parcial se o aleitamento materno for acompanhado de alimentação complementar (Marques *et al.*, 2011; Nardo *et al.*, 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o aleitamento materno em exclusivo nos primeiros seis meses de vida e a manutenção, se possível, pelo menos até aos dois anos de vida (Dehghan *et al.*, 2014). O aleitamento materno exclusivo é desta forma a prática ideal na alimentação de crianças (Levy, 2011), promovendo benefícios para as crianças e as respectivas mães, desenvolvendo os respectivos laços afectivos e adicionalmente criando um impacto significativo na saúde da família e da comunidade. É por isso considerado o método de alimentação por excelência, pela sua contribuição eficiente para a saúde do bebé (Locatelli *et al.*, 2008).

Vários estudos epidemiológicos comprovam que o aleitamento previne ainda algumas doenças em crianças mais velhas por exemplo: a doença de Crohn, diabetes mellitus tipo I, artrites reumáticas e linfomas, diminuindo da mesma maneira a incidência ou a gravidade de várias doenças tais como: meningite, pneumonia, otite média, infeção urinária, diarreia, enterocolite necrosante e infeção pelo vírus sincipital respiratório (Neto *et al.*, 2006).

Contudo, é importante salientar que o leite materno e outros tipos de alimentos oferecidos aos lactentes podem transferir diferentes contaminantes, designadamente micotoxinas como a Ocratoxina A (OTA). Tal transferência pode causar problemas de saúde na criança, no início ou ao longo da vida. A passagem da OTA do sangue para o leite materno foi identificada inicialmente em animais de laboratório (coelho) em amamentação. Subsequentemente, foi registada a exposição dos lactentes a esta micotoxina, tendo-se verificado uma relação linear entre as concentrações da OTA no leite materno e no plasma das crianças amamentadas (Hassan *et al.*, 2005). Os lactentes são considerados mais suscetíveis aos efeitos das micotoxinas, em relação os adultos, devido à sua maior taxa metabólica, menor peso corporal, menor capacidade de desintoxicar, desenvolvimento incompleto de alguns tecidos e órgãos, fundamentalmente o sistema nervoso central (Navas *et al.*, 2005; Kamali *et al.*, 2018).

1.1. Composição do Leite Materno

O leite materno é um fluido complexo, de composição ainda não completamente conhecida, que exerce efeitos muito além do seu valor nutricional (Neville *et al.*, 2012). O LM sofre alterações na sua composição nutricional durante o dia, conforme o esvaziamento da mama, estágio de lactação e a dieta materna. Classifica-se conforme descrito anteriormente de acordo com as fases de lactação: colostro até 5 dias após o parto, leite de transição entre 6 a 14 dias após o parto e leite maduro a partir de 15 dias após o parto (OMS 2002). A composição do LM é constituído basicamente por 3 a 5 % de lípidos, dos quais 98% são triglicéridos, 1 % fosfolípidos e 0,5 % esteróis (Picciano, 2001). Os lípidos estão na forma de glóbulos de cerca de 4 µm, em emulsão do tipo óleo em água, que é estabilizada por uma membrana contendo fosfolípidos e proteínas (Silva *et al.*, 2007). A fração lipídica do LM representa a maior fonte de energia para crianças amamentadas, contribuindo cerca de 40 a 55 % do total de energia ingerida (INNIS, 2003). O conteúdo de ácidos gordos insaturados no LM é maior que no leite de vaca (Silva *et al.*, 2005) e pode variar conforme a dieta materna (Yuhás e Patin *et al.*, 2006).

As proteínas do LM são estruturais e qualitativamente diferentes das proteínas do leite de vaca. Do seu conteúdo proteico o principal constituinte é a lactoalbumina, ao passo que no leite de vaca a caseína corresponde a aproximadamente 80 %. Deste modo, a relação proteica do soro e caseína do LM é aproximadamente 80/20, enquanto a do leite de vaca é 20/80. A baixa concentração de caseína no LM resulta na formação de coalho gástrico (Silva *et al.*, 2007). Além disso o conteúdo azotado não proteico do LM é mais elevado que o leite de vaca, variando de 18 a 30 % do azoto total. (Carratú *et al.*, 2002).

O principal hidrato de carbono no LM é a lactose, contudo já foram identificados mais de 30 açúcares como a galactose, frutose e outros oligossacáridos (Zivkovic *et al.*, 2011). A concentração de lactose é cerca de 4 % no colostro e de até 7 % no leite maduro. A lactose facilita a absorção de cálcio e ferro e promove a colonização intestinal com *Lactobacillus bifidus* (Picciano, 2001; Silva, 2009).

1.2. Possibilidade de transferência de contaminantes

Além dos componentes naturais, o LM pode conter xenobióticos provenientes do meio externo, como micotoxinas que, em caso de estarem presentes em quantidades elevadas, podem afetar o crescimento e desenvolvimento das crianças (Abdalla *et al.*, 2002; Borchers

et al., 2010). As micotoxinas podem ser transferidas para os lactantes através do aleitamento materno, embora seja também possível a transferência feto-placentária durante o desenvolvimento uterino. A exposição materna ocorre através de consumo dos alimentos contaminados com micotoxinas, depois transferidas para o leite materno (Ulaszewska et al., 2011). Turner (2007) e Biasucci (2011) comprovaram a exposição fetal uterina, com a presença da OTA em amostra de soro fetal e cordão umbilical humano.

As características bioquímicas do leite materno, como pH reduzido e alto teor de lípidos comparativamente ao plasma, contribuem para este fenómeno. Além disso, a composição do leite materno varia após o parto (colostró, leite de transição, e leite maduro) e durante o esvaziamento da mama (leite inicial e final). Estes fatores contribuem para a variação da excreção de xenobióticos para o leite materno (Ito, 2003). Devido à variação do conteúdo lipídico do leite materno durante a lactação, é possível a mobilização de contaminantes lipofílicos, variável durante o período de amamentação (Polychronaki et al., 2006). É bem possível que a excreção de micotoxinas para leite materno seja suportada pela proteína BCRP (do Inglês *Breast Cancer Resistance Protein*), uma proteína resistente ao cancro de mama, membro da família de transporte de efluxo dependentes de ATP, conhecida por ser responsável pela excreção de vários xenobióticos para leite materno (Jonker et al., 2005; Schinkel, 2006; Duarte et al., 2011; EFSA 2006).

2. Micotoxinas

A palavra micotoxina deriva de dois termos, um com origem grega (*Mykes* significa fungo) e a outra origem latina (*toxicum* significa veneno ou toxina; Gonzalez et al., 2001; Santos et al., 2014). As micotoxinas são contaminantes naturais produzidos por fungos filamentosos (Figura 1) que provocam toxicidade, mesmo em baixa concentração, nos vertebrados superiores e outros animais (Alshannq et al., 2017), após inalação, ingestão ou pelo contacto com a pele (Bernabucci et al., 2011).



Figura 1. Fungos produtores de micotoxinas (adaptado de Soares *et al.*, 2013)

Segundo Silva (2006) para o crescimento e produção de micotoxinas, os fungos precisam de condições favoráveis, que permitam o seu desenvolvimento como fatores intrínsecos (atividade de água (a_w), pH, nutrientes) e fatores extrínsecos (teor da humidade, temperatura, taxa de oxigénio), composição química do alimento, artrópodes, interação microbiana, grau de contaminação fúngica, condições físicas dos grãos ou semente e período de armazenamento.

As micotoxinas foram identificadas, pela primeira vez, em 1960, no Reino Unido, na sequência de um surto que originou a morte de mais 100 000 perus, tendo sido na altura denominada como Doença X (Stefano *et al.*, 2014). Em seguida foi descoberto que patos e faisões foram também contaminados e apresentaram elevados índices de mortalidade, por ingestão de alimento produzido a partir de amendoim importado do Brasil e Africa (Santos *et al.*, 2014), contaminado com metabolitos tóxicos produzidos pelo fungo filamentoso *Aspergillus flavus* (Stefano *et al.*, 2014). Os metabolitos foram, por essa razão, chamados Aflatoxinas (AFs) (Pereira *et al.*, 2011).

Algumas micotoxinas podem ter efeitos adicionais, tais como a fitotoxicidade ou actividade antimicrobiana (Alshannaq *et al.*, 2017). São produzidas por diversas espécies de fungos, nomeadamente do género *Aspergillus*, *Fusarium* (figura 2) e *Penicillium*, que apresentam uma preocupação de saúde devido aos seus efeitos tóxicos (Valitutti *et al.*, 2018). Apesar de terem sido identificadas mais de 300 micotoxinas, apenas algumas contaminam regularmente alimentos para humanos e animais (Alshannaq *et al.*, 2017). Estes compostos, sintetizados no final do crescimento exponencial de certos fungos (Fabiane *et al.*, 2013), apresentam diferentes efeitos tóxicos, nomeadamente carcinogénicos, teratogénicos,

hemorrágicos e dermatíticos numa ampla gama de organismos (Warth *et al.*, 2016) com consequências que podem não ser imediatas (Roldão *et al.*, 2015).

Com a atual implementação de regulamentação rigorosa para micotoxinas imposta por países importadores, como da União Europeia, muitos cereais que não são seguros para o consumo humano são utilizados em fórmulas destinadas à alimentação animal (Stefano *et al.*, 2014). Existem seis micotoxinas, ou grupos de micotoxinas, que ocorrem com bastante frequência em alimentos e que, por isso, apresentam maior preocupação em Saúde Pública e agropecuária: OTA, AFs, fumonisinas, patulina, zearalenona (ZEA) e tricotecenos, incluindo o desoxinivalenol (DON; Etzel, 2006; Sherif *et al.*, 2009; Alshannaq *et al.*, 2017, Salvador *et al.*, 2018). Estima-se que as micotoxinas anualmente afetam 25% dos campos agrícolas a nível mundial (Armando *et al.*, 2012), provocando assim enormes perdas agrícolas e industriais em bilhões de dólares (Alshannaq *et al.*, 2017). Os consumidores estão expostos ao risco de exposição a micotoxinas (Valitutti *et al.*, 2018), que são transferidas ao longo da cadeia alimentar (Abrunhosa *et al.*, 2010), diretamente através da ingestão dos alimentos contaminados, como cereais, sementes e frutos secos, ou indiretamente através do consumo de alimentos de origem animal contaminado (leite, carne e ovo) expostos a esses contaminantes.

3. Ocratoxina A

A OTA e os seus derivados hidroxílicos são altamente tóxicos quando ingeridos pelos animais (como: suínos, aves de capoeira) e humanos (Armando *et al.*, 2012).

A OTA foi detetada, isolada e identificada quimicamente originalmente por Van Der Merwe (1965). Após esta descoberta, na África do Sul, como um metabolito tóxico de *Aspergillus ochraceus*, foi detetada numa farinha de milho intencionalmente inoculada com o fungo produtor (Welke, 2009 e Malir *et al.*, 2016). Mas apenas em 1969 foi detetada num alimento naturalmente contaminado, nos Estados Unidos. Logo em seguida foi demonstrado que outras espécies do género *Aspergillus* e *Penicillium* também produzem OTA. Na Escandinávia, após a segunda guerra mundial, a nefropatia nos suínos era comum e foi subsequentemente associada ao consumo de grãos bolorentos, depois identificados como *Penicillium viridicatum* (Pitt *et al.*, 2016).

Em 1972, a OTA foi associada à Nefropatia Endémica dos Balcãs, uma disfunção renal degenerativa que atingiu indivíduos adultos da população rural da região dos Balcãs, estando também relacionada com a indução da formação de tumores no sistema urinário de humanos (Hoeltz *et al.*, 2012). A agência internacional de investigação do cancro (IARC)

classificou a OTA como possível agente carcinogénico em humanos (IARC grupo 2B) desde 1993 (Abrunhosa *et al.*, 2012). Além da sua carcinogenicidade (Klaric *et al.*, 2015), a OTA também possui propriedades imunossupressoras, hepatóxicas, teratogénicas, (Skaug *et al.*, 1998) e genotóxicas em animais de laboratório (Hoeltz *et al.*, 2012), designadamente roedores, mas não para os humanos. Demonstrou-se ainda que a OTA pode causar cancro pela indução de lesões oxidativas no ácido desoxirribonucleico, através da formação de adutos no ADN (Malir *et al.*, 2016; Kamali *et al.*, 2018).

A exposição crónica a OTA representa um risco para a saúde animal e humana, estando a ingestão da OTA relacionada com a dieta (Soto *et al.*, 2016).

A OTA contamina os géneros alimentícios em quase todo o mundo (Holmberg *et al.*, 1991; Munõz *et al.*, 2014) sendo encontrada principalmente em carne, vinho, cerveja, café, uvas, (Koszegi *et al.*, 2016), milho, cevada, feijão, amendoim, trigo-sarraceno, soja, centeio, arroz, sorgo, castanha do Pará, na parte externa do presunto, pimentões vermelhos, pimenta do reino, pimenta preta, sumo de maçã, sumo de uva, pão, semente de papoila, nozes, aveia, ervilhas (Silva *et al.*, 2005), cacau, leite e ovos (Bankole *et al.*, 2003). Foi igualmente detetada em rim de suíno e outras carnes derivadas de animais expostos a alimentos contaminados (Armando *et al.*, 2012). Contudo, os cereais são atualmente considerados a maior fonte de contaminação da OTA (Soares *et al.*, 2013). A OTA foi já detetada numa variedade de alimentos para animais e humanos, durante a produção, colheita, armazenamento e transporte de produtos agrícolas (Armando *et al.*, 2012). Esta micotoxina apresenta menor incidência no hemisfério sul, estando quase restrita ao hemisfério norte com índices de contaminação 10 vezes superiores (Castro *et al.*, 2015).

3.1. Caracterização da família das Ocratoxinas

As ocratoxinas são uma família estruturalmente relacionada de micotoxinas (Figura 2). Neste grupo encontra-se a OTA e seu éster metílico, conhecido como Ocratoxina C (OTC); 4- hidroxiocratoxina A; seus ésteres metílicos e etílicos (Ringot *et al.*, 2006; Koszegi *et al.*, 2016). Entre as ocratoxinas, o elemento mais tóxico e mais frequente é a OTA, uma isocoumarina ligada a uma molécula de fenilalanina (Duarte *et al.*, 2010, Cardozo *et al.*, 2014). A OTB co-ocorre principalmente com a OTA em cereais e foi identificado como um metabolito da OTA nos estudos *in vitro*, sendo menos tóxico que a OTA (Dragusel *et al.*, 2011), A Ocratoxina B, resulta de clivagem da ligação péptica, foi a principal metabolito excretado na urina, além de pequenas quantidades de 4-hidroxi-OTB,

19% da dosagem administrada foi recuperada como OTB e OTA na urina dentro de três dias após uma única dose. Contrariamente à OTA, nenhum órgão específico reteve a OTB após a administração única e repetida em estudos com animais testados para toxicidade. As concentrações foram baixas e evidencia ser menos tóxico que a OTA *in vivo* (EFSA 2006). A OTC também co-ocorre com a OTA *in vivo*, pode ser convertida em OTA, e foi encontrada como um metabolito em ruminantes (Dragusel *et al.*, 2011).

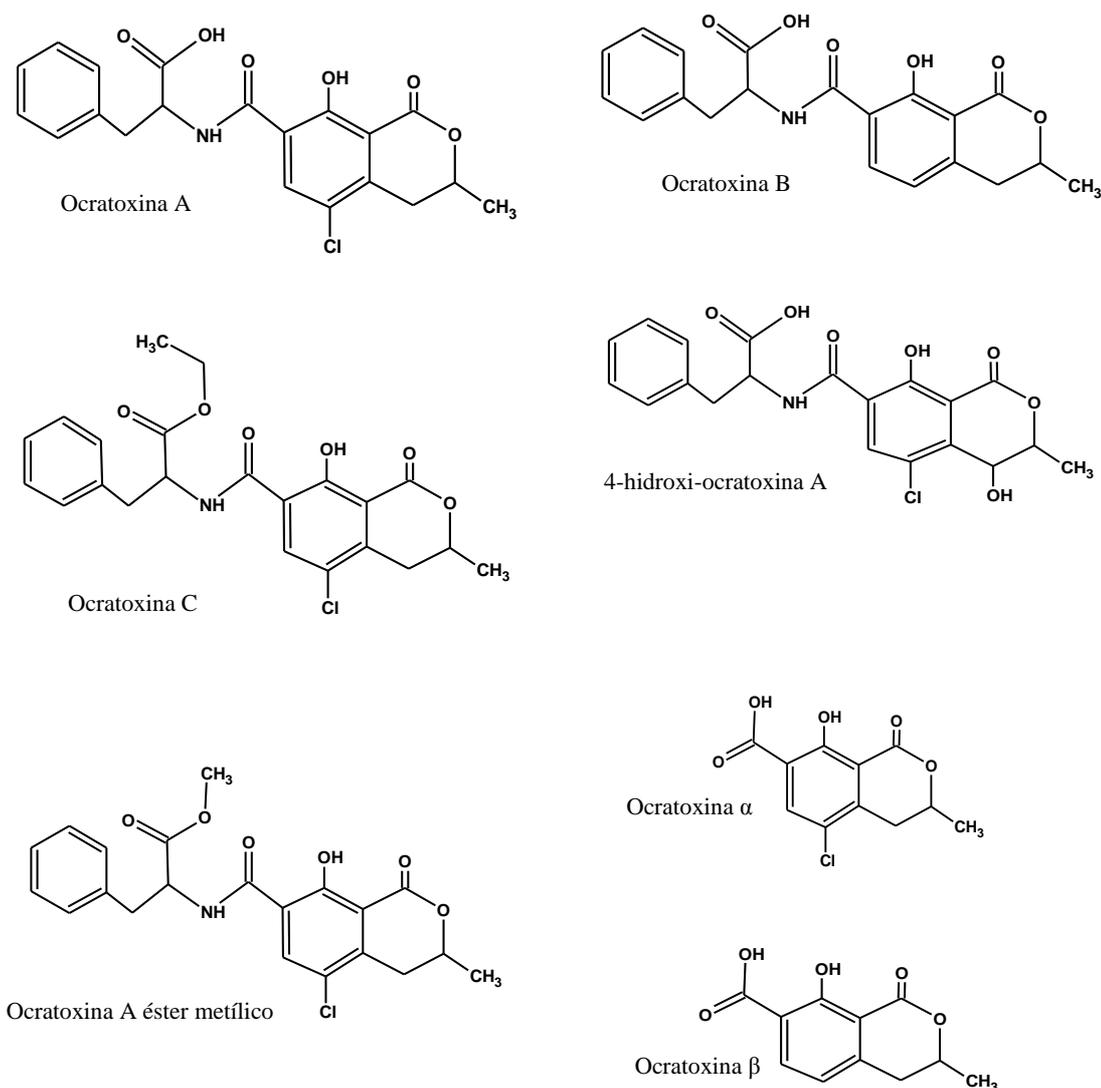


Figura 2. Estrutura química básica das ocratoxinas (adaptado de Almela *et al.*, 2007).

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPPA) desenvolveu a fórmula da OTA ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) cujo o nome químico é L-fenilamina-N- [(5-cloro-3,4-dihidro-8-dihidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-7-il) -carbonil]- (R)-isocumarina.

Tabela I. Propriedades químicas da ocratoxina A (Adaptado Khoury *et al.*, 2010).

pKa	7,1
MM	403,82 g/mol.
Estrutura	Estrutura cristalina que pode variar de incolor a branco
Fluorescência	Quando exposta à luz UV: Meio ácido – verde intensa Meio alcalino – azul
Solubilidade	- pH ácido e neutro - solúvel em solventes orgânicos polares, ligeiramente solúvel em água e insolúvel em éter e hidrocarbonetos saturados - pH alcalino - solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio e em todas as soluções alcalinas em geral.
Ponto de Fusão	Quando recristalizado do benzeno, o seu ponto de fusão é 90°C Quando recristalizado do xileno, o seu ponto de fusão é 169°C
Estabilidade	Elevada estabilidade: Resistência à acidez Resistência a altas temperaturas.

A OTA é um composto branco, cristalino, inodor, termicamente estável (Ringot *et al.*, 2006; Abreu *et al.*, 2011 e Koszegi *et al.*, 2016), resistente aos processos de cocção em determinadas proporções, a sua temperatura pode alterar de acordo o pH e outros fatores (Santos *et al.*, 2014). É altamente solúvel em solventes orgânicos polares (e.g. álcool, clorofórmio e cetonas), ligeiramente solúvel em água, e insolúvel em éter de petróleo e hidrocarbonetos saturados. Em condições alcalinas a OTA é solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio (Khory *et al.*, 2010).

A OTA apresenta os pontos de fusão de 90 e 171 °C, não se destruindo na sua totalidade durante a cozedura. Tem propriedades ácidas fracas de 7,1 com uma massa molar de 403,8 (Koszegi *et al.*, 2016).

A sua estrutura produz uma fluorescência verde- azulada quando excitada por luz ultravioleta UV (336nm), que muda para uma fluorescência azul-escura quando exposto a

vapores de amoníaco, NaHCO₃ aquoso ou NaOH. As propriedades de fluorescência são utilizadas principalmente para detecção e identificação em Cromatografia de Camada Fina (TLC, do Inglês *Thin Layer Chromatography*) e Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, do Inglês *High performance liquid chromatography*; Abrunhosa et al., 2010).

3.2. Fungos produtores

OTA é produzida por diversas espécies pertencentes aos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*, fundamentalmente *P. Verrucosum*, *A. westerdijkiae*, *A. Carbonarius* e *A. ochraceus* que frequentemente se desenvolvem durante o armazenamento (Biasucci et al., 2011).

A espécie *P. verrucosum* cresce em temperaturas baixas, com temperatura óptima de 20 °C (Alshannaq et al., 2017). É capaz de crescer em atividade de água de 0,80 e também podem crescer a pH variável entre 2,1 a 10,0, mas com um pH óptimo de 6,0 a 7,0 (Fraga et al., 2003). Apresenta distribuição mundial, embora afecte sobretudo alimentos como: cereais, café, vinho, sumos, uvas e cerejas. As espécies *P. verrucosum* e *P. nordicum* são as únicas espécies do género *Penicillium* que têm a capacidade de sintetizar a OTA (Khoury et al., 2010). A espécie *Penillium nordium* é a maior produtora da OTA encontrada na carne e seus derivados (ex: salame, fiambre), bem como em queijos (Pereira et al., 2008).

No grupo ocratoxicogénico de *Aspergillus*, a espécie *A. Ochraceus* é comum em grãos de café verde e especiarias, tendo sido isolado frequentemente nos grãos de cacau, soja, amendoim, arroz e milho. A contaminação pode ocorrer antes da colheita ou após a colheita, mas a síntese da OTA após a colheita é geralmente observada como fator predominante na contaminação de alimentos humanos e animais (Navas, 2003).

Na secção *Nigri*, *A. carbonarius* é responsável pela produção de OTA nas uvas sendo designado *Aspergillus* preto, é uma espécie muito usada na indústria, no fabrico de ácido cítrico e enzimas para ingestão humana (Freire et al., 2007). Sendo a espécie mais frequentemente isolada em culturas agrícolas, pensa-se que *Aspergillus* preto é a fonte fundamental da OTA em climas tropicais e subtropicais (Magnoli et al., 2006).

A germinação de esporos de *Aspergillus carbonarius* é muito rápida, ocorrendo dentro de 24 horas com a_w de 0,90 a 0,99 e temperaturas variáveis entre 25 a 35 °C. Contudo, as condições óptimas de crescimento e produção da OTA correspondem a temperaturas de 32 a 35 °C (mínimo 10 °C e máximo 45 °C) e a_w de 0,95 a 0,98. Os agregados de *A. Niger* crescem otimamente a temperaturas altas de 35 a 37 °C, com germinação relativa em a_w

0,93 a 0,98, sendo encontrados numa ampla variedade de frutas frescas e frutas secas (Visconti *et al.*, 2008).

Em suma, os fungos podem desenvolver-se, na presença de condições favoráveis de temperatura e humidade ou em stresse biótico, durante as várias fases das culturas agrícolas. Contudo, os fungos ocratoxigénicos são considerados fungos de armazenamento (Valitutti *et al.*, 2018).

3.3. Toxicocinética

A OTA é absorvida pelo tracto gastrointestinal (Soto *et al.*, 2016), e passa para circulação sistémica, sendo detetada no sangue e tecidos. As concentrações são detetadas em órgãos com maior atividade metabólica como fígado, gordura, músculo e rim (Abreu *et al.*, 2011). A via entérica é a principal via de exposição da OTA. A biodisponibilidade oral é cerca de 60 %, dependendo da espécie. O mecanismo de absorção da OTA a partir do lúmen gastrointestinal não está ainda elucidado. É de salientar que existem duas rotas fundamentais para o transporte de moléculas e iões para a mucosa intestinal (via transcelular e paracelular). A difusão passiva da molécula não ionizada através da membrana lipídica é o principal mecanismo de absorção da OTA no estômago e no intestino (Aralt *et al.*, 2001, Vettorazzi *et al.*, 2013). Em várias espécies, incluindo homem e macacos, a principal via de excreção é a eliminação renal (EFSA 2006). A OTA é excretada pelos túbulos renais, e pode ser reabsorvida atrasando assim a sua eliminação e aumentando dessa forma o risco de acumulação nos tecidos (Oliveira *et al.*, 2015).

Após a absorção, cerca de 99 % da OTA está ligada a proteínas plasmáticas. A fração não ligada é de 0,02 %. A elevada afinidade e extensão da ligação às proteínas determina o longo tempo de semi-vida, o qual é variável consoante a espécie animal (Cerain *et al.*, 2000). Tem por isso um tempo de semi-vida longo: no porco é de 3-4 dias e no homem 35 dias. Tanto a OTA como os seus metabolitos são excretados sobretudo por via renal e hepatobiliar (Abreu *et al.*, 2011).

A biodisponibilidade oral da OTA em humanos é de cerca de 93 %. A reabsorção da OTA nos intestinos de volta à circulação pode ocorrer como consequência da reciclagem biliar, a qual varia com a espécie: nos porcos é cerca de 60 %, ao passo que nos roedores é muito inferior (Kőszegi *et al.*, 2016). Nos humanos, foi detectada OTA no soro fetal, indicando assim uma transferência placentária ativa. Os fatores genéticos, ambientais e patológicos também contribuem para o transporte placentário da OTA, sendo que estes facilitam a

transferência e fornecimento dos compostos essenciais ao feto em desenvolvimento (Ringot *et al.*, 2006). Uma vez em circulação, a OTA sofre ainda reabsorção nos túbulos proximais e distais favorecendo assim a sua acumulação principalmente no rim, sangue, fígado e músculo. Acresce que a redistribuição sistêmica da OTA é favorecida, em diferentes tecidos, fundamentalmente fígado e o rim, os principais órgãos de biotransformação da OTA (Ringot *et al.*, 2006; Corcuera *et al.*, 2012). A via de excreção urinária, biliar ou fecal depende de vários fatores, como: espécie, dose e via de administração, a composição da dieta, bem como o estado de saúde do animal (Corcuera *et al.*, 2012). Em administração oral ou intravenosa em peixes, codorniz, rato e macacos, a OTA comporta-se de acordo com um modelo cinético de dois compartimentos. A exceção é o macaco no caso da administração oral, que corresponde a um modelo monocompartimental. (Cerain *et al.*, 2000). Na verdade o tempo de semi-vida da OTA é mais longo no sangue que nos tecidos (Ringot *et al.*, 2006). As aves parecem eliminar a OTA mais rapidamente que os mamíferos, o que resulta em menor acumulação de OTA no soro sanguíneo. O tempo de semi-vida da OTA no soro do porco, relacionado com maior ligação a micotoxina às proteínas do sangue, é 20 a 30 vezes mais elevado em relação ao soro de aves, justificando assim os níveis de OTA encontrados em tecidos edíveis em porcos (Duarte *et al.*, 2010). A distribuição nos tecidos de cabra, frango, porcos e ratos foi registada de acordo com o padrão rim> fígado> músculo> gordura ou rim> musculo> fígado>> gordura (Ringot *et al.*, 2006). A fração ligada a macromoléculas consiste num armazenamento da micotoxina que permite liberta-la para os tecidos durante um período de tempo longo. A alta afinidade para as proteínas séricas retarda a eliminação da micotoxina, aumentando assim o seu tempo de semi-vida (Nogueira *et al.*, 2006). A permanência da OTA no sangue depende fundamentalmente da ligação à albumina. A eliminação de OTA pela urina é a principal via de excreção do corpo e as constantes ligação à albumina são descritas como responsáveis pela filtração restrita através do rim (Fuchs *et al.*, 1999), ao passo que em roedores a excreção biliar é predominante. O metabolismo da OTA encontra-se sistematizado na figura 3.

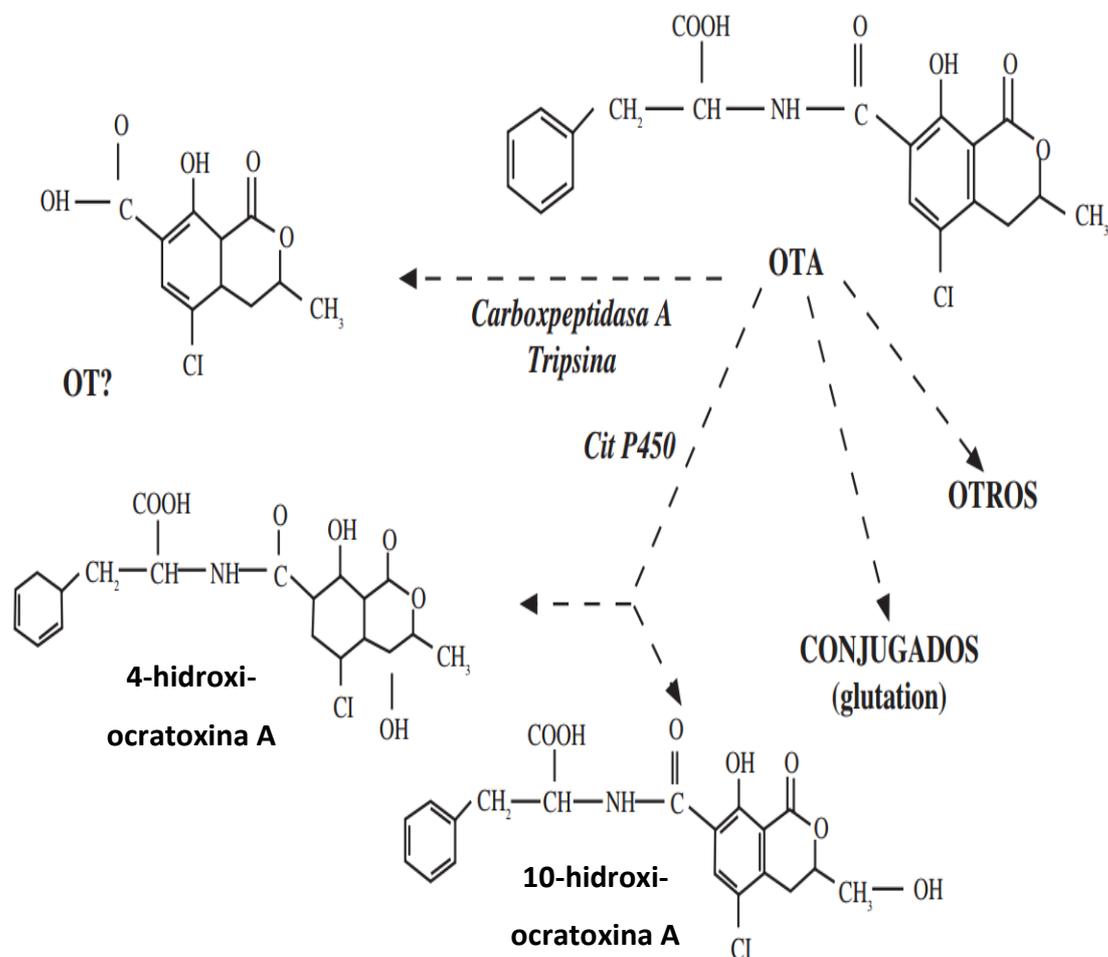


Figura 3. Metabolismo da OTA (adaptado de Abreu, 2011).

No caso de deficiência de albumina a OTA é eliminado no plasma em um período curto, e a excreção na bÍlis e urina é 20-70 vezes maior do que em ratos, quase todas espécies eliminam a OTA administrada por outras vias de excreção (bilis, Fuchs *et al.*, 1999).

Os peixes e codornizes, são as espécies com menor tempo de semi-vida da OTA no sangue, com menor fração da toxina filtrada através do rim. Nestas espécies a excreção hepatobiliar é mais importante que a urinária. Nos ratos e ratinhos verificou-se que cerca de 10 % da OTA é filtrada através do rim. Em relação a outras espécies (macaco) a eliminação mais longa e a taxa de filtração é maior, quase 100 %. As trutas, as codornizes e ratinhos mostraram elevada concentração da OTA na bÍlis e intestino. A circulação entero-hepática da OTA em animais pode ser parcialmente responsável pelas diferenças na retenção da toxina no plasma (Fuchs *et al.*, 1999).

A toxicinética determina claramente a toxicidade da OTA, além das características de biomonitorização, no que diz respeito ao tipo e níveis de metabolitos presentes, bem como o tipo de matrizes biológicas onde estes podem ser procurados (Muñoz *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2011). Segundo Landrigan (2002) as informações sobre a toxicocinética de compostos químicos no leite humano são incompletos.

3.4. Toxicidade

A OTA é a ocratoxina mais tóxica (Elika, 2013), sendo o rim o principal órgão alvo. A OTA induz toxicidade renal em todos estudos experimentais em espécies de mamíferos. Estudos de curto prazo feitos em ratos, ratinhos, porcos e cães demonstraram o desenvolvimento de nefropatia, dependente da dose e do tempo. Diferenças entre sexo e espécie, foram observadas na sensibilidade à ação nefrotóxica da OTA. Em ratos, a exposição à OTA resultou numa alteração do tamanho do rim, aumento do peso, volume de urina, proteinúria e glicosúria. As lesões histopatológicas foram caracterizadas por cariomegalia (células epiteliais renais grandes com núcleos poliploides enormes, nucléolos proeminentes) e necrose das células tubulares (EFSA 2006). A concentração elevada no rim provoca toxicidade renal, impede a síntese proteica, do ADN e ARN na célula, inibe várias atividades enzimáticas do rim (Schilter *et al.*, 2005), afeta as enzimas fosfoenolpiruvato, carbonil redutase C e succinato a desidrogenase. A inibição de enzimas associadas à síntese de proteínas, ADN e RNA podem ser uma causa de cancro em indivíduos expostos à OTA.

No homem, a exposição à OTA foi associada à nefropatia endêmica dos Balcãs, doença caracterizada por progressiva redução da função renal, insuficiência renal crónica bilateral associada à formação de tumores no sistema urinário humano (Zinedine *et al.*, 2010; Peraica *et al.*, 1999). O seu envolvimento foi confirmado por análise de amostras biológicas como sangue, urina e leite (Schilter *et al.*, 2005). Esta doença foi descrita pela primeira vez no final de 1950, e classificado como uma doença endêmica em habitantes de localidades rurais da Bósnia Herzegovina, Bulgária, Roménia, Sérvia e Croácia (González *et al.*, 2014).

Outros efeitos tóxicos da OTA incluem alterações nos fatores de coagulação, associados a hemorragia e trombose no fígado, rim, baço, coração e cérebro (Niknejad *et al.*, 2016). Estudos realizados em animais de experimentação demonstraram que a OTA é nefrotóxica *in vitro*, bem como *in vivo* (Nava *et al.*, 2005, Malir *et al.*, 2013). A nefrotoxicidade da OTA, pode manifestar-se de diferentes formas, desde alteração do volume dos rins dos animais, alteração da osmolaridade da urina, aumento do volume da urina, mudanças na função

renal, necrose do túbulo proximal, diminuição da atividade enzimática do rim e desenvolvimento de adenomas e tumores renais (Nogueira *et al.*, 2006).

A OTA possui ainda propriedades hepatotóxicas, genotóxicas e imunotóxicas em animais e humanos (Ringot *et al.*, 2006). A micotoxina possui ainda atividade imunossupressora em várias espécies, sendo que concentrações próximas de 5ng de OTA/kg de peso corporal causam efeitos imunossupressores em ratinhos. *In vitro* a OTA mostra inibição da resposta e da multiplicação dos linfócitos B e T, e afetam a ativação dos linfócitos T (Nogueira *et al.*, 2006). A teratogenicidade da OTA foi estudada fundamentalmente no sistema nervoso central, com concentrações muito superiores em relação às normalmente presentes nos alimentos. A carcinogenicidade em ratos foi detetada com doses comparativamente baixas (70 ug/kg de peso corporal). Em virtude dessa evidência em animais, a OTA foi classificada, pela IARC no grupo 2B, como possivelmente carcinogénica para humanos (IARC, 1993). Outros efeitos tóxicos da OTA observados incluem anomalias histológicas hepáticas, aberrações dos fatores de coagulação no rato, acompanhados de hemorragia e trombose no baço, cérebro, fígado, rim, coração, lesões do trato gastro intestinal e tecidos linfóides em hamster, mielotoxicidade em ratos, fragilidade intestinal e lesões renais em galinhas (Malir *et al.*, 2013).

A OTA é capaz de induzir mecanismos de stress oxidativo (Duarte *et al.*, 2011), com a formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigénio, responsáveis pela citotoxicidade. A peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados membranares mitocondriais leva à modificação da permeabilidade iónica da membrana (Nogueira *et al.*, 2006).

Em relação a toxicidade aguda, a OTA apresenta variações interespecíficas da dose letal a 50 (DL50), por via oral, apresentando assim um intervalo entre 20-50 mg/kg em ratos e ratinhos e entre 0,2-1 mg/kg em suínos e galinhas, que são as espécies mais sensíveis. A administração de doses altas e únicas da toxina, durante algumas semanas, provocam exposição aguda, apresentando sinais e sintomas de intoxicação tais como: poliúria, perda de peso, polidipsia, doenças digestivas, desidratação, hemorragias multifocais nos principais órgãos (baço, cérebro, fígado, rim e coração), nefrose e necrose hepática bem como trombos de fibrina nos órgãos de maior atividade metabólica, que podem causar a morte (Abreu, 2011).

Alguns estudos demonstraram que os cães, porcos e galinhas são as espécies mais sensíveis aos efeitos da OTA, em relação aos roedores (Cerain *et al.*, 2000).

A exposição crónica em doses baixas de OTA pode ser mais prejudicial que a exposição aguda a uma dose alta. Exposição a doses baixas de OTA é responsável pela nefrotoxicidade (Malir *et al.*, 2013). A toxicidade crónica manifesta-se em nefropatia em

animais de interesse pecuário (galinhas e porcos), que são conhecidas como nefropatia aviária e suína (Abreu, 2011).

3.5. Vias de exposição e ocorrência

A principal via de exposição à OTA é através do trato gastrointestinal, pelo consumo dos alimentos contaminados (Figura 4), sendo que na maioria das espécies a absorção ocorre fundamentalmente no estômago, como consequência das suas particularidades ácidas a nível gástrico. Contudo, a exposição por inalação tem sido cada vez mais registada e relacionada com o desenvolvimento de micotoxicoses (Ribeiro, 2007).

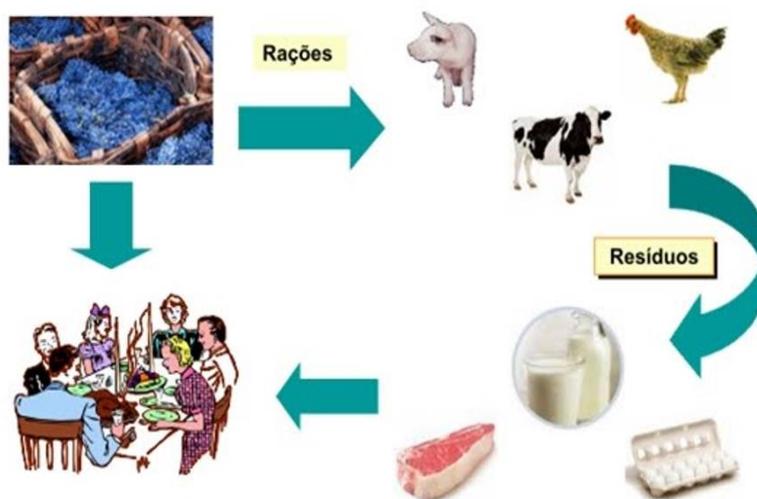


Figura 4- O consumo de alimentos como principal via de exposição humana directa e indirecta à OTA (adaptado de Ribeiro, 2007).

A exposição à OTA através da cadeia alimentar depende do consumo de alimentos contaminados de origem vegetal (e.g. cereais, café, cacau, nozes, frutas) e também de produtos derivados de origem animal (e.g. leite, ovos, carnes) que consumiram alimentos contaminados com as micotoxinas (Figura 4; Muñoz *et al.*, 2014). A contaminação por via indirecta é menos significativa, com exceção dos bebés e crianças devido ao elevado consumo de leite materno e produtos lácteos em geral. A transferência pelo ar também pode ocorrer, embora muito raramente e apenas em condições particulares (Ribeiro, 2007).

De uma maneira geral, a transferência de contaminantes para o leite materno ocorre através da difusão passiva destes compostos através do plasma, e a sua concentração no leite é proporcional à sua solubilidade e lipoficidade (Anderson *et al.*, 2000). A exposição de recém-nascido ao aleitamento materno contaminado com OTA pode ser uma das primeiras fontes de exposição alimentar. Existe uma relação direta entre a ingestão de OTA e a sua concentração no leite materno, sendo os níveis mais elevados nos primeiros dias após o parto. Segundo Galvano *et al.*, (2008), o consumo habitual de pães e carne de porco curado contribui para os níveis elevados de OTA no leite materno na Itália. Os autores defendem a criação de recomendações, mudança do estilo de vida ou dieta específica para as gestantes e lactentes, a fim de reduzir a contaminação de leite materno por OTA e garantir os benefícios do aleitamento materno. Alimentos como cereais, sumo, refrigerantes, patês e produtos de panificação também são citados por vários autores como produtos relacionados à contaminação do leite materno por micotoxinas.

É de salientar que a contaminação de OTA pode ocorrer por via transplacentária, quando a grávida é exposta às micotoxinas, principalmente pelo consumo de alimentos contaminados (Turner *et al.*, 2007).

No cacau a micotoxina pode ser encontrada em todas as fases da produção, o grão degradado pode conter concentrações mais elevadas. A concentração média na massa e no pó de cacau foi de 2,79 a 2,41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ao passo que no creme de chocolate e chocolate a concentração encontrada foi de 0,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estudos feitos em uvas nas regiões de Ilha da Madeira e do Dão as concentrações de OTA foram de 115 e 9,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, em sumo de uva a concentração máxima foi de 0,337 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A presença da OTA foi encontrada em Portugal em uvas Cabernet Sauvignon com uma concentração de 115,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Outro estudo realizado em Portugal em vinho tinto, branco e do porto as concentrações da OTA encontradas variaram entre 1 a 1,23, 1 a 2,2,4 e 0,05 a 0,08 $\mu\text{g}/\text{l}$, respectivamente. Num estudo adicional o vinho apresentou concentrações que variaram entre 0,2 a 0,4 $\mu\text{g}/\text{l}$, ao passo que em cerveja a contaminação foi de 0,033 $\mu\text{g}/\text{l}$, com a concentração máxima de 0,18 $\mu\text{g}/\text{l}$.

3.6. Avaliação da exposição e Biomonitorização

A presença da OTA em seres humanos tem sido confirmada por análise de amostras biológicas humanas como sangue, urina, leite (Soto *et al.*, 2016) e sangue do cordão

umbilical (Dragusel *et al.*, 2011). A biomonitorização da OTA oferece a melhor abordagem para avaliar a exposição humana à OTA de qualquer fonte e através de qualquer via.

A OTA foi detectada em diferentes concentrações no leite humano de mães saudáveis na Alemanha, Noruega, Suécia, Hungria, Itália, Austrália e Serra Leoa. Onde comparações com níveis séricos ou sanguíneos foram feitos (Alemanha e Suécia) a OTA não era detectada no leite humano ou em concentrações muito inferiores às determinadas nas amostras de sangue correspondentes (Scott *et al.*, 2006). A transferência de OTA do sangue para o leite ainda não é um processo totalmente compreendido e os dados referentes à capacidade de OTA ou seus metabolitos para produzir adutos com ADN são controversos (Dragusel *et al.*, 2011).

O mecanismo de transporte da OTA no leite materno e a relação de distribuição entre o sangue e o leite humano não são conhecidos. Variação nos níveis de OTA no leite materno pode ser devido a diferenças na biodisponibilidade, distribuição e excreção de OTA. Por outro lado, a variação dos valores da relação leite / plasma fornecida pela literatura pode refletir diferenças no modo de exposição toxina (Duarte *et al.*, 2011). Os potenciais indicadores biológicos na exposição à OTA ainda estão pouco estudados (Bando *et al.*, 2007). Os níveis de OTA encontrados no leite materno em vários estudos evidenciam o risco associado durante a ingestão do leite pelo recém-nascidos e a importância de desenvolver estratégias para o controle e evitar os efeitos negativos da OTA. Devido aos efeitos toxicológicos da OTA, estudos recomendam a importância de ter bons hábitos alimentares, alguns investigadores mencionam que a dieta mediterrânica é uma dieta saudável, considerando sua contribuição positiva para reduzir a quantidade de OTA ingerida devido à variedade e quantidade de seus produtos (Soto *et al.*, 2016).

A exposição humana à ocratoxina representa um problema global, um estudo de biomarcadores e exposição foi definida como medida biológica que está correlacionada com a quantidade do xenobiótico ingerido, resultando na melhor classificação da exposição em comparação com abordagens tradicionais: Vários biomarcadores foram utilizados para avaliar a exposição à OTA. Os valores encontrados em biomarcadores potenciais de exposição para sangue 0,15 a 18,0 ng/ml, leite materno 0,002 para 13,1 ng/ml e urina variaram de 0,013 a 0,2 ng/ml. O EDI calculado para OTA no plasma variou de 0,15 a 26 ng/kg pc / dia, a concentração foi maior do que na urina 0,017 a 0,4 ng/kg pc / dia. Todos valores obtidos foram correlacionados com o intervalo de EDI para OTA calculado de produtos alimentícios: 0,0001 a 25,2 ng/kg de peso corporal /dia (Malir *et al.*, 2016).

3.7. Métodos Analíticos Aplicados na biomonitorização

A complexidade das amostras de alimentos, associada às baixas concentrações em que ocorre, requer técnicas analíticas, altamente sensíveis, seletivas e fiáveis, igualmente aplicáveis a amostras biológicas. A deteção dos analitos de interesse envolve um número de passos que podem incluir a amostragem, preparação da amostra, separação, identificação e quantificação do (s) analito (s). As micotoxinas são extraídas a partir de misturas e agitação de solventes orgânicos como acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, clorofórmio, metanol e diclorometano. É nesta fase que ocorre a separação da micotoxina da amostra por solubilização com solvente adequado.

As técnicas analíticas mais usadas e tradicionais para determinar OTA, incluem a técnica imunoenzimática ELISA (do Inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*; Malir *et al.*, 2015), cromatografia em camada fina e HPLC. As técnicas imunológicas são utilizadas para deteção de materiais biológicos, com recurso a anticorpos específicos para isolar as micotoxinas presentes nas amostras (Malir *et al.*, 2015). No formato competitivo da técnica de ELISA o analito da amostra e uma quantidade conhecida de um analito marcado com enzima competem por um número conhecido e limitado de sítios de ligação em anticorpos. A adição de um substrato adequado produz cor por reação com a enzima do analito marcado que se ligou ao anticorpo. De uma forma sumária, os passos do formato competitivo da técnica de ELISA é o seguinte:

- a- Imobilização de anticorpo nos poços de uma microplaca.
- b- Competição entre o analito da amostra e o analito marcado com enzima pelos locais de ligação do anticorpo.
- c- O material que não se liga é retirada por lavagem.
- d- É adicionado substrato cromogénico que desenvolve cor, que por sua vez é depois lida num espectrofotómetro.

A quantificação é conseguida comparando o sinal produzido pela amostra desconhecida com uma curva-padrão. Os kits para testes combinam numa embalagem (anticorpos, reagentes, padrão e substratos) em alguns casos dispositivos de extração em unidades de campo portáteis, prontas para usar (Duarte *et al.*, 2010). Apesar de em geral os métodos cromatográficos serem mais precisos e sensíveis que o ELISA, este é vantajoso por ser simples, rápido, custo reduzido, elevada especificidade, bem como ao elevado número de amostras que podem ser analisadas em simultâneo, contribuindo assim para a otimização da monitorização da qualidade dos alimentos bem como a biomonitorização. Além disso,

requer uma preparação mínima da amostra e nem sempre a extração da amostra envolve solventes orgânicos (LIM, 2010). Em alguns estudos, apresentou uma sensibilidade comparável com a detecção por fluorescência associada a HPLC. Acresce que o ELISA apresenta potencial de automatização e a possibilidade de ser usado em campo.

No entanto, esta técnica é suscetível a fatores físico-químicos, tais como o pH, a seletividade do anticorpo utilizado para o procedimento de purificação e as interferências da matriz. Podendo esta última ser minimizada pelas técnicas de preparação de amostras, como diluições (Uekane *et al.*, 2010). Visto os anticorpos produzidos muitas vezes mostrarem reatividade cruzada com compostos semelhantes à OTA, podendo levar a falsos positivos, os resultados obtidos pelo ensaio imunológico enzimático requerem confirmação. A incerteza dos seus resultados é geralmente maior do que os procedimentos cromatográficos (Amado, 2002; EFSA, 2004). Em geral, a maioria dos métodos químicos para análise da OTA consistem em separação, limpeza, extração, confirmação de identidade e quantificação (Malir *et al.*, 2016).

3.8. Limites e Legislação

O consumo de alimentos contaminados com a OTA constitui um sério problema da saúde mundial, fazendo com que alguns países estabelecessem legislação referente aos limites máximos permitidos em alimentos e bebidas (Duarte *et al.*, 2010). Limites máximos são fixados bem como ações preventivas destinadas a evitar contaminações em todas as fases da cadeia de produção e de comercialização (Vidal *et al.*, 2014). Para tal, foram criadas medidas pelas autoridades em vários países de forma a monitorizar e controlar os níveis de micotoxinas. Vários fatores desempenham um papel fundamental nas decisões e fixação de limites máximos como fatores científicos para avaliar o risco, conhecimento do nível e distribuição de micotoxinas, disponibilidade de informações toxicológicas, métodos analíticos, segurança alimentar e comércio. Também, devem ser considerados os aspetos políticos e económicos, principalmente em relação aos interesses comerciais e aos impactos na disponibilidade da oferta de alimentos (Freire *et al.*, 2007).

De modo a evitar ou diminuir a presença das micotoxinas nos alimentos a Comissão Europeia fixou limites máximos em diferentes alimentos, através do Regulamento da Comissão n° 1881/2006 (CEC, 2006), baseados no parecer científico atualizado da EFSA (2006) e nas informações sobre incidência de alimentos recolhidos no último relatório (Miraglia e Brera, 2002). Posteriormente, os limites máximos foram alterados pelo

Regulamento da Comissão N° 105/2010 (CEC, 2010), propositadamente para especiarias e alcaçuz. À luz dessas informações mais recentes, os níveis da UE foram estabelecidos apenas para um número limitado de alimentos, pela sua contribuição significativa à exposição humana geral à OTA ou à exposição de grupos vulneráveis de consumidores, como crianças.

PARTE B - EXPERIMENTAL

1. Justificação e objetivos do estudo

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é um problema de saúde pública a nível global. Os programas de biomonitorização dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária.

Vários estudos epidemiológicos comprovam que o aleitamento materno previne algumas doenças em crianças (Neto *et al.*, 2006). Existe pouca informação relacionada com a contaminação do leite materno por micotoxinas em países da Europa, tendo a maioria incidido sobre a avaliação da contaminação do leite materno por AFMI. Contudo, a OTA foi já descrita como um contaminante do leite materno (Navas *et al.*, 2005), pela via de excreção que representa para a mãe, apresentado um perigo potencialmente grave para saúde dos lactentes. Apesar dos estudos apontarem que o sangue apresenta concentrações superiores de OTA, a contaminação do leite materno por OTA permite a avaliação do risco para os lactentes (Malir *et al.*, 2016).

De acordo com estudos prévios de biomonitorização da população Portuguesa existe uma exposição generalizada à OTA. As incidências variam entre 86,4 % num estudo de dois anos de análise de urina (teor médio OTA = $0,019 \pm 0,014$ ng/ml; n = 472 indivíduos; Duarte *et al.*, 2015.) até 100 % num estudo de biomonitoração em sangue (teor OTA médio $0,42 \pm 0,18$ ng/ml; n = 104 indivíduos; Lino *et al.*, 2008).

Pelo que antecede, o desenvolvimento da presente dissertação justifica-se pela importância de melhorar a segurança alimentar relativamente à contaminação por micotoxinas que é uma questão essencial na proteção dos bebés, cujo elevado risco de exposição requer regulamentação e políticas de controlo de alimentos. Neste sentido, o estudo realizado pretendeu determinar a exposição das crianças pela ingestão do leite materno contaminado com OTA por meio de uma metodologia analítica (ELISA), simples e rápida, contribuindo, dessa forma, para prevenir ou mitigar os possíveis problemas da saúde que ocorrem através da exposição humana à OTA (Bando *et al.*, 2007).

Nesta sequência, o presente estudo teve como objectivos específicos:

- Determinar os níveis de OTA em amostras recolhidas do leite materno, por método imunoenzimático (ELISA);
- Avaliar a exposição dos bebés lactentes à OTA, através do consumo de leite materno;

- Identificar os fatores determinantes de natureza socio-demográfica e de consumo alimentar, relativos às respetivas mães.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem

Este estudo obteve a aprovação do Conselho Científico da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e respeitou o previsto na Declaração de Helsínquia (WMA, 2013), e a demais legislação nacional e europeia em vigor. Todas as participantes foram informadas sobre o objetivo e metodologias do estudo e ainda sobre a garantia de confidencialidade. Depois de informadas, todas as participantes assinaram um termo de consentimento escrito, formalizando a sua aceitação (ANEXO I).

As amostras de leite materno foram recolhidas a partir de 42 mães (por conveniência) em mães diferentes por expressão manual ou com bomba de leite em oito Cidades de Portugal (Coimbra, Aveiro, Lisboa, Lousã, Leiria, Curia, Anadia, Avelãs de Cima, Montemor-o-Velho e Mira), entre 2015 e 2019. As amostras foram refrigeradas e, uma vez no Laboratório, foram congeladas de imediato (-20 °C). Na recolha de amostra de leite materno foram consideradas as orientações propostas por Lovelady *et al.*, (2002). Foram incluídas mães que tiveram parto ao pelo menos um mês (para evitar análise de colostro ou leite de transição), em aleitamento e sem registo de doença. Foram considerados como critérios de exclusão a presença de doença mamária (infeciosa ou tumoral), idade inferior a 18 anos e a ausência da declaração de consentimento informado e/ou questionário preenchido (Bogalho *et al.*, 2018).

2.2. Dados socio-demográficos

As amostras foram recolhidas juntamente com um questionário (ANEXO II). Este questionário incluía uma parte relativa a dados socio-demográficos, relativamente a morada, estação do ano de colheita, idade da mãe, formação escolar e número de filhos. Relativamente à amamentação, o questionário incluía perguntas relativas ao peso do bebé (kg) e características de amamentação, incluindo o tipo de aleitamento materno (exclusivo ou misto) e tempo de amamentação (meses). Adicionalmente, o questionário alimentar semi- quantitativo, relativo à frequência de consumo, nos sete dias anteriores a colheita de amostra, incluía alguns alimentos associados à exposição da população Portuguesa à OTA,

designadamente leite, iogurte, café, arroz, pão, chocolate, bolachas, bolos e frutos secos de acordo com estudos anteriores.

2.3. Determinação analítica

A determinação da OTA, nas amostras de leite materno foi efetuada por meio da técnica imunoenzimática ELISA de formato competitivo de acordo com o livro de instruções e uma nota de aplicação na matriz cedida pelo fabricante (RIDASCREEN® Ocratoxina A 30/15-Biopharm AG®). De forma resumida, as amostras, uma vez descongeladas, foram centrifugadas (Sigma 3K15 centrifuge, Reagente 5, Porto) durante 10 minutos a 3500 g e 4 °C. A camada superior, com gordura, foi removida, e da fração restante, 1,5 mL foram transferidos para um tubo eppendorf®. Procedeu-se a uma nova centrifugação, durante 10 minutos a 3500 g e 4 °C. A camada superior, com gordura, foi removida, e 500 µL da fração restante foram transferidos para um novo tubo eppendorf®.

Foram registadas todas as posições das soluções padrão e das amostras. De seguida, adicionou-se 50 µL das soluções padrão ou amostra preparada, em poços duplicados. Foram adicionados 50 µL do conjugado enzimático diluído em cada poço e misturou-se suavemente agitando a placa manualmente. De seguida a placa foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C), no escuro. Findo o período de incubação, foi descartado o líquido dos poços e bateu-se com força o suporte da microplaca (três vezes seguidas) contra papel absorvente, para garantir a remoção completa do líquido dos poços. Encheram-se todos os poços com 250 µL de tampão de lavagem e foi descartado novamente o líquido. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes.

Foram adicionados 100 µL de substrato cromogéneo a cada poço e misturou-se suavemente, agitando a placa manualmente. Posteriormente, ocorreu incubação durante 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Adicionaram-se 100 µL da solução Stop (ácido sulfúrico) a cada poço e agitou-se a placa manualmente. Por fim e de imediato foi medida a absorvância a 450 nm.

2.4. Avaliação de risco

A ingestão diária estimada (IDE) de OTA foi efetuada de forma determinística, através da fórmula seguinte:

$$\text{IDE (ng/kg b.w./dia)} = [\text{OTA}] [\text{consumo de leite}] / [\text{p.v.}]$$

Nesta fórmula foi incluído o peso médio dos bebés (p.c; kg), o consumo diário médio de leite materno (Consumo de leite; mL/kg) e o teor médio de OTA nas amostras positivas (≥ 50 ng/L; [OTA] em ng/L). No cálculo do pior cenário, o teor médio da micotoxina foi substituído pelo valor máximo de OTA determinado. De acordo com o Ministério da Saúde (s.d) as duas estimativas de consumo de leite materno distinguem os bebés de acordo com o seu peso. Desta forma, para bebés com menos de 7 kg foi considerado um consumo de 150 mL/kg e para bebés com peso igual ou superior a 7 kg, foi considerado um consumo diário de 1 L. No cálculo da EDI para cada grupo, foi calculado o peso médio dos bebés e a concentração de OTA respetiva.

A percentagem da Ingestão Diária Tolerável (TDI) a partir do consumo de leite materno foi calculada como segue:

$$\% \text{ TDI} = \text{EDI/TDI} \times 100$$

Nesta fórmula a TDI considerada resultou da ingestão semanal tolerável proposta pelos organismos JECFA (2007; 14,29 ng/kg p.c./dia) e EFSA (2006; 17,14 ng/kg p.c./dia). No caso dos bebés com menos de 7 kg, foi ainda considerada a ingestão diária tolerável ajustada (EFSA, 2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva padrão ($y = -19,29 \ln(x) + 157,38$), utilizada para cálculo do teor de OTA nas amostras analisadas, demonstrou uma boa linearidade de acordo com o coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,9919$). As 42 mães participantes no estudo apresentavam uma idade compreendida entre os 21 e os 40 anos, sendo que na sua maioria, tinham apenas um filho e apresentavam um nível de escolaridade correspondente ao bacharelato/ licenciatura (tabela II).

Tabela II. Características socio-demográficas das mães participantes no estudo.

Variável	Categoria	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Idade	<30	7	16,7
	[30; 35]	19	45,2
	> 35	16	38,1
Número de filhos	1	22	52,4
	2	17	40,5
	3	3	7,1
Nível de escolaridade	Obrigatória (12º ano)	5	11,9
	Bacharelato/ Licenciatura	28	66,7
	Mestrado/ Doutoramento	9	21,4

Das 42 amostras analisadas, 41 (97,6%) apresentavam valores de OTA acima do limite de detecção (50 ng/L), variando entre 59 e 560 ng/L, com um teor médio de 305 ± 114 ng/L. Comparando com estudos anteriores (Tabela III), a incidência observada foi uma das mais altas. O teor médio de OTA foi superior ao registado no Chile (52 ng/L; Muñoz *et al.*, 2014) e Itália (30 ng/L; Galvano *et al.*, 2008), ainda que inferior ao descrito na Turquia (1380 ng/L; Memis e Yalsin, 2019) e Egípto (1890 ng/L; Hassan *et al.*, 2006).

Já anteriormente havia sido descrita uma contaminação generalizada da População Portuguesa à OTA. As incidências variaram entre 86,4 % num estudo de biomonitorização de OTA em urina com uma amostragem ao longo de dois anos (teor médio de OTA: $0,019 \pm 0,014$ ng/mL; n=472 indivíduos; Duarte *et al.*, 2015) até 100 % num estudo de biomonitorização em sangue (teor médio de OTA: 0,42 ng/mL; n=104 indivíduos; Lino *et al.*, 2008).

Tabela III. Dados de estudos prévios de determinação de OTA em leite materno.

Pais (ano)	Amostra	Caracter.	Número de amostras	Positivas (%)	Intervalo de contaminação (ng/l)	Teor Médio (ng/l)	Técnica Analítica	LOD/LOQ ng/l	Referência
Portugal (2015-2019)	Leite (amostragem de conveniência)	C.I: Mães saudáveis C.E: Idade <18, ausência de declaração informado	42	41 (97,6%)	59,4-559,6	305,5	ELISA	50	Presente estudo
Turquia (2017-2018)	Leite	C.I: Parto <4 meses Idade mãe 29-43anos	122	-	1380	2720	ELISA	-	Memis <i>et al.</i> , (2019)
Irão (Kerman 2016- 2017)	Leite	C.I: Idade 18-41 anos de idade C.E: Doença mamária	84	14 (16,6%)	110-7340	1990±1340	ELISA	3000	Kamali <i>et al</i> (2018)
Irão (2015)	Leite	C.I: Cças	41	1 (2,44%)	45	SI	HPLC-FD	SI	Tgbizadeb <i>et al.</i> , (2017)
Irão (2011)	Leite	SI	87	84 (96,6%)	1,6-60	24,57±13,6	ELISA	SI	Dehghan <i>et al.</i> (2014)
Brasil (São Paulo, 2011-2012)	SI	Leite banco humano	100	66 (66%)	LOQ-21	4	IAC-HPLC-FD	0,3/0,8	Iha <i>et al.</i> (2014)

(C.E., Critério de exclusão; C.I., Critério de inclusão; ELL, Extração Líquido-Líquido; FD, Detector de fluorescência; LOD, Limite de detecção; LOQ, Limite de quantificação; HPLC, Cromatografia de elevada eficiência; IAC, coluna de imunoafinidade)

Tabela III. Dados de estudos prévios de determinação de OTA em leite materno (Cont.)

País (ano)	Amostra	Caracter.	Número de amostras	Positivas (%)	Intervalo de contaminação (ng/l)	Teor Médio (ng/l)	Técnica Analítica	LOD/LOQ ng/l	Referência
Chile (2008; 2010)	Colostro (1-6 dias)	SI	17	14 (82%)	LOD-186	86±59	ELL-HPLC-FD	10/30	Muñoz <i>et al.</i> , 2014
	Leite de transição (15-30 dias)		15	10 (67%)	LOD-81	33±27			
	Leite maturo (2meses)		7	6 (86%)	LOD-52	27±19			
	Leite maturo (4meses)		6	5 (83%)	LOD-43	30±14			
	Leite maturo (6meses)		5	5 (100%)	18-63	44±18			
Irão (2011)	Leite	C.I: Parto < 6 meses C.E: Mães doentes e crianças com má-formação	136	2 (2,72%)	90-140	115	HPLC-FD	SI	Afshar <i>et al.</i> , (2013)
Itália (2007)	Leite	C.I: parto < 3-4 dias	57	41 (78,8%)	LOD-75,1	10±15,6	IAC-CHPLC-FD	0,5-1,0	Biasucci <i>et al.</i> (2011)
Chile (2010)	Leite	C.I: Parto <6 dias	9	9 (100%)	44-184	106±45	ELL-HPLC-FD	10	Muñoz <i>et al.</i> , (2010)
Turquia (2007-2008)	SI	C.I: Bebês hospitalizados C.E: Ausência de declaração informado	75	75 (100%)	620,87-13111	SI	HPLC	10	Gurbay <i>et al.</i> (2009)
Eslováquia (2007)	Leite	C.I: Parto <6meses	76	23(30,2%)	2,3-60,3		IAC-HPLC-FD	4,8/14,4	Dostal <i>et al.</i> , (2008)
Itália (2006)	Leite	C.I: Mães saudáveis	82	61 (74%)	LOQ-405	30,43±66,89	IAC- HPLC-FD	2/5	Galvano <i>et al.</i> (2008)
Polónia (1988-1999)	Leite	C.I: 3-4 dias pós-parto	13	5(38,5%)	LD-17	5,6±4	IAC-HPLC-FD	5/15	Postupolski <i>et al.</i> , (2006)
Brasil (São Paulo) (2005)	Banco de leite humano	Estação do ano: Inverno (2001-2002) Verão (2002)	50: 22 28	2 (4%): 02 (7, %)	10-20 10-20	20	IAC-HPLC-FD	10	Navas <i>et al.</i> (2005)
Itália (1995)	SI	Mães: Hospitalizadas Não hospitalizadas	111: 30 81	22(19,8%): 9 (30%): 13(16%)	100-12000 100-1000 700-12000	SI	HPLC	100	Micco <i>et al.</i> (1995)

(C.E., Critério de exclusão; C.I., Critério de inclusão; ELL, Extração Líquido-Líquido; FD, Detector de fluorescência; LOD, Limite de detecção; LOQ, Limite de quantificação; HPLC, Cromatografia de elevada eficiência; IAC, coluna de imunoafinidade; SI, Sem informação)

Tendo em conta que o teor de micotoxinas no leite está relacionado com os hábitos alimentares maternos, importa realçar que a única amostra negativa correspondeu a leite materno proveniente de uma mãe que, segundo o questionário alimentar, nunca come frutos secos. No período em estudo (2015-2019), das 2335 notificações de micotoxinas registadas no Portal RASFF, 239 (10,24 %) correspondem apenas à OTA. Os principais alimentos contaminados foram frutos secos, designadamente uvas passas, figos secos, amendoim e pistácios, com o valor máximo determinado de 5086 µg /kg, correspondente a uma amostra de figos secos proveniente de Espanha. No mesmo período, 6 das notificações constantes do portal RASFF corresponderam a alimentos contaminados com OTA e produzidos em Portugal, designadamente à base de milho.

Por outro lado, a amostra com o teor de OTA mais elevado correspondeu a uma mãe que, segundo o questionário alimentar, tem como alimentos mais frequentemente consumidos o pão e o café, indicando como um consumo de três vezes ao dia. Segundo o trabalho de Abrunhosa e Col. (2016), com base na contaminação de alimentos registada em Portugal, no caso da OTA, os alimentos que mais contribuíram para a exposição humana foram o arroz (32 %), o pão (19 %) e o café (18 %). De facto, os autores estimaram que 67 % da exposição da população Portuguesa à OTA resulta do consumo de cereais e seus derivados.

A contaminação do café por micotoxinas, acontece fundamentalmente durante o processamento de secagem, armazenamento (Batista *et al.*, 2007; Freire *et al.*, 2016), pré e pós colheita, resultando adicionalmente em perda no rendimento, descoloração, redução do valor nutricional (Fujii *et al.*, 2002). A OTA pode ser encontrada em qualquer fase da produção de café. Também foi encontrada OTA no café da Costa de Marfim a concentração máxima foi de 56 µg/kg. Na Etiópia foi encontrada no café torrado com a concentração de 2,0 µg/kg. No Brasil, em grãos de café a contaminação foi de 3,3 µg/kg, ao passo que no café instantâneo a concentração da OTA foi de 6,29 µg/kg. A OTA também foi encontrada na Suíça em bebidas a base de café, em que a concentração mais elevada era de 4,2 µg/l.

O pão é um dos produtos derivados de cereais mais consumido em quase todo mundo (Paíga *et al.*, 2012). O pão cumpre um papel importantíssimo e destacado no nosso património cultural em geral e gastronómico em particular. É um elemento transversal na alimentação humana (Paíga *et al.*, 2012; Jornal de animação de rede Portuguesa Leader, 2007).

Através do consumo apenas de leite materno, a ingestão diária estimada de OTA foi 41,8 ng/kg/dia, para bebés com um peso inferior a 7 kg, considerando o teor médio de OTA no

leite materno de todos os bebés desta categoria de peso (278,5 ng/L). No caso de bebés com peso igual ou superior a 7 kg a ingestão diária estimada foi de 37,8 ng/kg p.c./ dia, considerando o teor médio de OTA no leite materno de todos os bebés desta categoria de peso (321,1 ng/L). Ambos os valores estimados são superiores à ingestão diária estimada de OTA na população Portuguesa, em geral, conforme calculado por Abrunhosa *et al.* (2016; 1,2 ng/kg p.c./dia) tendo em conta o teor de OTA determinado em alimentos em todos os estudos prévios publicados. Adicionalmente, os valores estimados de ingestão diária correspondem a 243,9 % e 220,5 % da ingestão diária tolerável proposta pela EFSA (2006), para bebés com menos de 7 kg e com peso superior ou igual a 7 kg, respectivamente. No caso, da ingestão diária tolerável proposta pela JECFA (2007), a percentagem da dose diária estimada é superior, especificamente de 292,7 % e 264,7 %, para bebés com menos de 7 kg e com peso superior ou igual a 7 kg, respectivamente. Tendo em atenção o valor de ingestão diária tolerável ajustado para bebés com menos de 16 semanas (5,8 ng/kg p.c./dia), verificou-se que a percentagem da ingestão diária tolerável corresponde a 720,7 %, no caso dos bebés com menos de 7 kg.

Os resultados obtidos são preocupantes, uma vez que os bebés são um grupo populacional vulnerável, devido à sua maior taxa metabólica, menor peso corporal, menor capacidade de desintoxicar, desenvolvimento incompleto de alguns tecidos e órgãos fundamentalmente o sistema nervoso central (Navas *et al* 2005; Kamali *et al.*, 2018). Comparando com estudos prévios, verificou-se que a ingestão diária estimada para ambos os grupos é superior à estimada por Navas (2005; 5 ng/kg pc.dia), Dostal (2008; 20 ng/4 kg pc/dia) e Galvano (2008; 5 ng/kg pc/dia).

4. CONCLUSÕES

O leite materno analisado apresenta uma contaminação generalizada por OTA, com incidência e teor médios superiores a alguns dos registados nos estudos realizados anteriormente. A ingestão diária de OTA estimada para os bebés lactentes foi superior para os bebés com menos de 7 kg, contudo, em ambos os grupos a exposição é superior à estimada para a População Portuguesa adulta e, muito superior aos níveis de ingestão diária tolerável ajustada para bebés.

Assim, os resultados do presente estudo apontam a necessidade de reforçar os programas nacionais de vigilância e estudos de monitorização relativos à OTA, em particular, bem como conceber medidas profiláticas e de controlo para diminuir a presença de OTA no leite materno e a resultante exposição de recém-nascidos em lactação.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDALLA, E. [et. al.] - Human exposure to mycotoxins in Egypt. *Mycotoxin Research*, Vol.18, n.º1 (2002), p. 23-30.

ABREU, A. R. [et. al.] - La ocratoxina A en alimentos de consumo humano. *Nutr Hosp.* 26 (2011) 1215-1226.

ABREU, P. S. (2013) - Incidência de ocratoxina A em vinhos e avaliação da exposição aos consumidores (Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras) Disponível na internet: <https://docplayer.com.br/26586768-priscilla-silva-de-abreu-incidencia-de-ocratoxina-a-em-vinhos-e-avaliacao-da-exposicao-dosconsumidores.html>.

ABRUNHOSA, L [et. al.] - Screening of mycotoxins in food and feed in Portugal: a review. *Revista Bio Ciências*. Vol. 2, n.º1 (2012), p. 5-31. [Acedido a 26 de julho de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24987806>.

ABRUNHOSA, L. [et. al.] - A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. n.º 56 (2016), p. 249-265. [Acedido a 13 de Maio de 2019]. Disponível na internet: www.researchgate.net/publication/263710628_A...

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R.; VENANCIO, A. - Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*. 2 (2010) 1078-1099.

AFSHAR, P. [et. al.] - Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran. *Food Control* 31 (2013) 525-529. [Acedido a 24 de Abril de 2019]. Disponível na internet: [journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont](http://journal.homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont).

ALMELA L. [et. al.] - Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. *Food Microbiol.* 24 (2007) 319-327. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17189757>.

ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. - Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. (2017), P. 1-20. [Acedido a 13 de Maio de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486318/>.

ALVITO, P. [et. al.] - Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Anal Methods*. 3 (2010) 22-30.

AMADO, M. A. - Métodos Imunológicos na detecção e determinação de Aflatoxinas em alimentos: Vantagens e Inconvenientes. *Millenium - Revista do ISPV*. Vol. 26 (2002). Disponível na internet http://www.ipv.pt/millenium/Millenium26/26_21.htm.

ANDERSON, H. A.; WOLFF, M. S. – Environmental contaminants in human milk. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. Vol. 10 (2000), p. 755-760 .

ARALT, S. M. [et. al.] - Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Additives and Contaminants*. Vol. 18, n.º 4 (2001), 321-327. [Acedido a 24 de Abril de 2019]. Disponível na internet: <http://brage.bibsys.no/hhe/>

ARANHA, M. do R. - O nosso pão. *Jornal de animação da rede portuguesa leader +*. II, n.º 46 (2007), p. 1-20. [Acedido a 12 de Agosto de 2019]. Disponível na Internet: www.leader.pt

ARMANDO, M. R. [et. al.] - Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*. 2012. ISSN 1364-5072.

BANDO, É. [et. al.] - *Biomarkers for assessment of human exposure to mycotoxins*. *J Bras Patol Med Lab*. Vol. 43, n.º 3 (2007), p. 175-180.

BANKOLE, S.A.; ADEBANJO, A. - Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2, n.º 9, (2003), p. 254-263.

BARROS, T. L. (2014) - Ocorrência de micotoxinas no leite. (Tese de Graduação. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Araçatuba) Disponível na internet: <https://docplayer.com.br/72139412-Ocorrencia-de-micotoxinas-no-leite.html>.

BATISTA, L. R. [et. al.] - Incidence of ochratoxin A in fraction diferents coffee beans (*Coffea Arabica* L): boia, mixes and varrição. *Ciênc. agrotec., Lavras*. Vol. 31, n.º 3 (2007), p. 804-813.

BATISTA, L. R. [et. al.] - Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arábica* L.). *International Journal of Food Microbiology*. 85 (2003) 293-300. [Acedido a 17 de julho de 2019]. Disponível na internet: <https://www.researchgate.net/publication/10647574> Toxigenic fungi associated with processed green coffee beans *Coffea arabica* L.

BERNABUCCI, U. [et. al.] - Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology in Vitro*. 25 (2011), p. 684-691.

BHAT, R. [et. al.] - Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol. 9 (2010), p. 57-81.

BIASUCCI, G. [et. al.] -The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. *Eur J Nutr*. 50 (2011), p. 211-218. [Acedido a 11 de junho de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20812016>.

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

BORCHERS, A. [et. al.] (2010) - Food safety. *Clinic Aev Allerg Immunol*. 39 (2010) 95-141.

CARRATÙ, B. [et. al.] - Nitrogenous components of human milk: non-protein nitrogen, true protein and free amino acids. *Food Chemistry*, Vol. 81, n.º 3 (2003), p. 357-362.

CAST - Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report. Council for Agricultural Science and Technology: Ames. n.º 139 (2003), p. 1-217.

CEC - Commission of the European Communities. (2006). Commission Regulation (EC) n.º 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union* L-364:5-24.

CERAIN, A. de L. [et. al.] - Efectos tóxicos de la Ocratoxina A. *Rev Toxicol*. 17 (2000) 1-24.

CERAIN, A. L. - Ocratoxina a: exposición en españa y nuevos aspectos sobre su toxicidad. *Revista de Toxicología*, Vol. 20, n.º 2 (2003), p. 72-73. [Acedido a 12 de Julho de 2019]. Disponível na internet: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91920205>.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. - Ochratoxin-A incidence in different coffee (*Coffea arabica* L.) berry fractions. *Coffee Science, Lavras*. Vol. 1, n.º 1 (2006), p. 28-35.

CEC - Commission of the European Communities. (2010). Commission Regulation (EC) n.º 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) n.º 1881 (2006). setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Ochratoxin A. *Off J Eur Union* L-35:7-8.

CORCUERA, L. A. [et. al.] (2012) - An approach to the toxicity and toxicokinetics of aflatoxin B1 and ochratoxin A after simultaneous oral administration to fasted F344 rats. *Department of Nutrition, Food Sciences, Physiology and Toxicology*. p. 1 - 22.

CUNHA, M. - Aleitamento materno e prevenção de infecções. Rev Port Clin Geral 25 (2009) 356-362. [Acedido a 11 de Junho de 2019]. Disponível na internet: <http://www.rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/download/10632/10368>.

DEGHAN, P. [et. al.] - Prevalence of Ochratoxin A in Human Milk in the Khorrambid Town, Fars Province, South of Iran. Jundishapur J Microbiol. (2014), p. 1- 4. [Acedido a 21 de Maio de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4216574/>.

DIETRICH D. R. [et. al.] - Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). Food Additives and Contaminants. Suppl. 1 (2005) 45-52.

DOSTAL, A. [et. al.] - Results of the first studies of occurrence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. Bratisl Lek Listy. 109 (2008), 276-278. [Acedido a 30 de Abril de 2019]. Disponível na Internet: link.springer.com/article/10.1007/s00204-013-1168-4.

DRAGUSEL, R. - Biomarkers of mycotoxin exposure in humans. (2011). faculty of veterinary Medicine. Department for risk assessment sciences, Lisboa, Portugal.

DUARTE, S. C. - Human Ochratoxin A Biomarkers - from exposure to affect. Critical Reviews in Toxicology. (2011), p. 1-27. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401326>.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. - Ochratoxin A in Portugal: A Review to Assess Human Exposure. Toxins 2. (2010), 1225-1249. [Acedido a 08 de Setembro de 2019]. Disponível na Internet: www.mdpi.com/journal/toxins.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. - Human ochratoxin A biomarkers - From exposure to effect. Critical Reviews in Toxicology. Vol. 41, n.º 3 (2011), p. 187-212. [Acedido a 19 de Julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401326>.

DUARTE, S.; LINO, C.; PENA, A. - Ochratoxin A in food and urine: A nationwide Portuguese two-year study. World Mycotoxin J. 8. (2015), 121-132. Disponível na Internet: www.researchgate.net/publication/274751734...

EFSA - European Food Safety Authority. (2017) - Guidance on the risk assessment of substances present in food intended for infants below 16 weeks of age. EFSA J., in print.

EFSA - European Food Safety Authority. (2004) - Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to ochratoxin A

(OTA) as undesirable substance in animal feed (Request No EFSA-Q-2003-039). EFSA J 101. 1-36.

EFSA - European Food Safety Authority. (2006) - Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal. 365 p. 1-56.

ELIKA (2013) - Fixa de Ocratoxina A. 1-4. Disponível na internet: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/20.Ocratoxina-A.pdf>.

ETZEL, R. A. - What the primary care pediatrician should know about syndromes associated with exposures to mycotoxins. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. (2006) p. 282-305.

FABIANE, D. T.; OLIVEIRA, N. E. (2013) - Investigação de fungos contaminantes em rações comerciais para consumo humano. Universidade do Oeste de Santa Catarina, Brasil.

FAPOHUNDA, S.O. [et. al.] - Ochratoxins - A review. Basic Research Journal of Agricultural Science and Review. Vol. 3, n.º 11 (2014), p. 105-115. [Acedido a 12 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://pdfs.semanticscholar.org/34a3/520f1d659ed68189d3011dd75aaa6b0241f7>

FESTAS, I. [et. al.] (2000) - Ochratoxin A in some portuguese Wines: method validation and screening in Port wine and vinho verde. Am J Enol Vitic 51 (2000) 150-154.

FRAGA, M. E. [et. al.] - Fungos potencialmente ocratoxígenos em café. 1ª. Rio de Janeiro: Embrapa. 2003. [Acedido a 7 de junho de 2019]. Disponível na internet: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/doc53>.

FREIRE, F. [et. al.] - Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. 1ª. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. [Acedido a 16 de julho de 2019]. Disponível na internet: <http://www.cnpat.embrapa.br > jss > avervo>.

FREIRE, Í. [et. al.] - Ocorrência de ocratoxina A em café (coffea arábica L.) moído, tipo forte e tradicional embalado a vácuo. In: Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos Alimentação: a árvore que Sustenta a vida. 25, Brasil. X CIGR Section IV International Technical Symposium Food: the tree that sustains life. [s.i.]: [s.n.], 2016.

FUCHS, R.; HULT, K. - Ochratoxin A in blood and its pharmacokinetic properties. Fd chem. Toxic. Vol. 30, n.º 3 (1992), p. 201-204.

FUJII, S. [et. al.] - Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. Semina: Ciências Agrárias, Londrina Vol. 23,

n.º 2 (2002), p. 273-292. [Acedido a 04 de Agosto de 2019]. Disponível na internet: www.researchgate.net/publication/272656248...

GALVANO, F. [et. al.] - Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Mol Nutr Food Res.* 52 (2008). 496-501. [Acedido a 22 de fevereiro de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338407>.

GHIASIAN, SA.; MAGHSOOD, AH. - Infants' Exposure to Aflatoxin M1 from Mother's Breast Milk in Iran. *Iranian J Publ Health.* Vol. 41, n.º (2012), p. 119-126. [Acedido a 22 de junho de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3481700/>.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M.; FELICIO, J. - Análise de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. Instituto Biológico, Centro de Sanidade Animal. Vol. 63, n.º 1. (2001), p. 15-19.

GONZÁLEZ, M. J. A. (2014) - Suscetibilidade de *aspergillus* sp. aos ácidos orgânicos conforme pH e a influência destes sobre a produção de ocratoxina A. (Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologias dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria do Brasil). Disponível na internet: <http://repositorio.ufsm.br> > GONZÁLEZ, MARIA DE JESÚS ALCANO.

GUILLAMONT, E. M. [et. al.] - A comparative study of extraction apparatus in HPLC analysis of ochratoxin A in muscle. *Anal Bioanal Chem* 383 (2005) 570-575.

GÜRBAY, A. [et. al.] Ochratoxin A: Is it present in human breast milk samples obtained mothers from Ankara, Turkey (2009). *Applied Toxicology*, S232.

HAN, Z. [et. al.] - *In Vitro* Glucuronidation of ochratoxin A by rat liver microsomes. *Toxins.* 5 (2013) 2671-2685.

HASSAN, A. [et. al.] - Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants. *Pediatr Nephrol.* 21 (2006) 102-105.

HOELTZ, M. [et. al.] *Ochratoxin A: quality analysis of brazilian and imported wines.* *Braz. J. Food Technol.* IV (2012), p. 58-63. [Acedido a 24 de março 2019]. Disponível na Internet: <http://bjft.ital.sp.gov.br>.

HOLMBERG, T. [et. al.] - *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds. *Mycopathologia.* 116 (1991) 169-176.

IARC (International Agency for Research on Cancer) - Aflatoxins. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56 (1993), p. 245-395.

IARC (International Agency for Research on Cancer) - Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Vol. 56 (1993), p. 489-521.

IHA, M. H. [et. al.] - Aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Control*. 40 (2014), p. 310-313. [Acedido a 14 de abril de 2019]. Disponível na internet: journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont.

INNIS, S.M. - Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Pediatrics*. Vol. 143 (2003). p. S1-S8 [Acedido a 10 de setembro de 2019] disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597908>.

ITO, S.; LEE, A. - Drug excretion into breast milk: an overview. *Advanced drug delivery reviews*, Vol. 55, n.º 5 (2003), p. 617-27.

JARDIM, A.; CALDAS, E. - Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Quim. Nova*. Vol. 32, n.º 7 (2009), p. 1898-1909.

JONKER, J.W. [et. al.] - The breast cancer resistance protein BCRP (ABC G2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nature Medicine*. Vol. 11 (2005), p. 127-129.

JONSYN F.; MAXWELL S.M.; HENDRICKSE, R.G. - Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. *Mycopathol*. 131 (1995) 121-126.

JUAN, C. [et. al.] - Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection. *Talanta* 73 (2007) 246-250.

JUAN, C. [et. al.] (2008a) - Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food Chem*. 107 (2008) 525-530.

JUAN, C. [et. al.] (2008b) - Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal. *Int J Food Microbiol*. 127 (2008) 284-289.

JUAN. C. [et. al.] - Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection. *Talanta* 73 (2007) 246-250.

KAMALI, A. [et. al.] - Detection of ochratoxin A in human breast milk in Jiroft city, south of Iran. *Curr Med Mycol*. Vol. 3 n.º 3 (2018), p. 1-4. [Acedido a 21 de maio de 2019].

Disponível na internet:<https://www.researchgate.net/publication/324576407> Detection of ochratoxin A in human breast milk in Jiroft city south of Iran.

KHOURY, A.; ATOUI A. - Ochratoxin A: General Overview and Actual molecular Status. *Toxins*. 2 (2010), p. 461-493. [Acedido a 05 de junho de 2019]. Disponível na internet: www.mdpi.com/journal/toxins.

KLARIĆ, M. [et. al.] - Cytotoxic and genotoxic potencies of single and combined spore extracts of airborne OTA-producing and OTA-non-producing *Aspergilli* in human lung A549 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 120 (2015) 206-214.

KOSZEGI, T.; POÓR, M. - Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*. Vol. 8, n.º 111 (2016), 1-25. [Acedido a 2 de junho de 2019].

LAMANAKA, B.; OLIVEIRA, I.; TANIWAKI, M. - Micotoxinas em alimentos. *Anais da academia pernambucana de ciência agrônômica, recife*. Vol. 7, (2010).

LANDRIGAN, P. J. [et. al.] - (2002) Chemical Contaminants in Breast Milk and Their Impacts on Children's Health: an Overview Mini-Monograph. *Environmental Health*. Vol. 110, n.º 6 (2002) 313-315.

LEITÃO, A. L. - Occurrence of ochratoxin a in coffee: Threads and solutions-A mini-review. *Beverages*. Vol. 5, n.º 36 (2019). [Acedido a 2 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.mdpi.com/2306-5710/5/2/36>.

LEVY, L. - Um Acto de Amor. 1ª. Lisboa: Esfera dos Livros, 2011. ISBN 978-989-626-284-6.

LEVY, L.; BÉRTOLO, H. - Manual de Aleitamento Materno. 2012. ISBN 978-972-96436-1-3.

LINO C. M. [et. al.] - Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. *Food Chem Toxicol*. 46 (2008). 879-885.

LINO C.M. [et. a.] - Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. *Food Chem Toxicol*. 46 (2008) 879-885.

LIM, P. W. (2010) - Development Of An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) For The Detection Of Pistachio Residues In Processed Foods. University of Nebraska.

LOCATELLI, B.; COSTA, P. - O processo de amamentação e suas implicações para a mãe e seu bebê. *Mental*. ano VI Barbacena. n.º 10 (2008), p. 85-102. [Acedido a 13 de maio de 2019].

- LOMBAERT, A. [et. al.] - Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Addit Contam* 20 (2003) 494-504.
- LOVELADY, C. [et. al.] - Guidelines for collection of human milk samples for monitoring and research of environmental chemicals. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*. Vol. 65 n.º 22 (2002) 1881-1891.
- MAGNOLI, C. [et. al.] - Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathol* 161 (2006) 53-58.
- MAHDAVI, R. [et. al.] - Determination of aflatoxin M1 in breast milk samples in Tabriz Iran. *Maternal and child health journal*. Vol. 14, n.º1 (2010), p. 141-145.
- MALIR, F.; - Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*. 8, 191. (2016), p. 1-41. [Acedido a 13 de maio de 2019]. Disponível na internet: www.mdpi.com/journal/toxins.
- MALIR, F.; OSTRY, V.; NOVOTNA, E. - Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Rev.* (2013), 1-15. [Acedido a 16 de junho de 2019]. Disponível na internet: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15569543.2013.782504>.
- MALLY, A.; DEKANT, W. - DNA adduct formation by ochratoxin A?: a review of the available evidence. *Food Additives and Contaminants*. (2011), 1-21. [Acedido a 11 de julho de 2019]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16332624>.
- MARANHÃO, P. - Panificação. Os ingredientes enriquecedores. *Food ingredientes Brasil*. n.º 10 (2009), p. 22-27. [Acedido a 12 de agosto de 2018] Disponível na Internet: <https://docplayer.com.br/user/16887087/>.
- MARQUES, E. S. [et. al.] - Mitos e crenças sobre o aleitamento materno. *Ciências & saúde coletiva*. Vol. 16, n.º 5 (2011), 2461-2468. [Acedido a 13 de maio de 2019]. Disponível na internet: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141381232011000500015&script=sci_abstract&tlng=pt.
- MARTINS, A.; - Micotoxinas contaminantes do café. (2003) (Trabalho Científico de Graduação em Ciências da Nutrição. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto) Disponível na internet: <http://hdl.handle.net/10216/54820>.
- MATHIEU, V. D. [et. al.] - Differences in Maternal Immunoglobulins within Mother's Own Breast Milk and Donor Breast Milk and across Digestion in Preterm Infants. *Nutrients*. Vol.

11 n.º 920 (2019), p. 1-14. [Acedido a 15 de maio de 2019]. Disponível na Internet: www.mdpi.com/journal/nutrients.

MCQUEEN, C. A. - *Comprehensive toxicology*. 2ed. Elsevier. (2010) p. 74-82.

MEMIŞ, E. Y.; YALÇIN, S. S. - Human milk mycotoxin contamination: smoking exposure and breastfeeding problems. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. ISSN: 1476-7058. (2019), p. 1-26. [Acedido a 29 de abril de 2019]. Disponível na internet: <https://www.tandfonline.com/loi/ijmf20>.

MICCO, C. [et. al.] - Evaluation of ochratoxin A in human milk in Italy. *Food Additives and Contamination*. 12 (1995), 351-354. [Acedido a 08 de abril de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713599661>.

MINISTÉRIO DA SAUDE 2016. Disponível na internet: [http://www.cham,min.saude.pt/NR/rdonlyres/16E49B8CB2A84FB2ACBBD3BD9AA0E0D3/22925Alimenta%C3%A7%C3%A3onoIoanovidapdf](http://www.cham.min.saude.pt/NR/rdonlyres/16E49B8CB2A84FB2ACBBD3BD9AA0E0D3/22925Alimenta%C3%A7%C3%A3onoIoanovidapdf).

MIRAGLIA M, BRERA C. (2002). Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States: Reports of experts participating in Task 3.2.7. Directorate-General Health and Consumer Protection, Rome: Italy.

MUÑOZ K. [et. al.] - Exposure of infants to ochratoxin A with breast milk. *Archives in Toxicology*. 88 (2014), 837-846. [Acedido a 17 de abril de 2019]. Disponível na internet: https://www.academia.edu/30785564/Exposure_of_infants_to_ochratoxin_A_with_breast_milk.

NARDO, O. [et. al.] - Adesão do Aleitamento Materno Exclusivo Segundo a Ótica das Mães Usuárias da USF Santa Augusta - Marília/SP. Vol. 3, n.º3 (2014), p.197-214. [Acedido a 14 de outubro de 2019]. Disponível na internet: <https://www.researchgate.net/publication/305301412>.

NAVAS, S. A. (2003) - Possível exposição de crianças as aflatoxinas M1 e ocratoxina A, através do leite materno na Cidade de São Paulo. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - SP) Disponível na internet: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/256162>.

NAVAS, S. A. [et.al] - Aflatoxin M1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 22, 5 (2005) 457-462.

NETO, M. T. [et. tal.] - Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. *Acta Pediatr Port*, Vol. 1, n.º 37 (2006), p. 23-26.

- NEVILLE, M. C. [et. al.] Lactation and neonatal nutrition: Defining and Refining. *Journal of Mammary Gland Biol Neoplasia*. Vol. 17, n.º 2 (2012), p. 167-188.
- NIKNEJAD, F [et.al] - Ochratoxin A in Cow's Milk Collected from Cattle Farms of Golestan Province Medical Laboratory Journal. Vol. 10, n.º 1 (2016), p. 1-5.
- NOGUEIRA, S; LIVEIRA, P. - Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. *Revista da SPCNA*. Vol. 12, n.º 2 (2006), p. 69-75. [Acedido a 10 de julho de 2019]. Disponível na internet: <http://www.spcna.pt/publicacoes/?imc=7n&publicacao=21&edicao=60&fmo=pa>
- OLIVEIRA, F. [et. al.] - Principais micotoxinas que afetam a produção de alimentos. *RAMVI, Getúlio Vargas*, Vol. 2, n.º 3 (2015), p. 1-12.
- PAÍGA, P. [et. al.] - Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*. 135 (2012) 2522-2528.
- PAÍGA, P. [et. al.] (2012) - Determination of ochratoxin a in bread: evaluation of microwave-assisted extraction using an orthogonal composite design coupled with response surface methodology. *Food Bioprocess Technol*. 6 (2013) 2466-2477.
- PASIN, A. De ALMEIDA, R. De ABREU, S. - Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.) *Acta bot. bras.* 23, 4 (2009) 1129-1132.
- PATIN, R. V. [et.al] - The influence of sardine consumption on the omega-3 fatty acid content of mature human milk. *Jornal de Pediatria*. Vol. 82, n.º1 (2006), p. 63-69.
- PENA, A [et.al] - Ochratoxin A survey in Portuguese wine by LC-FD with direct injection. *Talanta* 82 (2006) 1556-1561.
- PENA, A. [et.al] - Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem* 382 (2005) 1288-1293.
- PENA, A. [et.al] - Ochratoxin A survey in Portuguese wine by LC-FD with direct injection. *Talanta* 82 (2010) 1556-1561.
- PENA, A.; CEREJO, F.; LINO, C. SILVEIRA, I. - Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*. 382 (2005) 1288-1293.
- PERAICA, M. [et.al] - Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*. Vol. 77, n.º 9 (1999) 754-766.

PEREIRA, L. (2008) – Estratégias para o controlo de ocratoxina A em alimentos. (Tese de doutoramento em Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho, Escola de Engenharia). Disponível na internet: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/7746/1/Tese%20de%20doutoramento>.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, F. C.; - Micotoxina e seu potencial carcinogénico. Ensaios e ciências biológicas, agrárias e da saúde. Vol. 15, n.º 4 (2011), p. 147-165. [Acedido a 17 de abril de 2019]. Disponível na internet: <https://pgsskroton.com.br/seer/index.php/ensaioeciencia/article/download/2868/2725>.

PICCIANO, M. F. - Nutrient composition of human milk. *Pediatric clinics of North America*, Vol. 48, n.º 1 (2001), p. 53-67.

PIMENTA, J.; VILELA, R. - Composição microbiana e ocratoxina a no café (*coffea arabica* l.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. *Ciênc. agrotec., Lavras*. Vol.27, n. 6 (2003), p. 1315-1320.

PITT, J. MILLER. J - A concise history of mycotoxin research. *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 7021-7033.

POSTUPOLSKI, J. [et.al] - Ochratoxin A and foetal blood and in maternal milk. *Rocz Panstw Zakl Hig* 57, 1 (2006), 23-30. [Acedido a 17 de abril de 2019]. Disponível na internet: link.springer.com/article/10.1007/s00204-013-1168-4.

RAI, M.; VARMA, A. - *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*. Berlin: Springer-Verlag. (2010) 405.

RASFF. (n.d.).RASFFportal.<https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/>

RATOLA, N.; ALVES, A. (2004) - Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results. *Anal Chim Acta* 513:319-324.

RIBEIRO, E. (2007) - Contaminação Toxicológica de Resíduos Vitivinícolas - Ocratoxina A. (Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Engenharia Universidade do Porto). Disponível na internet: <http://repositorio-aberto.up.pt> > bitstream.

RINGOT, D. [et. al.] - Toxicocinética e toxicodinâmica de ocratoxina A, uma atualização. *Chem. Biol. Interagir.* 159 (2006) 18-46.

ROLDÃO, A.; Costa, A.; Torres, A. - Avaliação da potencial exposição a contaminantes em grávidas. *Riscos e Alimentos* nº 10 (2015) p. 4-16.

- ROMÃO, P.; [et al.] - Aleitamento materno: O que mudou em 12 anos. *Nascer e Crescer - Birth and growth medical journal*. Vol XXVI, n.º 3 (2017), p. 171-177. [Acedido a 13 de maio de 2019]. Disponível na internet: www.researchgate.net/publication/322384571...
- ROSA, C. [et. al.] - Mycobiota and naturally-occurring ochratoxin A in dairy cattle feed from Rio de Janeiro State, Brazil. *World Mycotoxin Journal*. Vol. 1 n.º 2 (2008), 195-201. [Acedido a 17 de julho de 2019]. Disponível na internet: <https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/WMJ2008.1009>.
- SANCHIS, V. [et. al.] - Stability of deoxynivalenol and ochratoxin A Through the Bread-Making Process. In: *Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014*. São Paulo: Blucher Food Science Proceedings. Blucher, 2014.
- SANTIAGO, L. B. [et. al.] - Incentivo ao aleitamento materno: a importância do pediatra com treinamento específico. *J Pediatr* Vol. 79 n.º 6 (2003) 504-512. [Acedido a 17 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.scielo.br/pdf/jped/v79n6/v79n6a08>.
- SANTOS, M. [et. al.] - Ochratoxin A-producing fungi in commercial granola. *Rev Inst Adolfo Lutz*. Vol. 72, n.º 3 (2013), 206-210. [Acedido a 6 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/insitutoadolfolutz/publicacoes/rial/10/rial723com>.
- SANTOS, M. C. [et. al.] - Micotoxinas e seu potencial como agentes de guerra. *Revista Virtual de Química*. Vol. 6, n.º 3 (2014), 761-778. [Acedido a 7 de junho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.uff.br/rvq>.
- SCHILTER, B. [et. al.] - Ochratoxin A: Potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food Additives and Contaminants. Suppl. I* (2005) 88-93.
- SCOTT, P. M. [et. al.] - Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 22, s1 (2006), 99-107.
- SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. (2006) - Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Lett Appl Microbiol* 42:42-47.
- SHERIF, S. O.; SALAMA, E. E.; ABDEL-WAHHAB, M. A. - Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. *International journal of hygiene and environmental health*, Vol. 212, n.º 4 (2009), p. 347-68.
- SILVA, J. O. [et. al.] (2006) - Incidence of aflatoxins in rice to be consumed by militaries in the brazilian army by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography methods. *Ciênc. agrotec., Lavras*. Vol. 32, n.º 4 (2008) 1238-1244.

SILVA, R. A. [et. al.] (2005) - Ocorrência de aflatoxinas em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. *ciênc. agrotec., lavras*, Vol. 31, n.º 2 (2007) p. 439-447.

SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A. (2009) - Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. *Química Nova*. Vol. 32, n.º 5, p.1253-1261.

SILVA, R. da A. [et. al.] - Inquiry on the consumption of meals susceptible to contamination by mycotoxins in alimentary ingesta of scholars of the city of Lavras, MG *Ciênc. agrotec., Lavras*, Vol. 31, n.º 2 (2007) p. 439-447.

SKAUG, M. A. STØRMER, F. C. SAUGSTAD, O. D. Ochratoxin A: a naturally occurring mycotoxin found in human milk samples from Norway. *Acta Pædiatrica*. Vol. 87 (1998) p. 1275-1278.

SOARES C, A. L. (2013) - Portuguese Society for Microbiology Magazine. *Fungos produtores de micotoxinas: impacto na segurança alimentar* , p. 1-9.

SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. (2013) - Fungos produtores de micotoxinas. Cmanaia. [Acedido a 5 de junho de 2019]. Disponível na Internet: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/27316...>

SOTO, J. B. [et. al.] - Blood, breast milk and urine: potential biomarkers of exposure and estimated daily intake of ochratoxin A: a review. *Food Addit Contam. A*. Vol. 33, n.º 2 (2016), p. 313-328.

SOUZA, C. M. [et. al.] - Measurement of the Inactivation of Ochratoxin by Gamma Radiation. An example of the Potential use of Ionizing Radiation in decontamination of chemical agentes. *Rev. Virtual Quim*. Vol. 6, n.º 3 (2014), p. 779-794.

SOUZA, F. de F. [et. al.] - Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. 1ª. Porto Velho: Embrapa, 2004. [Acedido a 6 de agosto de 2019]. Disponível na Internet: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54346/1/Doc93-cafe.pdf>.

STEFANO, V. D. [et. al.] - Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Additives & Contaminants: Part A* (2014), p. 1-6.

TOZLOVANU, M. [et. al.] - Glutathione conjugates of ochratoxin A as biomarkers of exposure. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 63 (2012) 417-427.

- TOZLOVANU, M. [et. al.] - Ochratoxin A in roasted coffee purchased in French super market. Transfer in coffee beverage: Comparison of several methods. *Toxins*. 2 (2010) 1928-1949.
- TURNER, P. C. [et. al.] - Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *International Journal of Epidemiology*. Vol. 36, n.º 5 (2007), p. 1119-1125.
- UEKANE, T. M. [et. al.] - Comparison of methods of analysis for ochratoxin A in coffee: a review. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, Vol. 2, n.º 1/2 (2010), 44-54. [Acedido a 6 de agosto de 2019]. Disponível na Internet:<https://revistascientificas.ifrj.edu.br/revista/index.php/revistapct/article/view/21/131>.
- ULASZEWSKA, M. M. [et. al.] - The effect of waste combustion on the occurrence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk in Italy. *Chemosphere*, Vol. 82, n.º 1 (2011), p. 1-8.
- VALITUTTI, F. [et. al.] - Assessment of Mycotoxin Exposure in Breastfeeding Mothers with Celiac Disease. *Nutrients*. Vol.10, n.º 336 (2018), p. 1-9.
- VAN DER MERWE, K. J. [et. al.] - Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965, 205. 1112-1113.
- VETTORAZZI, A. [et. al.] - A review on ochratoxin A transcriptomic studies. *Food and Chemical Toxicology*. 59 (2013) 766-783.
- VIDAL, A. [et. al.] - Mycotoxin Biomarkers of Exposure: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 17, (2018) 1127-1155.
- VIDAL, A. [et. al.] - Stability of DON and OTA during the breadmaking process and determination of process and performance criteria. *Food Control* 40 (2014) 234-242.
- VISCONTI, A. [et. al.] - Managing Ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants*. Vol. 25, n.º 2 (2008) 193-202.
- WALSH, C.T.; NEVILLE, M. C. - Effects of xenobiotics in milk excretion and composition. *Rev Literat Arts of Am*, Vol. 5 (1994) p. 418-41.
- WARTH, B. [et. al.] (2016) - Biomonitoring of Mycotoxins in Human Breast Milk: Current State and Future Perspectives. *Chem Res Toxicol*. 29 (2016) 1087-1097.

WASEEM, A. [et. al.] (2014) - Human exposure to mycotoxins: a retrospective review of leading toxins and metabolites in human biological matrices. Journal- Chemical Society of Pakistan, 1-20.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; NOLL, I. B. - Aspects related to the presence of toxigenic fungi in grapes and ochratoxin A in wines. Ciência Rural, Santa Maria. (2009). ISSN 0103-8478. 1-9. 91570-901.

WMA. (n.d.). <https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-ofhelsinki/>.

Accessed 4 April 2017.

YUHAS, R.; PRAMUK, K.; LIEM, E. L. - Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. Lipids, Vol. 41, n.º 9 (2006), p. 85-858.

ZAIN, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 129-144.

ZINEDINE, A. (2010) - Ochratoxin A in moroccan foods: Occurrence and legislation. Toxins, 1121-1133.

ZIVKOVIC, A. M. [et. al.] - Human milk glyco-biome and its impact on the infant gastrointestinal mi-robota. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.108, Suppl.1 (2011), p. 4653-4658.

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

PARTE I: PÁGINA DAS INFORMAÇÕES

Por favor, leia com atenção a seguinte informação.

Introdução

Neste estudo pretende-se avaliar o grau de exposição das mães em lactação e, em resultado, dos bebés e crianças lactentes, a contaminantes como pesticidas, bisfenóis, poluentes e micotoxinas. Antes de decidir, poderá falar com qualquer pessoa com a qual se sinta confortável. De igual forma, se não entender alguma das palavras ou termos utilizados, poderá perguntar a quem efectua o questionário ou outro investigador presente.

Objectivos

É possível que o grau de exposição a alguns contaminantes, de origem natural (como as micotoxinas) ou artificial (como os agro-químicos) a um grupo da população vulnerável como os bebés e crianças lactentes não seja bem conhecido, pelo que é importante realizar estudos que possam, no futuro, contribuir para um conhecimento que sustente acções de prevenção, bem como apoio a regulamentação da utilização de alguns agroquímicos.

Tipo de intervenção

Recolha de leite materno e questionário.

Seleção de participantes

Pretende-se analisar um grande número de amostras, provenientes de várias regiões de Portugal, a fim de que o estudo seja representativo.

Participação voluntária

Não é obrigatória a participação no estudo. A qualquer momento a participante poderá abandonar o estudo, sem qualquer prejuízo.

Procedimento

No dia de recolha da amostra de leite é 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.

Benefícios

Não existirá nenhum benefício imediato e directo, mas a sua participação provavelmente irá ajudar-nos a ter um conhecimento científico mais amplo, que irá permitir a implementação de medidas adequadas de prevenção e controlo da exposição.

Pagamento

Da participação no estudo não decorrem quaisquer pagamentos ou contrapartidas.

Confidencialidade

Não será partilhada qualquer informação da mãe fora da equipa do estudo. 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.

Partilha dos resultados de investigação

Será garantida a confidencialidade e o seu anonimato, 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 recolhidos servirão somente para a elaboração do trabalho. No final do estudo, serão partilhados os resultados com as participantes (informação individual) e a comunidade científica (informação colectiva, 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 Prof. Dr.ª Angelina Pena, através do e-mail apena@ci.uc.pt ou telefone 239 488 400.

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

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.

Nesta sequência, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos dados que, de forma voluntária forneço, confiando que apenas serão utilizados para este estudo 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 exacta 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__

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__
Código interno: _____	Hora: __h__

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

MÃE:

Idade: _____ anos

Peso: _____ kg

Altura: _____ cm

Número de filhos: _____

Medicação na última semana: Não Sim: qual: _____

Fumadora activa/passiva: Não Sim

BÉBE:

Data de nascimento: ____/____/____

No momento da recolha de leite:

Peso do bebé: _____ kg

Ao nascimento:

Peso do bebé: _____ kg

Comprimento do bebé: _____ cm

II. DADOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS DA MÃE

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

Ensino Primário/Básico

Ensino Secundário (≤12ºano)

Ensino Superior (Bacharelato/Licenciatura) Mestrado/ Doutoramento

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
LACTÍCIOS	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
OVOS, CARNES E PEIXE	OVOS (1 UNIDADE)								
	AVES (FRANGO E PERÚ) (2 peças ou ¼ frango)								
	VACA (1 porção = 120g)								
	PORCO (1 porção = 120g)								
	OUTRAS CARNES (1 porção = 120g)								
	ENCHIDOS E FUMADOS (e.g. FIAMBRE, CHOURIÇO, SALPICÃO, PRESUNTO, SALSICHAS, TOUCINHO, BACON) (2 fatias ou 3 rodéias)								
PEIXE ((1 porção = 120g)									

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
VEGETAIS	SOPA (1 prato)								
	LEGUMES/ SALADAS (1 porção)								
	FRUTA (4 peças)								

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)								