

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Vanessa Duarte Vidal

**DETERMINAÇÃO DE AFM1 NO LEITE  
MATERNO**  
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE LACTENTES EM  
ANGOLA

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

Outubro de 2020





UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Vanessa Duarte Vidal

**DETERMINAÇÃO DE AFM1 NO LEITE  
MATERNO**  
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE LACTENTES EM  
ANGOLA

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

Outubro de 2020



## Agradecimentos

---

Mais uma etapa do meu percurso académico prestes a ser concretizada. Gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que contribuíram, de uma forma direta ou indireta, para a elaboração desta dissertação com o sentimento de objetivo cumprido.

À Professora Doutora Angelina Pena, orientadora da dissertação, pela oportunidade de ingressar neste projeto, pela cordialidade com que sempre me recebeu e pelo apoio neste percurso.

À Professora Doutora Sofia Duarte, coorientadora da dissertação, por todo o apoio prestado ao longo da realização deste trabalho e pelo contributo na partilha de conhecimentos. Quero expressar o meu profundo reconhecimento pela total disponibilidade, pela simpatia e pelo incentivo constante. Foi um percurso com alguns obstáculos desafiadores, mas conseguimos!

À Professora Doutora Anabela Almeida e ao Professor Doutor Sérgio Sousa pela vossa colaboração na realização da parte experimental deste trabalho.

Aos meus amigos pelo vosso incentivo e apoio incondicional, em especial à Cristiane Curci e à Ana Rita Seco, colegas de mestrado.

À minha família, pais e irmãos, pela vossa paciência e motivação constante.

E, por fim, não poderia deixar de agradecer a todas as participantes, assim como à Enfermeira Marta Gimbi pelo auxílio na colheita das amostras de leite materno.

A todos, o meu sincero OBRIGADA.



## Resumo

---

As aflatoxinas são contaminantes que ocorrem naturalmente numa variedade de produtos agrícolas em todo o mundo, e que podem ter implicações sérias para a saúde humana e animal. A incidência destas toxinas é tendencialmente maior nos países da África Subsaariana e do Sudeste Asiático, onde o clima tropical e subtropical, as inadequadas práticas agrícolas e as condições precárias de armazenamento das culturas propiciam o seu desenvolvimento. A aflatoxina M1 (AFM1), o principal metabolito da aflatoxina B1 (AFB1), pode ser encontrada no leite materno após a exposição da mãe. Considerando os efeitos toxicológicos das aflatoxinas, esta contaminação constitui um potencial risco para os lactentes. O presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência e os níveis de AFM1 no leite materno de participantes residentes em Belize, província de Cabinda, em Angola, e avaliar a exposição dos lactentes a esta toxina. No total, foram analisadas 37 amostras de leite materno, recolhidas em agosto-setembro de 2018 e em agosto de 2019, e analisadas através do ensaio imunoenzimático ELISA. Não foram detetados níveis de AFM1 acima do limite de deteção (5,0ng/L). Apesar do clima propício predominante nesta região, sugere-se que um nível socioeconómico mais elevado, a residência em áreas urbanas e os hábitos alimentares da mãe possam ter sido fatores determinantes destes resultados. Uma vez que as aflatoxinas são substâncias cancerígenas, é importante a implementação de medidas preventivas da infeção por fungos produtores, existência de regulamentação e programas que envolvam um controlo e monitorização dos níveis de contaminação dos alimentos. Considera-se que, dado os benefícios da prática do aleitamento materno, esta deve ser incentivada sempre que possível, principalmente nos países em desenvolvimento. Futuramente, será importante a realização de novos estudos de avaliação da exposição dos lactentes, envolvendo outras regiões em Angola, que visem a monitorização contínua da sua exposição, visto que constituem um grupo de risco.

**Palavras-chave:** aflatoxina B1; aflatoxina M1; leite materno; lactentes; exposição alimentar.

## **Abstract**

---

Aflatoxins are naturally occurring contaminants in a variety of food crops worldwide and can pose a serious health threat to humans and animals. The incidence of these toxins tends to be higher in Southeast Asian and Sub-Saharan African countries where the tropical and subtropical climate, poor agricultural practices and storage conditions favor their development. Aflatoxin M1 (AFM1), the major metabolite of aflatoxin B1 (AFB1), can be found in breast milk as a result of maternal exposure. Considering the toxicological effects of aflatoxins, this contamination is a potential risk for infants. The present study aimed to determine the occurrence and levels of AFM1 in breast milk from participants residing in Belize, province of Cabinda, Angola and to assess infants' exposure to this toxin. A total of 37 breast milk samples were collected in August-September 2018 and in August 2019, then analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). AFM1 was not detected above the detection limit (5.0ng/L). Despite the prevailing climate in this region, it is suggested that a higher socioeconomic level, living in urban areas and the mother's eating habits may have been determining factors of these results. Since aflatoxins are carcinogenic substances, it is important to implement measures to prevent aflatoxin-producing fungi infections, existing regulations, and programs for monitoring and controlling levels of aflatoxins in foods. It is considered that, given the benefits of breastfeeding, it should be encouraged whenever possible, especially in developing countries. In the future, it will be important to carry out further exposure studies of breastfed infants in other regions of Angola, to continuously monitor their exposure, as they are considered a risk group.

**Keywords:** aflatoxin B1; aflatoxin M1; breast milk; infants; dietary exposure.

# Índice

---

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	III
<i>Abstract</i> .....	IV
Índice .....	V
Índice de Tabelas.....	VII
Índice de Figuras.....	VIII
Lista de Abreviaturas .....	IX
1. Introdução.....	I
Parte I – Revisão Bibliográfica.....	5
2. Aflatoxinas .....	6
2.1. Perspetiva histórica .....	6
2.2. Fungos Micotoxigénicos .....	6
2.2.1. Condições para a contaminação .....	7
2.2.2. Fungos Aflatoxigénicos.....	9
2.3. Propriedades Físicas e Químicas .....	13
2.4. Metabolismo da AFB1 .....	15
2.4.1. <i>Carry-over</i> da AFMI para o leite.....	19
2.5. Toxicidade .....	20
2.5.1. Toxicidade Aguda.....	22
2.5.2. Toxicidade Crónica.....	23
2.5.3. Toxicidade da AFMI .....	29
2.6. Ocorrência nos Alimentos .....	31
2.7. Legislação.....	34
3. Avaliação da Exposição Humana.....	37
3.1. Biomonitorização Humana .....	38
3.2. Métodos Analíticos.....	39
Parte II – Trabalho Experimental .....	43
4. Justificação e contextualização do estudo .....	44
5. Material e Métodos.....	46
5.1. Amostragem.....	46
5.2. Dados sociodemográficos e consumo alimentar .....	46
5.3. Determinação de AFMI .....	47
5.4. Quantificação de AFMI .....	48
5.5. Ingestão Diária Estimada .....	48

6. Resultados e Discussão.....	50
7. Conclusões .....	58
8. Referências Bibliográficas.....	59
Anexos .....	69
ANEXO I – Termo de consentimento informado (2018).....	70
ANEXO II – Termo de consentimento informado (2019) .....	71
ANEXO III – Questionário sociodemográfico (2018) .....	72
ANEXO IV – Questionário de frequência alimentar (2018) .....	73
ANEXO V – Questionário sociodemográfico (2019) .....	74
ANEXO VI – Questionário de frequência alimentar (2019) .....	76
ANEXO VII: Resultados obtidos com o método ELISA.....	78

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1 - Valores ótimos de temperatura e $a_w$ para o crescimento de <i>A. flavus</i> e para a produção de aflatoxinas em diferentes substratos, obtidos em laboratório. ....	11
Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas das aflatoxinas. ....	15
Tabela 3 - Ocorrência de aflatoxinas nos produtos alimentares de diferentes países. ....	33
Tabela 4 - Limites máximos permitidos para a presença de aflatoxinas em diferentes produtos alimentares e segundo diferentes organismos. ....	36
Tabela 5 - Principais características sociodemográficas e dados antropométricos da população em estudo (mães lactantes e bebês). ....	50
Tabela 6 - Ocorrência de AFMI em amostras de leite materno de acordo com estudos recentes. ....	52

## Índice de Figuras

---

Figura 1 - Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas durante a cadeia alimentar (adaptado de Bryden, 2012). .....	8
Figura 2 - Estrutura química das principais aflatoxinas.....	14
Figura 3 - Metabolismo da AFBI.....	18
Figura 4 - Exposição de mães lactantes e bebês a alimentos contaminados com aflatoxinas..	20
Figura 5 – Mecanismos propostos da AFBI para induzir a desnutrição e o déficit de crescimento.....	30
Figura 6 - Curva de calibração obtida a partir das soluções padrão de diferentes níveis de concentração (0, 5, 10, 20, 40, 80ng/L). .....	51

## Lista de Abreviaturas

---

AFAR – Aflatoxina aldeído redutase

AFBI – Aflatoxina B1

AFBI-FAPY – AFBI-formamidopirimidina

AFBI-N7-Gua – 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-AFBI

AFB2 – Aflatoxina B2

AFB2a – Aflatoxina B2a

AFBO – AFBI-8,9-epóxido

AFG1 – Aflatoxina G1

AFG2 – Aflatoxina G2

AFL – Aflatoxicol

AFM1 – Aflatoxina M1

AFM2 – Aflatoxina M2

AFPI – Aflatoxina P1

AFQ1 – Aflatoxina Q1

ALARA – tão baixo quanto razoavelmente possível (*As Low As Reasonably Achievable*)

$a_w$  – Atividade da água

CE – Comissão Europeia

CEBEA – Comissão de Ética e Bem-Estar Animal

CYP – citocromo P450

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DP – Desvio Padrão

EDI – Ingestão diária estimada (*Estimated Daily Intake*)

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

ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

EUA – Estados Unidos da América

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

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (*Food and Drug Administration*)

G – Guanina

GSH – glutationa

GST – Glutationa S-transferase

HBsAg<sup>-</sup> – Negatividade para o antígeno de superfície do VHB

HBsAg<sup>+</sup> – Positividade para o antígeno de superfície do VHB

HI – quociente de perigo (*Hazard Index*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography*)

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor*)

JECFA – Comité Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*)

LC – Cromatografia líquida (*liquid chromatography*)

LD – Dose letal

LOD – Limite de detecção

OMS – Organização Mundial da Saúde

RASFF – Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais (*Rapid Alert System for Food and Feed*)

RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

T – Timina

TDI – ingestão diária tolerável (*Tolerable Daily Intake*)

TLC – Cromatografia em camada fina (*Thin-layer chromatography*)

UE – União Europeia

UHT – Ultrapasteurizado

UNICEF – Fundo Internacional de Emergência das Nações Unidas para as Crianças (*United Nations International Children's Emergency Fund*)

UV – Ultravioleta

VHB – Vírus da hepatite B

WMA – Associação Médica Mundial (*World Medical Association*)

YES – Extrato de levedura com sacarose (*Yeast Extrat Sucrose*)

## I. Introdução

A contaminação de alimentos representa um dos principais desafios de segurança alimentar a nível global. Em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a existência de cerca de 600 milhões de casos de doenças com origem alimentar, que provocou a morte a aproximadamente 420 mil indivíduos. Foram vários os agentes causadores desses incidentes, entre os quais vírus, bactérias, parasitas e micotoxinas (Havelaar *et al.*, 2015).

As micotoxinas são contaminantes químicos que ocorrem naturalmente numa variedade de produtos agrícolas (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016). São metabolitos secundários tóxicos, de baixo peso molecular, produzidos por uma diversidade de fungos filamentosos, incluindo os pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Claviceps*. No seu conjunto, estes fungos são responsáveis pela produção de mais de 400 micotoxinas diferentes, variáveis quanto à sua estrutura química, propriedades, prevalência e grau de toxicidade (Agriopoulou, Stamatelopoulou e Varzakas, 2020; Pereira, Fernandes e Cunha, 2012; Warth *et al.*, 2016). A contaminação de alimentos com micotoxinas é considerada inevitável, constituindo um desafio para os responsáveis da segurança alimentar uma vez que, regra geral, estes compostos não são facilmente destruídos durante o processamento de alimentos dada a sua estabilidade face a tratamentos térmicos, físicos e químicos (Alshannaq e Yu, 2017).

Entre as várias micotoxinas existentes, destacam-se as aflatoxinas, uma das mais importantes tendo em conta o seu impacto na saúde. De facto, estas são consideradas um dos agentes carcinogénicos naturais mais potentes (Eskola *et al.*, 2019). As aflatoxinas são produzidas por algumas espécies de fungos do género *Aspergillus*, amplamente encontrados numa grande variedade de produtos agrícolas, entre os quais o milho e outros cereais, frutos secos como o amendoim, nozes e amêndoas, e especiarias (Alshannaq e Yu, 2017; Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). Além disso, pode ocorrer contaminação dos animais através da ração, o que afeta indiretamente a cadeia alimentar humana visto que as aflatoxinas podem ser transferidas para o leite, ovos e carne, constituindo um risco para os consumidores (Marchese *et al.*, 2018; Pereira, Fernandes e Cunha, 2012).

A contaminação dos alimentos por fungos produtores de aflatoxinas pode ocorrer no campo, na colheita, durante o transporte e armazenamento do produto, dependendo de diferentes fatores, como as condições climáticas e práticas agrícolas (Pereira, Fernandes e Cunha, 2012; Warth *et al.*, 2016). Embora as aflatoxinas estejam difundidas por todo o mundo, a sua contaminação é prevalente nos países da África Subariana e do Sudeste Asiático (Benkerroum, 2020a). Esta elevada incidência deve-se essencialmente ao clima tropical e

subtropical predominante nestas regiões, às inadequadas práticas agrícolas e condições precárias de armazenamento das culturas que, conseqüentemente, propiciam o desenvolvimento de fungos e a formação das aflatoxinas (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016). Em 2004, foi estimado que aproximadamente 4,5 mil milhões de pessoas em países em desenvolvimento eram expostas cronicamente a níveis não controlados de aflatoxinas, realçando a dimensão desta problemática (Williams *et al.*, 2004).

As aflatoxinas mais estudadas são a aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e a aflatoxina G2 (AFG2), dada a sua elevada toxicidade e ocorrência nos alimentos (Benkerroum, 2020a). A principal via de exposição às micotoxinas, quer para o ser humano quer para os animais, é através da ingestão de alimentos contaminados, embora possa ocorrer exposição por contacto dérmico ou por inalação (Al-Jaal *et al.*, 2019; Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). As aflatoxinas provocam efeitos mutagénicos, genotóxicos, teratogénicos, hepatotóxicos e imunossuppressores (Alshannaq e Yu, 2017). Nas crianças, a exposição às aflatoxinas pode ainda estar associada ao atraso no crescimento, desnutrição e comprometimento neurológico (Giovati *et al.*, 2015). Reconhecidas as suas propriedades carcinogénicas, as aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) foram classificadas pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC, 2012) no grupo I (carcinogénicas para humanos), sendo a AFB1 a micotoxina com maior carcinogenicidade conhecida. Esta aflatoxina tem sido extensamente associada à ocorrência de carcinoma hepatocelular, e existe evidência de que atua sinergicamente com o vírus da hepatite B (VHB) (Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). Com base em dados experimentais em animais e evidências epidemiológicas de cancro do fígado, o Comité Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA - *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), estimou o fator de potência carcinogénica da AFB1. Nesta avaliação de risco verificaram que, nos indivíduos com positividade (HBsAg<sup>+</sup>) e com negatividade (HBsAg<sup>-</sup>) para o antigénio de superfície do VHB, a potência foi de 0,3 e 0,1 cancros/ano/100 000 habitantes por ng de AFB1/kg peso corporal/dia, respetivamente (Benkerroum, 2020a).

Como consequência das implicações para a saúde pública e bem-estar animal, a contaminação de produtos alimentares com aflatoxinas acarreta um impacto negativo sobre a disponibilidade de alimentos, a economia, bem como o comércio internacional, sendo que os países em desenvolvimento são os mais afetados. Esta contaminação reduz o valor dos produtos no mercado, ou pode mesmo levar à sua rejeição no comércio internacional. As perdas associadas assumem especial relevância nos países mais vulneráveis, em que a produção agrícola, e a sua exportação, representa uma percentagem considerável da sua economia (Benkerroum, 2020a; Udomkun *et al.*, 2017).

Outra aflatoxina que constitui motivo de preocupação é a aflatoxina M1 (AFM1), o principal metabolito da AFBI. Embora seja menos tóxica, a AFM1 tem sido associada a efeitos carcinogénicos e imunossupressores, à semelhança da AFBI. Este metabolito pode ser encontrado no leite, inclusivamente no leite materno humano, após a ingestão de alimentos contaminados com AFBI (Marchese *et al.*, 2018). O leite materno é nutricionalmente completo e com propriedades imunológicas importantes para o bebé, que permite um desenvolvimento saudável. Apesar dos seus incontestáveis benefícios, o leite materno pode ainda conter contaminantes químicos, como as aflatoxinas, resultantes da exposição da mãe (Fakhri *et al.*, 2019). Esta contaminação é bastante preocupante visto que os bebés e as crianças constituem um grupo particularmente vulnerável devido à sua fisiologia e dieta mais restrita (Pereira, Fernandes e Cunha, 2012).

Atendendo ao facto de as aflatoxinas constituírem um importante problema de saúde pública, o panorama global relativo à presença destes contaminantes nos alimentos tem suscitado grande preocupação junto das autoridades competentes (Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). Na tentativa de salvaguardar a saúde dos consumidores, várias entidades implementaram legislação que estabelece teores máximos permitidos destes contaminantes nos géneros alimentícios (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016). A monitorização rigorosa nos países desenvolvidos quanto ao cumprimento da legislação, a consciencialização dos produtores e consumidores, e a tecnologia aplicada no processamento alimentar, tem permitido reduzir a exposição destas populações às aflatoxinas. Em contraste, a escassez de recursos e de tecnologias, e a incapacidade para implementar ou controlar as normas regulamentares, contribui para a elevada exposição a estas toxinas nos países em desenvolvimento (Benkerroum, 2020a; Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016).



**Parte I**  
**Revisão Bibliográfica**

## **2. Aflatoxinas**

### **2.1. Perspetiva histórica**

A infeção de culturas agrícolas por certos fungos, e o desenvolvimento dos problemas de saúde associados, remonta ao período do Neolítico com o início da agricultura, há cerca de 12 000 anos. O aumento da atividade agrícola levou à necessidade de criar espaços para o armazenamento das colheitas, principalmente de cereais, que ficavam expostos à infeção por fungos, dada a inadequação das instalações. Consequentemente, ocorriam surtos, inexplicáveis na época, afetando humanos e animais domesticados (Benkerroum, 2019). Ao longo da história, é possível encontrar diversas referências a intoxicações provocadas por micotoxinas nos alimentos. Uma das primeiras ocorrências conhecidas diz respeito ao ergotismo, doença causada pela ingestão de centeio e seus produtos derivados contaminados com micotoxinas produzidas pelo fungo *Claviceps purpurea*. Foram documentadas epidemias recorrentes de ergotismo na Idade Média, principalmente na Europa (Benkerroum, 2019; Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). No entanto, foi a descoberta das aflatoxinas que impulsionou o surgimento da micotoxicologia moderna. Esta ocorreu na sequência de um surto, em Inglaterra, em 1960, conhecido como “Turkey X disease” (doença X dos perus), que provocou a morte a mais de 100 000 perus. Estes animais apresentavam sinais de envenenamento, cuja análise *post-mortem* revelou uma inflamação intestinal grave e necrose hepática. O Doutor Blount, médico veterinário e consultor em criação de aves, liderou as primeiras investigações, onde concluiu que a morte destas aves estava relacionada com a ingestão da ração à base de amendoim proveniente do Brasil, que mostrou ser extremamente tóxica. Mais tarde, foi descoberto que o agente causador destes incidentes eram metabolitos do fungo *Aspergillus flavus*, denominados então de “Aflatoxinas” (toxinas de *A. flavus*) (Benkerroum, 2019; Rushing e Selim, 2019).

Este episódio despoletou o interesse nestes metabolitos tóxicos, resultando numa vasta onda de investigação focada na caracterização das aflatoxinas, e eventual existência de outras micotoxinas, seus fungos produtores e as condições ecológicas para a sua ocorrência. Pretenderam ainda definir a sua toxicidade e a extensão da contaminação em alimentos e rações, com o intuito de determinar a exposição e os riscos para a saúde (Benkerroum, 2019; Bryden, 2012).

### **2.2. Fungos Micotoxigénicos**

Os fungos micotoxigénicos podem colonizar uma grande variedade de culturas agrícolas e acumular substâncias químicas de baixo peso molecular, as micotoxinas, nos produtos infetados (Patriarca e Fernández Pinto, 2017; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Estes metabolitos secundários tóxicos não são essenciais para o crescimento do fungo que os

sintetiza (Patriarca e Fernández Pinto, 2017), no entanto acredita-se que consiste num mecanismo de defesa contra insetos predadores, conferindo alguma vantagem competitiva às estirpes produtoras (Benkerroum, 2020a). Do ponto de vista da segurança alimentar e da saúde pública, as espécies de fungos mais relevantes pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Lee e Ryu, 2017; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Ressalva-se, no entanto, que, embora vários fungos tenham a capacidade de produzir uma ou mais micotoxinas, nem todos os fungos são micotoxigénicos, ou seja, nem todos produzem micotoxinas. Além disso, nem todos os metabolitos secundários produzidos são tóxicos (Bryden, 2012; Patriarca e Fernández Pinto, 2017).

A contaminação dos alimentos inicia-se com os esporos destes fungos filamentosos, disseminados no ar e nos solos que, quando as condições são favoráveis, germinam e infetam as culturas (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Globalmente, a segurança alimentar é frequentemente comprometida pela presença de micotoxinas nos cereais. Esta ocorrência constitui um desafio para a indústria alimentar, comunidade científica e autoridades governamentais em todo o mundo. As perdas de colheitas resultantes da acumulação de micotoxinas provocam um impacto económico significativo, incluindo custos associados à rejeição de alimentos e rações contaminadas, redução da produção animal, aumento de custos na saúde, e investimento em projetos de investigação e regulamentação, que visem a redução ou eliminação de micotoxinas nos produtos finais (Neme e Mohammed, 2017).

### **2.2.1. Condições para a contaminação**

Apesar dos esforços para controlar a infeção por fungos micotoxigénicos, estes são ubíquos na natureza e ocorrem frequentemente na cadeia alimentar (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). A contaminação por micotoxinas pode ocorrer ao longo de todo o percurso produtivo, nomeadamente no campo, antes e/ou após a colheita, durante o transporte e armazenamento (Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). A produção de micotoxinas depende essencialmente da presença destes fungos, suscetibilidade da cultura, condições ambientais favoráveis, bem como das práticas agrícolas e condições de cultivo, manuseamento e armazenamento (Figura 1) (Bryden, 2012; Patriarca e Fernández Pinto, 2017). Salienta-se que, embora a contaminação de produtos alimentares com micotoxinas esteja condicionada pelo desenvolvimento de fungos micotoxigénicos, a presença destes fungos não implica forçosamente a presença de micotoxinas (Lee e Ryu, 2017).

Diferentes fatores determinam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas, entre eles a temperatura, a humidade, a atividade da água ( $a_w$ ), o pH, a concentração de oxigénio e dióxido de carbono, a integridade física do grão ou da planta e a composição do substrato

(Bryden, 2012; Patriarca e Fernández Pinto, 2017). Especificamente, é a interação entre estes fatores que determina a incidência desta contaminação (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Condições de temperatura e humidade elevadas são geralmente ideais para estes fungos, induzindo a sua germinação, crescimento, esporulação e produção de micotoxinas (Paterson e Lima, 2017).

Contudo, os requisitos ecológicos para o crescimento de fungos e para a produção de micotoxinas podem variar consideravelmente entre espécies, dependendo da sua adaptação a diferentes matrizes alimentares e condições ambientais (Bryden, 2012; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). O estudo recente de Gruber-Dorninger e col. (2019), realizado à escala global, constatou que existe uma variação geográfica quanto à ocorrência de micotoxinas, e que o clima foi determinante nessa distribuição mundial. Apesar desta variação, sabe-se que as micotoxinas ocorrem com abundância em regiões com clima quente, representadas sobretudo por países em desenvolvimento, onde muitas culturas agrícolas são produzidas e posteriormente exportadas (Paterson e Lima, 2017).

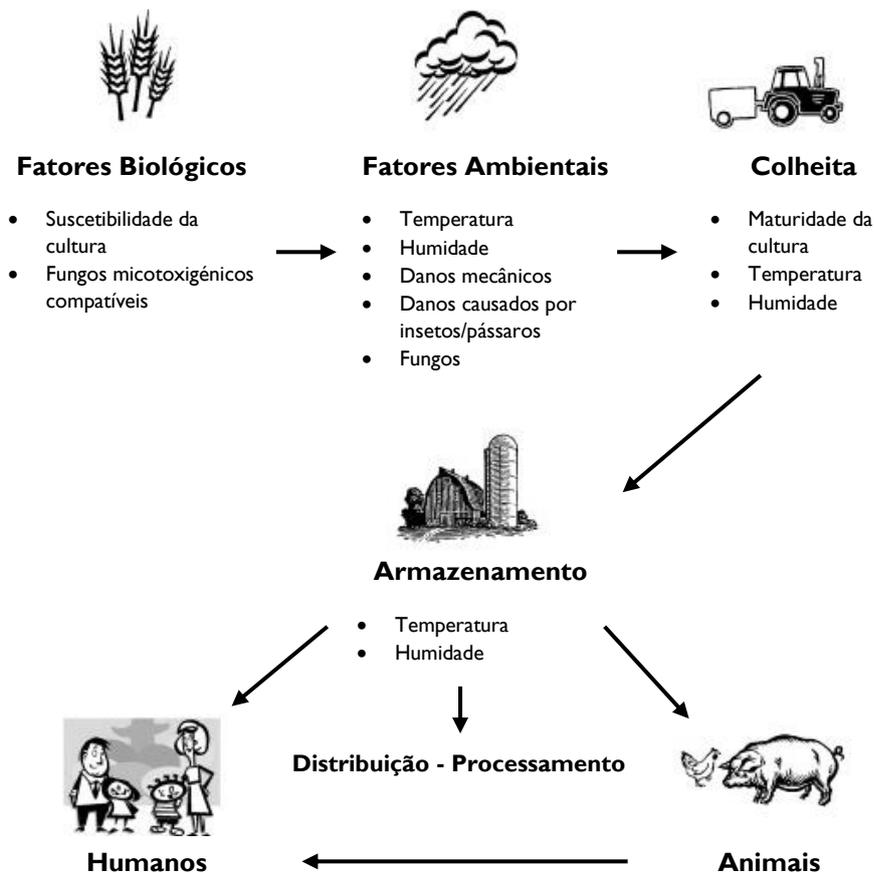


Figura 1 - Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas durante a cadeia alimentar (adaptado de Bryden, 2012).

### 2.2.2. Fungos Aflatoxigénicos

Todas as espécies de fungos produtoras de aflatoxinas conhecidas pertencem ao género *Aspergillus*. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, pertencentes à secção *Flavi*, são as espécies aflatoxigénicas mais importantes e representativas dada a sua ampla distribuição nos produtos agrícolas. *A. flavus* produz exclusivamente aflatoxinas da série B, sendo que apenas 40% das suas estirpes são produtoras destas toxinas. Ainda assim, é considerado o fungo mais amplamente reportado em alimentos. Por sua vez, *A. parasiticus* produz aflatoxinas das séries B e G, e todas as estirpes são produtoras destas micotoxinas. Tal como a maioria dos fungos, a incidência dos fungos aflatoxigénicos varia de acordo com a cultura agrícola e a localização geográfica (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). *A. flavus* é ubíquo nos solos, estando adaptado a uma grande variedade de climas e produtos alimentares (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012; Rushing e Selim, 2019). Em regiões com temperatura mínima inferior a 20°C, os níveis de infeção por *A. flavus* são inferiores comparativamente a regiões com clima mais quente (temperatura mínima superior a 25°C) (Cotty e Jaime-Garcia, 2007). Esta espécie ocorre sobretudo associada às culturas de milho e amendoim (Taniwaki, Pitt e Magan, 2018). Já *A. parasiticus* apresenta uma distribuição mais restrita, e é melhor adaptado ao ambiente do solo, contaminando predominantemente culturas rasteiras como o amendoim (EFSA, 2020; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012).

Embora as aflatoxinas estejam extensamente distribuídas por todo o mundo, a sua prevalência é maior em algumas regiões, dependendo das condições climáticas, práticas agrícolas e danos físicos das culturas provocados por insetos. O nível de desenvolvimento de um país e a existência de medidas efetivas de controlo e legislação são também fatores responsáveis pela extensão da contaminação dos alimentos com aflatoxinas. Considerando estes fatores, a maior incidência é reportada nos países do Sudeste Asiático e da África Subsariana, primeiramente dadas as condições climáticas favoráveis, e de seguida o baixo estatuto económico que agrava significativamente o risco de contaminação (Benkerroum, 2020a). O clima quente e húmido, com períodos de seca seguidos de períodos de máxima precipitação, é predominante nestas regiões tropicais e subtropicais, fornecendo as condições ideais para o crescimento de fungos aflatoxigénicos e produção de aflatoxinas (Benkerroum, 2019). Em contraste, o clima temperado verificado na Europa geralmente não favorece a infestação das culturas com estes fungos, sendo que a contaminação por aflatoxinas está maioritariamente relacionada com géneros alimentícios importados (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019; Paterson e Lima, 2017). No entanto, as atuais alterações climáticas estão a influenciar os padrões de ocorrência destas micotoxinas em todo o mundo. Os períodos de seca e temperaturas elevadas (>35°C) recorrentes na Europa nos últimos anos, têm permitido a colonização das

culturas de milho por *A. flavus*. Consequentemente, tem sido observado um aumento da contaminação por aflatoxinas, que já desencadeou surtos relacionados com a sua presença no milho e no leite (AFMI), particularmente em 2003 e 2012, em países do sul e centro da Europa, como a Itália, Sérvia, Hungria e Croácia (Paterson e Lima, 2017).

### **2.2.2.1. Requisitos para o crescimento de fungos aflatoxigênicos e produção de aflatoxinas**

Como referido anteriormente, o crescimento de fungos aflatoxigênicos e a biossíntese de aflatoxinas dependem de fatores como a  $a_w$ , temperatura, composição do substrato, pH, atmosfera e tempo de armazenamento (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012; Tai *et al.*, 2020). Em particular, a interação entre a temperatura e a  $a_w$  do substrato é considerada determinante na regulação do crescimento destes fungos e na produção das suas toxinas (Tai *et al.*, 2020). Têm sido desenvolvidos vários estudos com o intuito de determinar os parâmetros de temperatura e  $a_w$  ideais para a sua ocorrência. De uma forma geral, os dados reportados revelam que o crescimento de *A. flavus* pode ocorrer numa ampla gama de temperaturas, podendo variar entre 10°C e 48°C, com um crescimento ótimo próximo de 33°C. Trata-se de um fungo xerófilo, sendo capaz de crescer a uma  $a_w$  mínima de 0,78, mas com um crescimento ótimo entre 0,97 e 0,99 (Paterson e Lima, 2017; Pitt e Hocking, 2009; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Quanto ao pH, o crescimento de *A. flavus* ocorre entre 2,1 e 11,2. Fisiologicamente, *A. parasiticus* é muito semelhante a *A. flavus* (Pitt e Hocking, 2009). No que diz respeito à produção de aflatoxinas, normalmente os requisitos ecofisiológicos são mais restritos que aqueles necessários para o crescimento fúngico (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Dos dados reportados, a temperatura ótima para a síntese de aflatoxinas encontra-se entre os 28°C e 30°C e a  $a_w$  ótima superior a 0,95 (Paterson e Lima, 2017; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Adicionalmente, tem sido demonstrado que a expressão dos principais genes reguladores da biossíntese de aflatoxinas (*AflR* e *AflS*) é significativamente influenciada pela interação entre a temperatura e a  $a_w$  (Liu *et al.*, 2017; Tai *et al.*, 2020). De acordo com a literatura consultada (Gallo *et al.*, 2016; Tai *et al.*, 2020), as condições ótimas de temperatura e  $a_w$  são, no entanto, variáveis devido às diferenças na composição nutricional dos substratos e meios utilizados, assim como a diversidade de estirpes de fungos. Por esta razão, existem certas discrepâncias entre os resultados dos vários estudos desenvolvidos. A Tabela I sumariza alguns resultados obtidos por diferentes autores.

Tabela I - Valores ótimos de temperatura e  $a_w$  para o crescimento de *A. flavus* e para a produção de aflatoxinas em diferentes substratos, obtidos em laboratório.

Substrato	<i>A. flavus</i>		Aflatoxinas		Referência
	Temperatura	$A_w$	Temperatura	$A_w$	
Meio de cultura YES <sup>(1)</sup>	30–35°C	0,99	25–30°C	0,99	Abdel-Hadi et al. (2012)
Milho	30°C	0,99	25-30°C	0,99	Bernáldez et al. (2017)
Amendoim	37°C	0,98	28°C	0,96	Liu et al. (2017)
Arroz	33°C	0,90	33°C	0,96	Lv et al. (2019)
Sorgo	37°C	0,99	37°C	0,99	Lahouar et al. (2016)
Amêndoa	28°C	0,96	28°C	0,96	Gallo et al. (2016)

<sup>(1)</sup> Meio de agar com extrato de levedura com sacarose (YES)

Como consequência das diferentes adaptações ecofisiológicas, os fungos são tipicamente classificados como fungos de campo e fungos de armazenamento, consoante a predominância da sua infeção. Os fungos do género *Aspergillus* são geralmente saprófitas, conhecidos como fungos de armazenamento, melhor adaptados a baixas  $a_w$  e a temperaturas mais elevadas. *A. flavus* tem a particularidade de conseguir infetar culturas agrícolas tanto no campo como durante o armazenamento. Em regiões com clima temperado, este fungo é predominante no armazenamento das culturas, no entanto, perante climas tropicais e subtropicais, com épocas de seca, estes podem infetar também as plantas na fase da pré-colheita (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012; Taniwaki, Pitt e Magan, 2018).

A contaminação das culturas por aflatoxinas por ser dividida em duas fases distintas: no período de pré-colheita e de pós-colheita (Cotty e Jaime-Garcia, 2007). De uma forma geral, a acumulação destas micotoxinas, tanto antes como após a colheita, reflete amplamente as condições climáticas (Bryden, 2012). No campo, as culturas em desenvolvimento são habitualmente resistentes à infeção por *A. flavus*. No entanto, os danos físicos provocados por insetos, pássaros ou até mesmo por granizo, as condições de temperatura elevada e sobretudo o stress hídrico, causado por períodos de seca, predispõem as plantas a esta infeção (Cotty e Jaime-Garcia, 2007; Pinotti et al., 2016). Concretamente, estes fatores afetam a fisiologia das plantas, e os seus mecanismos de resistência, tornando-as mais suscetíveis (Benkerroum, 2020a; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Para além dos insetos danificarem o revestimento do grão, considerado como barreira natural, estes podem ainda atuar como vetores de esporos, permitindo a dispersão dos fungos aflatoxigénicos (Neme e Mohammed, 2017). Nesta fase, as culturas de milho, amendoim e sementes de algodão, nos EUA, são particularmente

propensas à infecção por *A. flavus*, e ainda por *A. parasiticus* no caso do amendoim. Em contrapartida, *A. flavus* parece infetar as restantes culturas apenas na fase de pós-colheita (Taniwaki, Pitt e Magan, 2018). Após esta infecção, o crescimento fúngico pode ter continuidade no período de pós-colheita e armazenamento (Cotty e Jaime-Garcia, 2007).

A segunda fase ocorre posteriormente à maturação das culturas, durante a colheita, transporte, armazenamento, processamento e distribuição (Alshannaq e Yu, 2017; Cotty e Jaime-Garcia, 2007). Nesta fase, os fatores críticos para a infecção de fungos, e a subsequente síntese de aflatoxinas, incluem a época e as condições da colheita, o teor de humidade do substrato, a adequação do processo de secagem, o tipo e a qualidade das infraestruturas de armazenamento, bem como a infestação de insetos nestas instalações. Algumas práticas como o atraso da colheita, principalmente se as culturas foram sujeitas a períodos de chuva, ou o atraso do processo de secagem, aumentam consideravelmente a concentração destas micotoxinas (Neme e Mohammed, 2017). Num estudo recente sobre a contaminação de diferentes produtos alimentares em países da África Subariana, Ingenbleek e col. (2019) revelaram que as amostras de milho colhidas durante a estação chuvosa continham concentrações superiores de aflatoxinas, comparativamente às amostras colhidas na estação seca.

A adequação das condições de armazenamento desempenha um papel fundamental na extensão da contaminação por aflatoxinas (Benkerroum, 2020a). *A. flavus* é uma das principais espécies encontradas nos produtos armazenados, sendo capaz de crescer a baixas  $a_w$  e em ambientes com temperaturas mais elevadas. Consequentemente, esta contaminação é considerada um dos problemas mais sérios de segurança alimentar em todo o mundo, particularmente em regiões com climas quentes e húmidos (Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Durante o armazenamento, a temperatura e o teor de humidade do substrato são os principais fatores para o desenvolvimento de fungos e produção de aflatoxinas (Neme e Mohammed, 2017). Idealmente, o valor da  $a_w$  das culturas deve ser inferior a 0,70 para evitar a proliferação de fungos produtores de aflatoxinas. No entanto, condições como a condensação de humidade na infraestrutura, o aumento da humidade relativa do ambiente, e a atividade microbiana ou de insetos, aumentam o teor de humidade do produto armazenado, disponibilizando água. Naturalmente, são criadas condições propícias para o crescimento fúngico e conseqüente produção de aflatoxinas (Bryden, 2012; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012).

Sob condições experimentais, Kachapulula e col. (2017) procuraram simular um ambiente inadequado de armazenamento, para determinar o potencial da contaminação de aflatoxinas em produtos disponíveis no mercado na Zâmbia. Foi observado um aumento significativo das

concentrações de aflatoxinas em amostras de milho e amendoim incubadas a 31°C e 100% de humidade relativa, durante 7 dias. Estas concentrações aumentaram mais de 1000 vezes: de 3 para 4418µg/kg no milho (em média) e de 3 para 100 302µg/kg no amendoim (em média) (Kachapulula *et al.*, 2017). Num estudo recente na Nigéria, a concentração máxima de aflatoxinas no milho aumentou de 26,5µg/kg (na colheita) para 1460µg/kg após 4 meses de armazenamento nas instalações dos agricultores das regiões estudadas. Adicionalmente, na colheita, 37,5% das amostras apresentavam níveis de aflatoxinas superiores a 4µg/kg, sendo que após o período de 4 meses de armazenamento, passaram a 87,5% das amostras (Liverpool-Tasie *et al.*, 2019).

### 2.3. Propriedades Físicas e Químicas

Até ao momento, foram identificados mais de 20 tipos diferentes de aflatoxinas. Entre estes, cerca de 13 tipos são produzidos naturalmente por fungos micotoxigénicos e podem ser metabolizados por humanos, animais e microrganismos. A AFB1, AFB2, AFG1 e a AFG2 são consideradas as principais do ponto de vista da saúde pública, devido à sua elevada toxicidade e incidência nos alimentos e rações, particularmente a AFB1. A AFM1 e a aflatoxina M2 (AFM2) são os principais metabolitos hidroxilados da AFB1 e AFB2, respetivamente, e encontram-se frequentemente no leite, e seus produtos derivados, proveniente de animais que tenham ingerido ração contaminada (Agriopoulou, Stamatelopoulou e Varzakas, 2020; Benkerroum, 2020a). As aflatoxinas da série M foram detetadas pela primeira vez no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas com AFB1, sob condições experimentais, dando origem à sua designação proveniente do Inglês M – “Milk” (leite) (Benkerroum, 2019).

Quimicamente, as aflatoxinas são compostos derivados difuranocoumarinas, apresentando um núcleo cumarínico ligado, por um lado, a uma estrutura bi-furanóide e, por outro lado, a um anel ciclopentanona (no caso das aflatoxinas da série B), ou a um anel lactona (no caso das aflatoxinas da série G) (Benkerroum, 2020a) (Figura 2).

As aflatoxinas são substâncias cristalinas, incolores ou com coloração amarelo pálido, ligeiramente solúveis em água (10-30µg/ml), solúveis em solventes orgânicos moderadamente polares, como o clorofórmio e metanol, e insolúveis em solventes não polares (IARC, 2012). De uma forma geral, as micotoxinas não apresentam odor e não alteram as características organolépticas dos alimentos. Não sendo visíveis a olho nu (Agriopoulou, Stamatelopoulou e Varzakas, 2020), as aflatoxinas apresentam fluorescência sob iluminação com luz ultravioleta (UV) de 365nm: as AFB1 e AFB2 apresentam fluorescência azul (daí a sua denominação proveniente do Inglês B – “Blue”), as AFG1 e AFG2 apresentam fluorescência verde (do Inglês G – “Green”), e a AFM1 emite fluorescência azul-violeta (Benkerroum, 2019; IARC, 2012).

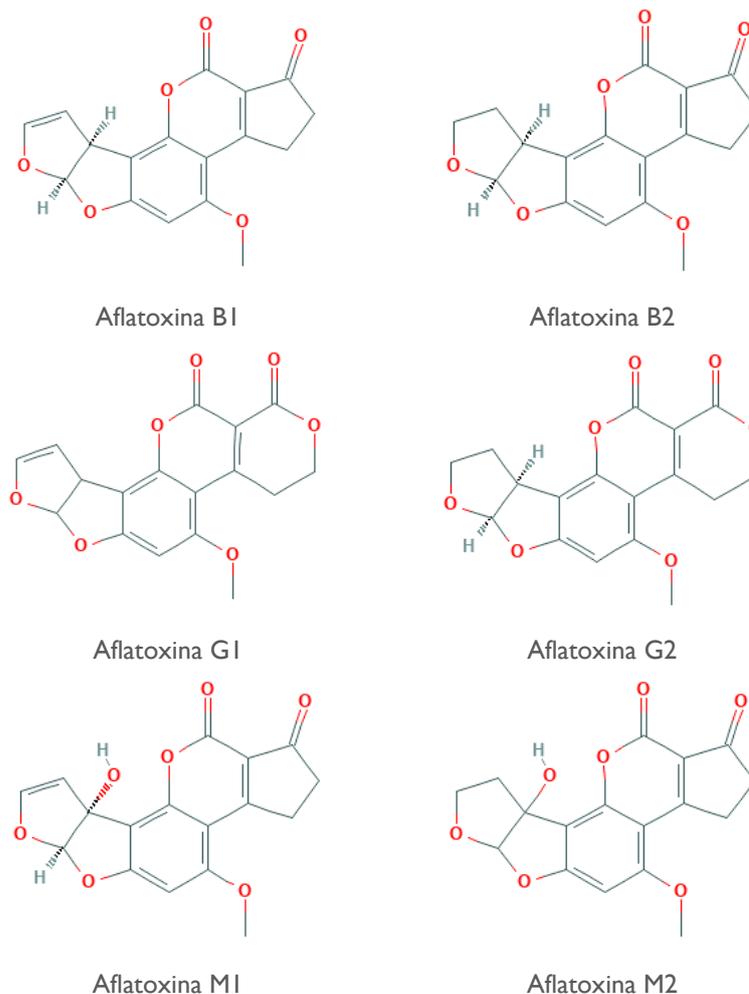


Figura 2 - Estrutura química das principais aflatoxinas (PubChem National Center for Biotechnology Information, 2020).

Estes compostos são instáveis à luz UV na presença de oxigênio, valores extremos de pH (<3 ou >10) e na presença de agentes oxidantes (EFSA, 2020). Apresentam ainda uma grande estabilidade térmica, mesmo a temperaturas elevadas (>100°C), o que constitui um verdadeiro desafio no setor alimentar, nomeadamente no que diz respeito aos produtos lácteos, uma vez que são resistentes às temperaturas de pasteurização e outros tratamentos térmicos (Marchese *et al.*, 2018). A Tabela 2 resume algumas das propriedades físicas e químicas das principais aflatoxinas.

Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas das aflatoxinas (ChemSpider Royal Society of Chemistry, 2020; IARC, 2012; PubChem National Center for Biotechnology Information, 2020).

Aflatoxina	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	Ponto de fusão
AFBI	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312,27	268-269°C
AFB2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,29	286-289°C
AFGI	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328,27	244-246°C
AFG2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,29	237-240°C
AFMI	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328,27	299°C

#### 2.4. Metabolismo da AFBI

As aflatoxinas são substâncias lipofílicas absorvidas no trato gastrointestinal e metabolizadas maioritariamente no fígado, pelo sistema enzimático do citocromo P450 (CYP). Para além de ser o principal órgão onde ocorrem estas reações, tem sido demonstrado que a acumulação dos produtos resultantes da metabolização da AFBI ocorre preferencialmente no fígado (EFSA, 2020; Ramalho *et al.*, 2018). Outros órgãos como o trato gastrointestinal, os rins e os pulmões são também responsáveis pelo metabolismo destas micotoxinas (Buszewska-Forajta, 2020; EFSA, 2020). Nos humanos, as enzimas CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 e CYP3A7 estão envolvidas na metabolização das aflatoxinas no fígado, enquanto que a CYP2A13 atua nos pulmões (Al-Jaal *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2018).

As enzimas do CYP desempenham um papel fundamental no metabolismo de medicamentos e outros compostos xenobióticos, incluindo as aflatoxinas, com o intuito de facilitar a excreção destas substâncias químicas do organismo. De um modo geral, o metabolismo de xenobióticos pode ser dividido em fase I e fase II. A fase I tem como principal objetivo a modificação da estrutura da molécula, permitindo obter metabolitos mais polares e menos tóxicos. A fase II baseia-se na conjugação destes metabolitos (ou mesmo do xenobiótico primário) com enzimas, pretendendo aumentar a solubilidade destes compostos para a sua posterior eliminação (Buszewska-Forajta, 2020). No entanto, apesar da sua importância no processo de desintoxicação do organismo, as enzimas do CYP são ainda capazes de converter compostos biologicamente inertes em metabolitos eletrofílicos, altamente reativos, que podem provocar citotoxicidade e mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) induzindo, consequentemente, o desenvolvimento de tumores (Deng *et al.*, 2018). O metabolismo de xenobióticos tem sido, por isso, estudado com maior interesse nos últimos anos, particularmente a metabolização, ou biotransformação, da AFBI (Figura 3) (Buszewska-Forajta, 2020; Deng *et al.*, 2018).

A AFBI requer ativação metabólica pelo CYP para manifestar a sua toxicidade, dando origem ao metabolito reativo AFBI-8,9-epóxido (AFBO), durante a fase I do metabolismo (Al-Jaal et al., 2019; Ramalho et al., 2018). Este composto possui dois isómeros: endo-8,9-epóxido e exo-8,9-epóxido, sendo este último considerado o responsável pelas propriedades genotóxicas da AFBI (Marchese et al., 2018). No fígado humano, a conversão metabólica, ou seja, a biotransformação da AFBI em AFBO é realizada principalmente pela CYP1A2 e CYP3A4 (Marchese et al., 2018; Rushing e Selim, 2019). Esta reação é determinada pela presença de uma ligação dupla na posição 8,9 da molécula da aflatoxina (ver Figura 2). Por esta razão, apenas a AFBI, AFGI e AFMI são convertidas nos respetivos epóxidos, visto que as restantes aflatoxinas não possuem esta dupla ligação. Em comparação com a AFBI: (i) são formados menos aductos AFGI-N7-Gua, e (ii) após a ativação, a AFMI apresenta um substrato mais limitado para a epoxidação. Consequentemente, estas aflatoxinas possuem um potencial mutagénico e carcinogénico inferior em relação à AFBI (EFSA, 2020).

Uma vez que a AFBO é altamente eletrofílica, reage rapidamente com macromoléculas, como o DNA, ácido ribonucleico (RNA) e proteínas (Ramalho et al., 2018; Rushing e Selim, 2019). Este composto reativo possui grande afinidade pelas bases púricas do DNA pelo que, ao interagir com esta molécula, liga-se covalentemente à posição N7 na guanina, formando o aducto 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-AFBI (AFBI-N7-Gua), que provoca mutações no DNA (Benkerroum, 2019; Marchese et al., 2018). A epoxidação da AFBI é considerada uma etapa crucial no processo genotóxico e, consequentemente, na carcinogénese provocada por esta micotoxina (Buszewska-Forajta, 2020; Marchese et al., 2018).

Para além da formação do aducto AFBI-N7-Gua, o epóxido AFBO pode estar envolvido noutras vias através da atuação de diferentes enzimas da fase II do metabolismo. Por um lado, pode conjugar-se com a glutatona (GSH) através da glutatona S-transferase (GST), e é excretado na urina como AFBI-ácido mercaptúrico (Al-Jaal et al., 2019; Marchese et al., 2018). Esta conjugação permite a obtenção de metabolitos mais solúveis, o que facilita a sua eliminação, constituindo uma importante via de desintoxicação. Por outro lado, a AFBO pode ser hidrolisada, formando o metabolito AFBI-dihidrodiol, considerado menos tóxico, que é convertido em AFBI-dialdeído. Este último subproduto pode ligar-se a proteínas como a albumina (através da lisina), formando aductos que são detetados no sangue, ou então pode ser metabolizado, através da ação da aflatoxina aldeído redutase (AFAR), na forma de AFBI-dialcool que reage com o ácido glucurónico e é excretado na urina (Al-Jaal et al., 2019; Deng et al., 2018; Marchese et al., 2018).

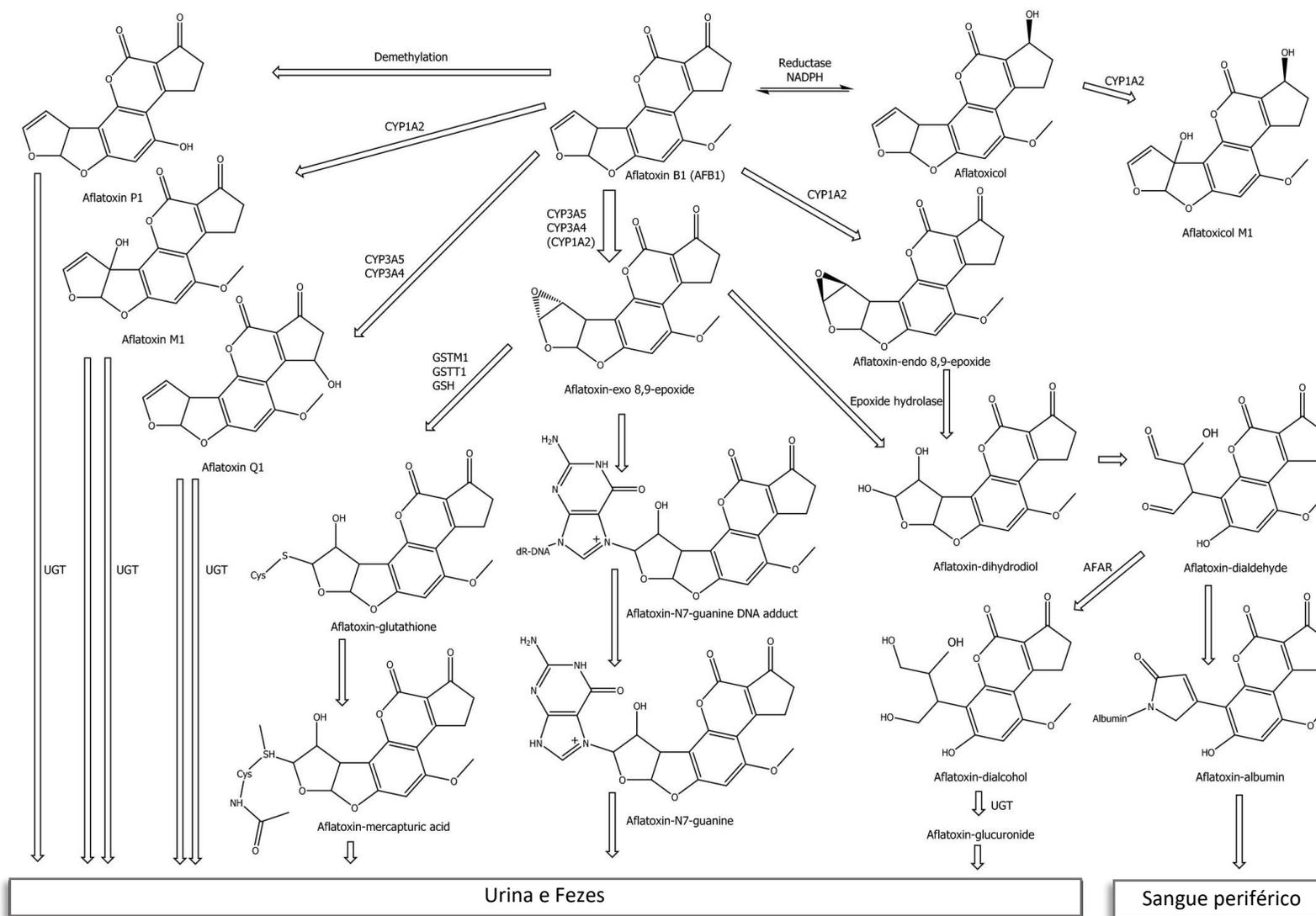
A biotransformação da AFBI pode ainda originar outros metabolitos, consoante a via metabólica. Para além da AFBO já discutida, resultante da epoxidação da AFBI, pode formar-

se a AFMI, a aflatoxina Q1 (AFQ1) e a aflatoxina B2a (AFB2a), resultantes da hidroxilação; a aflatoxina P1 (AFPI), resultante da desmetilação; e ainda a aflatoxicol (AFL), formada a partir da redução da AFBI (Deng *et al.*, 2018).

Existe uma grande variabilidade no que diz respeito ao metabolismo das aflatoxinas, tanto entre diferentes espécies, como entre indivíduos da mesma espécie, por exemplo entre crianças e adultos. A suscetibilidade às aflatoxinas encontra-se associada ao destino metabólico destas micotoxinas. As vias de biotransformação da AFBI dependem essencialmente da atuação de diferentes enzimas do CYP, que originam metabolitos com toxicidade variada (Deng *et al.*, 2018; Dohnal, Wu e Kuča, 2014). Num recente trabalho de revisão, Deng e col. (2018) verificaram a expressão de diferentes enzimas na biotransformação da AFBI, assim como diferentes graus de suscetibilidade, em estudos realizados com animais de várias espécies.

A AFBI, assim como os seus metabolitos resultantes da biotransformação, incluindo aductos com o DNA, podem ser excretados na urina, bÍlis e/ou fezes. Em particular, a AFMI também é frequentemente excretada no leite de animais e humanos, após a exposição à AFBI (EFSA, 2020; Ramalho *et al.*, 2018; Rushing e Selim, 2019).

Na literatura consultada, os dados relativos à toxicocinética das aflatoxinas em humanos são escassos (Degen *et al.*, 2017; EFSA, 2020). No estudo de Jubert e col. (2009) foram analisadas amostras de sangue e urina de voluntários humanos, colhidas durante 72 horas após a administração de uma dose baixa de AFBI (30ng). Estes autores verificaram concentrações máximas no plasma 1 hora após a exposição, sugerindo uma absorção rápida. Não foi efetuada a discriminação entre AFBI e os seus metabolitos ou conjugados, tendo sido observada uma excreção urinária superior a 95% do total de AFBI em 24 horas. Não existem, no entanto, estimativas em relação à taxa de conversão de AFBI, proveniente da alimentação, nos seus metabolitos no fígado humano (Ramalho *et al.*, 2018).



AFAR: aflatoxina aldeído redutase; CYP: citocromo P450; GSH: glutationa; GST: glutationa S-transferase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; UGT: uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase.

Figura 3 - Metabolismo da AFB1 (adaptado de EFSA, 2020).

#### 2.4.1. Carry-over da AFMI para o leite

A AFMI é considerada um produto de desintoxicação resultante do metabolismo da AFBI, apresentando um efeito tóxico inferior ao seu precursor. Ainda assim, a presença de AFMI no leite consiste numa preocupação para a saúde pública. De facto, mesmo em pequenas quantidades, este metabolito poderá ter implicações na saúde dos grandes consumidores de leite, em particular as crianças, visto que, proporcionalmente, este alimento pode contribuir com uma ingestão significativa de aflatoxinas (Duarte *et al.*, 2013; Fink-Gremmels, 2008).

Nos ruminantes, uma fração considerável da AFBI, ingerida através de ração contaminada, é degradada no rúmen, não atingindo a circulação sistémica. A fração não degradada é absorvida e extensamente metabolizada no fígado, resultando em diferentes metabolitos, incluindo a AFMI. Seguidamente, esta toxina pode ser conjugada com o ácido glucurónico e excretada pela bÍlis, ou pode entrar na circulação e ser excretada na urina ou ainda no leite (Fink-Gremmels, 2008). A AFMI é o principal metabolito encontrado no leite, e pode ser detetada entre as 12 e 24 horas após a ingestão de rações contaminadas com AFBI (Alshannaq e Yu, 2017; Giovati *et al.*, 2015). Consequente da exposição diária dos animais a níveis constantes de AFBI, a concentração de AFMI no leite aumenta linearmente durante vários dias até atingir uma fase estacionária, resultante do equilíbrio entre a ingestão e a excreção. Após a interrupção da administração de AFBI, as concentrações destas micotoxinas começam a diminuir, não sendo detetadas após 4-5 dias (Giovati *et al.*, 2015). No estudo de Moschini e col. (2007), foi administrada ração contaminada com aflatoxinas a vacas leiteiras, tendo sido detetadas concentrações de AFBI e AFMI no plasma após 15 minutos. Estes resultados sugerem uma absorção rápida da AFBI através da parede do rúmen e posterior biotransformação em AFMI. Adicionalmente, Masoero e col. (2007) verificaram a presença de AFMI no leite logo na primeira ordenha do animal, após a ingestão de rações contaminadas com AFBI. Com base na literatura consultada, a taxa de transferência de AFBI de rações contaminadas para o leite de vacas (conhecido como *carry-over* em Inglês) pode oscilar entre 0,3 e 6,2% (Giovati *et al.*, 2015; Marchese *et al.*, 2018). Esta variação deve-se à influência de diversos fatores nutricionais e fisiológicos entre eles, o regime alimentar, a taxa de ingestão e digestão, o estado de saúde do animal, a biotransformação hepática e a produção de leite (Duarte *et al.*, 2013; Fink-Gremmels, 2008). São observadas taxas de transferência mais elevadas em vacas leiteiras de alto rendimento dado o consumo de quantidades significativamente maiores de alimentos concentrados (Fink-Gremmels, 2008; Giovati *et al.*, 2015). Uma característica pertinente da AFMI é a sua ligação às proteínas do leite, particularmente à caseína, permitindo ser encontrada noutros produtos lácteos como o queijo, uma vez que é relativamente estável sob altas temperaturas (Alshannaq e Yu, 2017;

Frazzoli *et al.*, 2017). Este metabolito pode ainda ser detetado no leite de outros ruminantes como de ovelha, cabra e búfalo (Frazzoli *et al.*, 2017). Battacone e col. (2005) analisaram a transferência de AFBI, proveniente da ração, para o leite de ovelhas. Neste estudo experimental, foi detetada AFMI no leite destes animais no período de 12 horas após a ingestão de AFBI. Ao interromper a administração de aflatoxinas, as concentrações de AFMI no leite diminuíram rapidamente, não sendo detetadas após 4 dias (Battacone *et al.*, 2005). A AFMI também pode surgir no leite materno humano através de alimentos contaminados com aflatoxinas (Figura 4), no entanto existe uma escassez de informação quanto à taxa de transferência destas micotoxinas, e dos seus metabolitos, para o leite (Warth *et al.*, 2016).

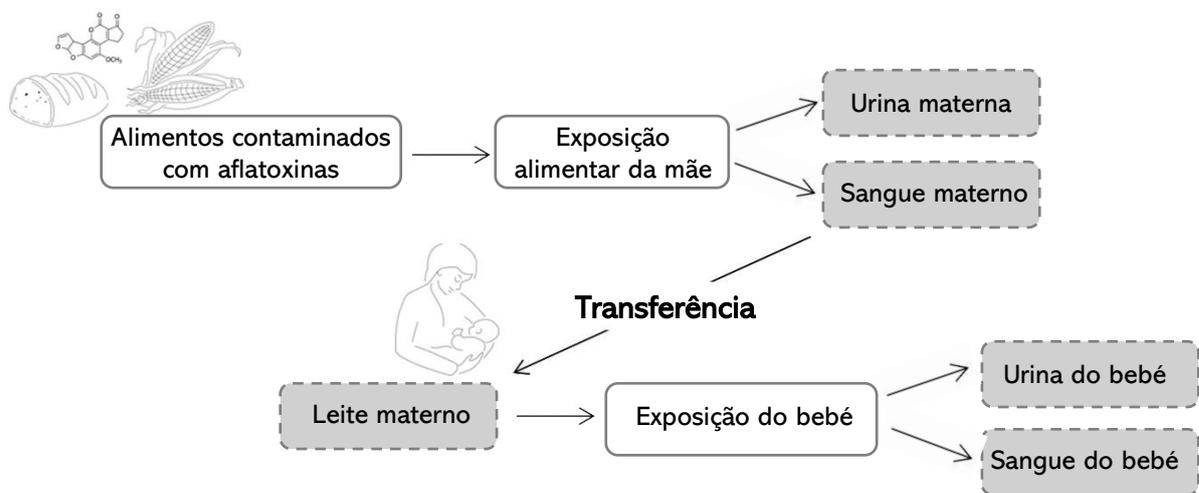


Figura 4 - Exposição de mães lactantes e bebês a alimentos contaminados com aflatoxinas (adaptado de Warth *et al.*, 2016).

Dada esta limitação, a informação obtida em estudos experimentais com animais poderá fornecer uma aproximação do que ocorre nos humanos. Contudo, é importante ter em consideração que existem diferenças fisiológicas entre espécies que poderão ser significativas, como por exemplo a anatomia do sistema digestivo e a taxa de produção de leite por kg de peso corporal de vacas leiteiras comparativamente às mães lactantes, que altera a distribuição de toxinas disponíveis (Fink-Gremmels, 2008; Warth *et al.*, 2016).

## 2.5. Toxicidade

A toxicidade das aflatoxinas para humanos e animais através da alimentação encontra-se atualmente bem estabelecida. Estas são consideradas as micotoxinas mais tóxicas, tendo sido reconhecidos efeitos mutagénicos, genotóxicos, imunotóxicos, teratogénicos, hepatotóxicos e carcinogénicos (Benkerroum, 2020a; Marchese *et al.*, 2018). No entanto, o grau de

toxicidade e os efeitos toxicológicos variam consideravelmente, dependendo do tipo de aflatoxina e do indivíduo exposto (Benkerroum, 2020a). Desde a sua descoberta, as aflatoxinas têm sido as micotoxinas mais estudadas, particularmente a AFBI, considerado um dos mais potentes agentes hepatocarcinogénicos (Alshannaq e Yu, 2017; Rushing e Selim, 2019). De facto, entre as aflatoxinas, a AFBI é considerada a mais tóxica, seguida da AFGI, AFB2 e AFG2, ou seja, por ordem decrescente de toxicidade:  $AFBI > AFGI > AFB2 > AFG2$  (Benkerroum, 2020a). A AFMI possui uma toxicidade semelhante à AFGI, sendo dez vezes menos cancerígena comparativamente à AFBI (Benkerroum, 2020a; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). Embora as restantes aflatoxinas, particularmente as resultantes do metabolismo da AFBI, sejam consideradas menos tóxicas ou mesmo não tóxicas, são ainda motivo de preocupação uma vez que, para além da sua toxicidade inerente, podem reverter para os seus precursores mais tóxicos após a ingestão (Benkerroum, 2020a). Por exemplo, a aflatoxicol, um metabolito que pode ser encontrado no leite e ainda ser transferido através da placenta, é convertida em AFBI no fígado (Benkerroum, 2019; Rushing e Selim, 2019).

A exposição às aflatoxinas pode induzir toxicidade aguda e crónica, tanto em humanos como em animais, sendo o fígado o principal órgão alvo (Alshannaq e Yu, 2017; Benkerroum, 2020b). Todavia, a suscetibilidade dos humanos e animais aos efeitos tóxicos está dependente de diversos fatores, entre os quais a idade, sexo, espécie, estado nutricional, metabolismo, dose e duração da exposição (Agriopoulou, Stamatelopoulou e Varzakas, 2020; Rodrigues, Venâncio e Lima, 2012). A coocorrência de micotoxinas também pode influenciar os efeitos adversos na saúde. As colheitas podem ser infetadas por várias estirpes de fungos micotoxigénicos, sendo que a maioria destas estirpes produzem mais que um tipo de micotoxina (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019). No estudo de Gruber-Dorninger e col. (2019), a coocorrência de micotoxinas foi frequentemente observada, tendo sido detetadas duas ou mais micotoxinas em 64% das amostras de ração analisadas. As misturas mais frequentemente observadas foram combinações entre desoxinivalenol, zearalenona e fumonisinas, seguida da coocorrência de AFBI e fumonisinas no milho e ração. O interesse científico pelos efeitos biológicos da multiexposição tem vindo a aumentar nos últimos anos, contudo os dados ainda são escassos (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019). Esta coocorrência pode dificultar a avaliação dos efeitos adversos na saúde, visto que pode levar a efeitos aditivos, sinérgicos ou antagónicos entre si (Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). Por exemplo, no trabalho de revisão de Lee e Ryu (2017), foi verificada a existência de evidências de efeitos sinérgicos na toxicidade, particularmente lesões hepáticas, entre as aflatoxinas e as fumonisinas em estudos experimentais com diferentes espécies de animais. Assim, diferentes autores reforçam a importância de considerar a mistura de micotoxinas na avaliação de risco, uma vez

que pode constituir um perigo para a saúde superior ao exercido individualmente (Benkerroum, 2019; Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019; Lee e Ryu, 2017).

### **2.5.1. Toxicidade Aguda**

A toxicidade aguda ocorre após a ingestão de elevadas concentrações de aflatoxinas numa dose única, ou repetidamente por um curto período de tempo. Os sinais clínicos típicos desta intoxicação incluem icterícia, dor abdominal, náusea, edema, necrose hemorrágica dos tecidos hepáticos, hiperplasia do ducto biliar e, eventualmente, morte após lesão hepática grave (Agriopoulou, Stamatelopoulou e Varzakas, 2020; Benkerroum, 2020a). Apesar de pouco frequentes, surtos de hepatotoxicidade associada às aflatoxinas, têm sido observados em humanos desde a década de 1960. Por conseguinte, com base nos dados recolhidos após estes incidentes e nos demais testes experimentais *in vitro*, o Comité Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), organismo responsável pela avaliação de risco a nível mundial, estimou que o consumo de 20 a 120µg de AFB1/kg de peso corporal/dia, durante um período de 1 a 3 semanas, é considerado potencialmente letal para seres humanos. De acordo com o mesmo relatório, suspeita-se ainda que o consumo de alimentos contaminados com uma concentração igual ou superior a 1mg de aflatoxinas/kg poderá causar intoxicação aguda (Benkerroum, 2019; JECFA, 2017). Ainda que não haja consenso em relação à dose exata de aflatoxinas que desencadeia toxicidade aguda em humanos, pressupõe-se que esta seja mais baixa para os indivíduos mais jovens, considerando que as taxas de mortalidade associadas a surtos por intoxicação são mais elevadas nestes grupos etários (Benkerroum, 2020a).

Nos animais, a dose letal varia significativamente entre espécies, apresentando valores de dose letal média (LD<sub>50</sub>) entre 0,3 e 18mg/kg de peso corporal (Benkerroum, 2020a). O metabolismo e os produtos formados determinam as diferenças observadas quanto à suscetibilidade das espécies às aflatoxinas (Bryden, 2012). Animais como patos, perus, cães, suínos, ovelhas e ratos são mais suscetíveis às aflatoxinas, contrariamente a animais como macacos, galinhas, murganhos e ruminantes, considerados como mais resistentes (Benkerroum, 2020a).

Embora as aflatoxinas estejam associadas predominantemente à toxicidade crónica, têm sido registados alguns casos de intoxicação aguda. Na região da África Subsariana, o Quênia tem sido um dos países mais gravemente afetado por aflatoxicoses (intoxicação provocada por aflatoxinas). A alternância entre períodos secos e chuvosos é característica do clima deste país, que se torna propício para o desenvolvimento dos fungos produtores de aflatoxinas. As suas populações cultivam milho para o consumo doméstico, considerado o alimento base da sua dieta, armazenando posteriormente as colheitas por métodos tradicionais em celeiros ou nas próprias casas. Em 2004, ocorreu no Quênia o surto de aflatoxicose mais significativo em

todo o mundo, devido ao consumo de milho que se encontrava altamente contaminado, resultando em 317 casos com 125 mortes (Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005; Benkerroum, 2020a). Azziz-Baumgartner e col. (2005) revelaram no estudo deste surto, uma forte associação entre as concentrações de aflatoxinas no milho caseiro e os níveis de aductos AFBI-lisina no sangue dos indivíduos afetados. As autoridades de saúde pública conseguiram detetar concentrações de AFBI equivalentes a 4400µg/kg em amostras de milho colhidas na região, consideravelmente superior ao limite máximo estabelecido neste país (20µg/kg) (Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005; Benkerroum, 2020a). Desde este incidente, os aductos AFBI-lisina têm sido amplamente utilizados como biomarcadores de exposição às aflatoxinas (Al-Jaal *et al.*, 2019; Benkerroum, 2019). Para além dos diferentes surtos decorridos ao longo dos últimos anos, alguns casos esporádicos também têm contribuído para a investigação científica da toxicidade destes compostos. O primeiro caso de toxicidade aguda por aflatoxinas conhecido em humanos ocorreu no Uganda, em 1967, com a morte de um adolescente de 15 anos por insuficiência hepática, após a ingestão regular de mandioca que estaria contaminada (1700µg/kg). Outro caso peculiar ocorreu nos Estados Unidos da América (EUA), quando uma mulher de 25 anos, em duas tentativas distintas de suicídio, ingeriu intencionalmente 5,5mg de AFBI em dois dias e, passados seis meses, outra dose de 35mg em duas semanas. Na admissão hospitalar, apresentou apenas sintomas de erupção cutânea, náusea e cefaleia, não tendo causado lesões graves típicas das aflatoxinas, mesmo após 14 anos dos incidentes (Benkerroum, 2020a). Embora seja difícil explicar, na revisão de Benkerroum (2020a) sugere-se que a ausência de efeitos toxicológicos mais graves pode ter sido atribuída ao seu estado nutricional equilibrado, idade e género, visto que tem sido relatado, em estudos experimentais com animais, que o sexo feminino é menos suscetível às aflatoxinas em relação ao sexo masculino (Dohnal, Wu e Kuča, 2014). Estes casos apoiam a evidência quanto às diferenças de suscetibilidade entre indivíduos (Benkerroum, 2020a).

### **2.5.2. Toxicidade Crónica**

A toxicidade crónica resulta da exposição repetida a doses baixas de aflatoxinas por um período prolongado. Esta exposição ocorre frequentemente em várias regiões do mundo, sendo caracterizada pela manifestação clínica de diversos efeitos, incluindo lesões hepáticas, ocorrência de cancro, teratogenicidade, imunossupressão, e acredita-se que possam estar envolvidas no défice de crescimento de crianças e desnutrição (Benkerroum, 2020b; Rushing e Selim, 2019).

Nos animais, pode provocar uma variedade de efeitos adversos nas diferentes espécies. Estes incluem lesões hepáticas, diminuição da ingestão alimentar e do ganho de peso, diminuição da

produção de ovos e leite, redução do índice de conversão alimentar, qualidade inferior da casca dos ovos e da carcaça, e aumento da suscetibilidade a doenças (Bryden, 2012; JECFA, 2017). Outros efeitos como o atraso no crescimento, baixo peso corporal e falta de coordenação nos movimentos têm sido observados em crias após a exposição das mães às aflatoxinas durante a gestação (Mupunga, Mngqawa e Katerere, 2017).

### **2.5.2.1. Aflatoxinas e cancro do fígado**

O cancro do fígado é considerado um dos tipos de cancro mais comuns a nível mundial, com uma incidência extensamente associada à exposição às aflatoxinas (Benkerroum, 2020b). Em 2018, foram registados 841 080 novos casos (4,7%) deste cancro em todo o mundo, tendo sido classificado como o terceiro tipo de cancro com maior taxa de mortalidade nesse ano (IARC, 2020). A incidência de cancro do fígado varia entre as diferentes regiões do mundo, sendo superior em países de África e da Ásia, especialmente a China que apresenta uma das maiores taxas de incidência do mundo (Benkerroum, 2020b; Liu e Wu, 2010). Liu e Wu (2010) estimaram que, globalmente, entre 25 200 e 155 000 (4,6–28,2%) dos casos anuais de carcinoma hepatocelular, um tipo de cancro primário do fígado, possam ser atribuídos à exposição às aflatoxinas.

Nas décadas de 1960 e 1970 já existiam vários estudos epidemiológicos e testes experimentais em animais indicando uma relação entre a exposição alimentar às aflatoxinas e a manifestação de diferentes tipos de cancro hepático. Em 1992, a IARC determinou haver evidência científica suficiente da carcinogenicidade da AFBI. Nos estudos analisados, foi demonstrado existir uma relação quase linear entre a ingestão de AFBI e a taxa de mortalidade por cancro do fígado, corroborando a sua implicação direta (Benkerroum, 2019). Adicionalmente, verificaram que, em indivíduos com elevada exposição às aflatoxinas, o risco de ocorrência de cancro do fígado aumentava em indivíduos positivos para o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (VHB) em comparação com indivíduos negativos. Esta constatação veio demonstrar que a AFBI atua sinergicamente com o VHB (Benkerroum, 2019; Rushing e Selim, 2019). Consequentemente, estes dados epidemiológicos levaram a considerar a exposição alimentar à AFBI e a infeção pelo VHB como os principais fatores de risco para a ocorrência de carcinoma hepatocelular. Wu e col. (2009) realizaram um estudo de caso-controlo em Taiwan, onde avaliaram amostras biológicas dos participantes para determinar os níveis de aductos AFBI-albumina no sangue e outros metabolitos na urina. Os autores constataram que a concentração de metabolitos de aflatoxinas na urina foi significativamente superior nos casos comparativamente com os controlos, tendo encontrado com este estudo uma associação positiva entre a exposição à AFBI e o risco de carcinoma hepatocelular. Na China, foi realizado um estudo longitudinal de

21 anos na cidade de Qidong, uma região com elevada prevalência de cancro primário do fígado (EFSA, 2020; Lu *et al.*, 2010). Inicialmente, integraram a coorte 515 indivíduos com o VHB, que apresentavam alto risco para o desenvolvimento deste cancro. A exposição às aflatoxinas foi avaliada através da determinação dos níveis de AFMI na urina dos participantes. Foi observada uma associação significativa entre a exposição às aflatoxinas e a incidência de cancro primário do fígado, bem como um evidente efeito sinérgico entre as aflatoxinas e o VHB na carcinogénese (Lu *et al.*, 2010).

Em 2012, após a revisão de novos dados relativos à genotoxicidade das aflatoxinas, a AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e a AFMI foram classificadas como carcinogénicas para humanos (grupo I) pela IARC (Benkerroum, 2019; IARC, 2012). De facto, tem sido demonstrado que a carcinogenicidade das aflatoxinas resulta da sua ação genotóxica. Tal como descrito anteriormente, a AFB1 é metabolizada no fígado originando o metabolito ativo AFBO, que por sua vez forma um aducto com o DNA, a AFB1-N7-Gua. Este aducto é instável, libertando-se rapidamente do DNA, originando um local apurínico na molécula. O aducto livre é então excretado na urina e pode ser usado como biomarcador de exposição. Alternativamente, o aducto AFB1-N7-Gua pode ser transformado no aducto AFB1-formamidopirimidina (AFBI-FAPY), que por sua vez é mais estável e, portanto, mais persistente no organismo. Estes aductos, AFB1-N7-Gua e AFBI-FAPY, são os principais precursores dos efeitos genotóxicos e carcinogénicos, sendo o AFBI-FAPY considerado o aducto mais mutagénico (Benkerroum, 2019, 2020b). Uma das mutações mais comuns provocadas por estes aductos é a transversão da guanina (G) para timina (T) na posição da terceira base do codão 249 (AGG → AGT) no gene supressor tumoral TP53, que resulta na consequente substituição do aminoácido serina por arginina (Benkerroum, 2019; Rushing e Selim, 2019). O gene TP53 é responsável pela regulação de várias funções celulares, entre as quais o ciclo celular, reparação de DNA e apoptose. As mutações neste gene podem alterar as suas funções como supressores de tumores, permitindo a proliferação de células danificadas que leva ao desenvolvimento de cancro. Diferentes estudos epidemiológicos têm demonstrado que pacientes com carcinoma hepatocelular em regiões com elevada exposição às aflatoxinas apresentam esta mutação específica (Marchese *et al.*, 2018; Rushing e Selim, 2019). Por exemplo, Qi e col. (2015) apresentaram uma associação significativa entre as mutações no gene TP53, a exposição à AFB1 e ao VHB em pacientes com carcinoma hepatocelular em Guangxi, na China. Foram detetadas estas mutações em 56,2% dos pacientes. Adicionalmente, dos 211 pacientes positivos para a AFB1, 160 (75,8%) apresentaram mutações no gene TP53 (Qi *et al.*, 2015). Stern e col. (2001) realizaram uma meta-análise com 49 estudos publicados e encontraram uma associação significativa entre a presença de mutação no codão 249 do gene TP53 e a

elevada exposição às aflatoxinas. Em suma, cada vez mais estudos demonstram que, em regiões com elevada prevalência do VHB e de exposição à AFBI, pacientes com carcinoma hepatocelular apresentam frequentemente a transversoão da base G para T no codão 249 do gene TP53, considerada como a mutação característica deste carcinoma induzido por aflatoxinas (EFSA, 2020; Rushing e Selim, 2019).

#### **2.5.2.2. Aflatoxinas e estado nutricional**

Embora tenha vindo a ser dado grande ênfase às aflatoxinas devido às suas propriedades genotóxicas e carcinogénicas, estas micotoxinas têm demonstrado outros efeitos tóxicos em humanos e animais. Entre estes, a desnutrição e o défice de crescimento têm vindo a destacar-se devido ao seu impacto na saúde infantil, particularmente em países em desenvolvimento (Benkerroum, 2020b; Rushing e Selim, 2019). Uma alimentação equilibrada é essencial para o crescimento saudável das crianças, contudo a exposição a contaminantes como as aflatoxinas poderá comprometer este processo de desenvolvimento físico e cognitivo (Benkerroum, 2020b). A saúde infantil é uma área de interesse emergente no que diz respeito à exposição às aflatoxinas, porém as evidências apresentam ainda algumas limitações. Assim, são necessários mais estudos para colmatar as lacunas ainda existentes, especialmente quanto ao mecanismo pelo qual estas micotoxinas causam alterações do estado nutricional (Benkerroum, 2020b; EFSA, 2020).

O défice de crescimento é um problema de saúde pública que afeta milhões de crianças em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Vários fatores de risco podem contribuir para esta condição, sendo a exposição às aflatoxinas um dos principais fatores identificados (Rushing e Selim, 2019). Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm mostrado um efeito negativo das aflatoxinas no crescimento em humanos e animais durante o seu desenvolvimento. As crianças, particularmente em países de África, são expostas desde muito cedo às aflatoxinas, inclusivamente durante a gestação, no período de amamentação e com o início da diversificação alimentar. Consequentemente, tem sido observada uma relação entre a exposição alimentar às aflatoxinas e o défice de crescimento em crianças com idade inferior a 5 anos (Benkerroum, 2020b; Mupunga, Mngqawa e Katerere, 2017; Turner *et al.*, 2007).

Um importante fator de risco para o défice de crescimento é a exposição da mãe às aflatoxinas durante a gravidez. Vários estudos têm vindo a detetar concentrações de aflatoxinas, ou seus metabolitos, no leite materno, sangue ou cordão umbilical de mulheres grávidas ou a amamentar, sugerindo que os fetos e recém-nascidos podem ser expostos às aflatoxinas através da mãe (Rushing e Selim, 2019). Partanen e col. (2009) apresentaram, pela primeira

vez, evidência da transferência real da AFBI pela placenta humana, comprovando que a exposição pode ocorrer *in utero* por via transplacentária. O estudo de Turner e col. (2007) pretendeu investigar o efeito da exposição às aflatoxinas *in utero* no crescimento infantil durante o primeiro ano de vida, na Gâmbia. Inicialmente, foram detetados aductos de aflatoxina-albumina em todas as amostras de sangue recolhidas de mães durante a gravidez, e em 48,5% das amostras de sangue do cordão umbilical. Elevados níveis de aductos aflatoxina-albumina no sangue materno foram significativamente relacionados com peso mais baixo para a idade e estatura igualmente mais baixa para a idade (Turner *et al.*, 2007). Noutro estudo, Magoha e col. (2014) averiguaram a associação entre a exposição à AFMI e indicadores de crescimento em bebés (<6 meses de idade) no norte da Tanzânia. Todas as amostras de leite materno encontravam-se contaminadas com AFMI e foi observada uma associação inversa entre os níveis de exposição dos bebés a este metabolito, e os valores padrão do peso para a idade e estatura para a idade (Magoha *et al.*, 2014). Para além disso, os níveis de aflatoxinas em mulheres grávidas também têm apresentado um impacto negativo nos índices antropométricos dos bebés no nascimento. Lauer e col. (2019) verificaram que níveis mais elevados de aductos aflatoxina-lisina no sangue da mãe foram significativamente associados a peso inferior relativamente ao valor padrão do peso para a idade, e perímetro cefálico igualmente mais baixo no nascimento, numa amostra de 220 bebés no Uganda. Com base nestes dados, e os demais existentes (EFSA, 2020; Rushing e Selim, 2019), pressupõe-se que a exposição materna às aflatoxinas durante a gravidez tem um forte impacto sobre o crescimento na primeira infância (Rushing e Selim, 2019; Turner *et al.*, 2007). Após o nascimento, a exposição persistente das crianças às aflatoxinas pode continuar a afetar o seu desenvolvimento (Rushing e Selim, 2019). Gong e col. (2004) realizaram um estudo que envolveu 200 crianças com idades entre os 16 e 37 meses em Benim, na África Ocidental. Durante o acompanhamento de 8 meses, verificaram uma forte correlação negativa entre os níveis de aductos aflatoxina-albumina e o perfil de crescimento, ou seja, crianças com níveis mais elevados deste biomarcador apresentavam uma redução média de 1,7cm em relação às crianças com níveis mais baixos (Gong *et al.*, 2004).

Apesar dos dados epidemiológicos que correlacionam a exposição às aflatoxinas e o défice de crescimento, a causalidade entre estes ainda não foi determinada. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar o impacto negativo das aflatoxinas sobre o crescimento, entre os quais a má absorção intestinal de nutrientes e os efeitos sobre o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). A IGF tipo I (IGF-I) possui atividade mediadora da hormona do crescimento, sendo crucial no crescimento pós-natal. Visto que o fígado é o principal local de produção desta hormona, a hepatotoxicidade provocada pelas aflatoxinas pode resultar na

diminuição dos níveis da IGF-I, que por sua vez afetará o desenvolvimento ósseo e do tecido (Castelino *et al.*, 2015; Rushing e Selim, 2019). Assim, lesões do fígado e as alterações na sinalização da hormona de crescimento podem elucidar quanto ao mecanismo da AFBI na supressão do crescimento (Rushing e Selim, 2019). Castelino e col. (2015) exploraram a relação entre as aflatoxinas e o IGF, e o seu potencial efeito no crescimento de crianças com idades entre o 6 e os 17 anos, no Quênia. Foi revelado que níveis mais elevados de aductos aflatoxina-albumina estavam associados a níveis reduzidos de IGF-I, bem como a uma estatura mais baixa das crianças. Adicionalmente, estes autores demonstraram uma associação inversa entre a exposição às aflatoxinas e a expressão do gene IGF em células hepáticas *in vitro* (Castelino *et al.*, 2015). Estes dados sugerem que as alterações nos níveis da IGF induzidas por aflatoxinas podem comprometer o crescimento infantil.

Para além deste possível mecanismo, existem evidências de que as aflatoxinas interferem com absorção de micronutrientes como as vitaminas A, D e E, assim como o ferro, selénio e zinco (Benkerroum, 2020b; Williams *et al.*, 2004). Tang e col. (2009) verificaram uma correlação negativa entre os níveis séricos de aductos AFBI-albumina e a concentração das vitaminas A e E em adultos no Gana. De acordo com os autores, estes dados estatisticamente significativos, demonstraram que a exposição às aflatoxinas foi associada a baixas concentrações destas vitaminas em indivíduos com alto risco de exposição (Tang *et al.*, 2009). Um estudo realizado na Guiné, constatou que as crianças (entre os 10 e 46 meses), expostas a níveis elevados de aflatoxinas, apresentavam maior probabilidade de deficiência de zinco e vitamina A (Watson *et al.*, 2016). No entanto, o mecanismo pelo qual a AFBI altera os níveis de nutrientes permanece por explicar (Rushing e Selim, 2019). Num estudo *in vitro*, foi observado que a exposição à AFBI afetou a expressão do recetor da vitamina D, o que poderá interferir com o seu metabolismo, sugerindo que este pode ser um potencial mecanismo do efeito desta toxina na desnutrição (Costanzo *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, a AFBI tem sido associada à toxicidade intestinal dada a sua capacidade de danificar as células epiteliais, resultante da inibição da síntese proteica ou da citotoxicidade (Rushing e Selim, 2019). O facto dos enterócitos possuírem a enzima CYP3A4, leva a que possam ativar a AFBI, após a exposição alimentar a estas toxinas, levando à toxicidade nestas células (Turner *et al.*, 2007). Num estudo *in vitro*, Zhang e col. (2015) investigaram os efeitos citotóxicos da AFBI e AFMI sobre células Caco-2, uma linha celular derivada do epitélio intestinal humano, que representa o primeiro local de contacto destas micotoxinas no organismo após a sua absorção por via oral. Os dados mostraram que a AFBI e a AFMI inibiram significativamente o crescimento das células indiferenciadas e diferenciadas, e causaram danos genéticos (dependentes do tempo e da dose), sendo que a AFBI foi considerada mais tóxica do que a AFMI. Este estudo forneceu

a primeira evidência de danos na molécula de DNA, induzidos por estas aflatoxinas, nas células Caco-2 antes e após a diferenciação (Zhang *et al.*, 2015). Os danos sobre a estrutura das células intestinais podem afetar a eficácia da absorção de nutrientes (Rushing e Selim, 2019). As vitaminas e os minerais são indispensáveis para o normal funcionamento do organismo e têm funções diversas e específicas, entre as quais o reforço do sistema imunitário, propriedades antioxidantes, processos metabólicos, funções celulares e formação de tecidos. O défice nutricional poderá comprometer estas funções e desencadear consequências graves para a saúde (Benkerroum, 2020b; Costanzo *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2009).

Por outro lado, a exposição crónica às aflatoxinas tem sido associada a doenças de desnutrição proteico-energética, como o kwashiorkor e marasmo em países de África. Diferentes estudos têm demonstrado níveis mais elevados de aflatoxinas no sangue e na urina de crianças com kwashiorkor comparativamente com crianças saudáveis (Benkerroum, 2020b; Mupunga, Mngqawa e Katerere, 2017; Rushing e Selim, 2019). Num estudo realizado nos Camarões, foi detetada elevada prevalência de AFBI na urina de crianças com kwashiorkor e kwashiorkor-marasmático (Tchana, Moundipa e Tchouanguép, 2010). McMillan e col. (2018) averiguaram as concentrações de aductos AFBI-lisina em crianças entre os 6 e 48 meses severamente desnutridas na Nigéria, e concluíram que estas concentrações foram significativamente superiores em crianças com kwashiorkor em comparação com o grupo de controlo. De acordo com estes autores, a correlação significativa encontrada entre os níveis de AFBI-lisina e os valores padrão de estatura para a idade reforça a evidência epidemiológica para o efeito das aflatoxinas no défice de crescimento (McMillan *et al.*, 2018). À semelhança dos fatores anteriores, o papel das aflatoxinas na etiologia da desnutrição proteico-energética permanece desconhecido. Contudo, de acordo com a literatura consultada, os efeitos causados pela toxicidade intestinal e hepática são prováveis mecanismos que levam à desnutrição e à supressão do crescimento infantil, frequentemente observados após a exposição às aflatoxinas (Figura 5) (Benkerroum, 2020b; Mupunga, Mngqawa e Katerere, 2017; Rushing e Selim, 2019).

### **2.5.3. Toxicidade da AFMI**

A toxicidade aguda e crónica induzida pela exposição à AFMI ocorre sobretudo após a ingestão de leite, incluindo o leite materno, e produtos derivados contaminados (Giovati *et al.*, 2015). Este metabolito tem vindo a ser associado a efeitos hepatotóxicos, carcinogénicos e imunossupressores, no entanto com um potencial inferior comparativamente à AFBI (Giovati *et al.*, 2015; Marchese *et al.*, 2018). Ainda que o fígado seja o principal órgão alvo das aflatoxinas, as evidências indicam que também podem ser afetados outros órgãos. Por exemplo, foi verificada a citotoxicidade direta da AFBI e AFMI em enterócitos intestinais humanos (Caco-

2) *in vitro*, sugerindo que a exposição às aflatoxinas pode representar um risco de lesões no intestino (Zhang *et al.*, 2015).

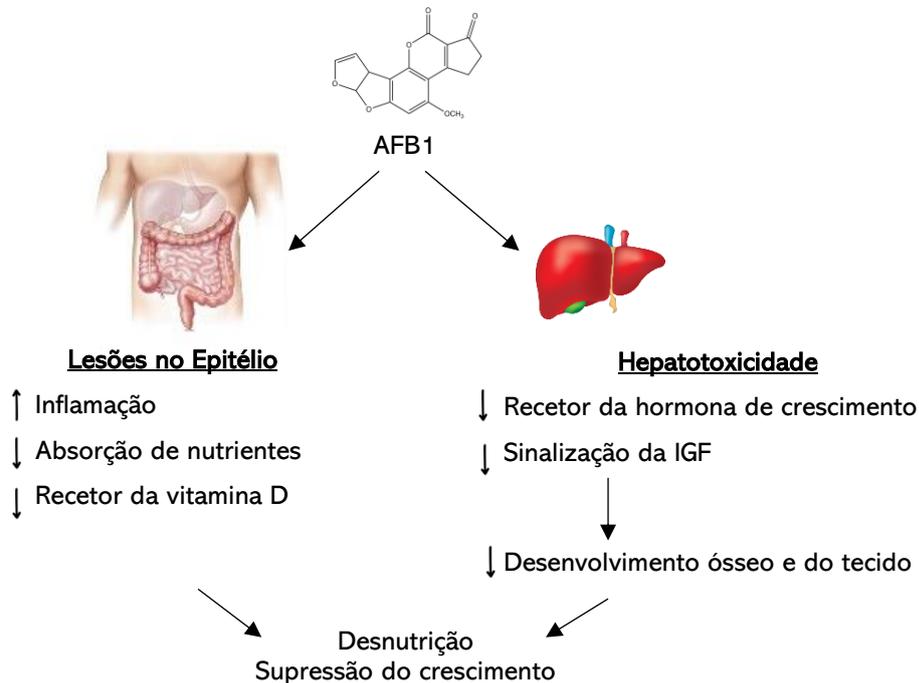


Figura 5 – Mecanismos propostos da AFB1 para induzir a desnutrição e o déficit de crescimento (adaptado de Rushing e Selim, 2019).

À semelhança da AFB1, a AFM1 pode ser ativada no respetivo epóxido e induzir mutações no DNA, no entanto a AFM1 apresenta um substrato mais limitado para a epoxidação (Giovati *et al.*, 2015; Marchese *et al.*, 2018). Consequentemente, o potencial genotóxico da AFM1 é inferior ao da AFB1, apresentando apenas 10% de mutagenicidade em relação ao seu precursor (Marchese *et al.*, 2018). Além disso, embora tenha sido demonstrado que a AFB1 requer ativação pelo CYP para manifestar os seus efeitos tóxicos, este processo não parece ser necessário para a citotoxicidade induzida pela AFM1 (Giovati *et al.*, 2015; Marchese *et al.*, 2018).

Pelo que antecede, a presença de AFM1 no leite e produtos derivados representa grande motivo de preocupação para a saúde pública, particularmente para os lactentes e crianças, dado que, para além do elevado consumo destes alimentos, estes grupos etários são mais vulneráveis aos seus efeitos adversos. Adicionalmente, a exposição à AFM1 pode comprometer o desenvolvimento da sua resposta imunológica, tornando-os mais suscetíveis a outras doenças (Marchese *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2015).

## 2.6. Ocorrência nos Alimentos

Apesar da introdução de boas práticas agrícolas e de produção na cadeia alimentar, a ocorrência de micotoxinas persiste como um problema global. São observadas perdas económicas significativas associadas ao impacto destas toxinas na saúde humana, no bem-estar animal e na sua produtividade, assim como no comércio nacional e internacional (Eskola *et al.*, 2019). Nos últimos anos, têm sido publicados diversos estudos relativos à ocorrência de aflatoxinas nos alimentos. Embora estas sejam prevalentes em áreas com clima tropical e subtropical, a globalização de produtos alimentares tem vindo a crescer, difundindo a sua ocorrência à escala global (Benkerroum, 2020a; Eskola *et al.*, 2019). As aflatoxinas são detetadas principalmente em cereais (milho, cevada, arroz e trigo) e em frutos oleaginosos (nozes, amendoins, amêndoas, caju e pistáchios), podendo também ocorrer em especiarias, frutas desidratadas, sementes de algodão e produtos de origem animal como o leite, ovos e carne (Agriopoulou, Stamatelopoulou e Varzakas, 2020).

Os cereais são a base da alimentação humana, sendo produzidas mais de 2 600 milhões de toneladas por ano em todo o mundo para suprir as necessidades (Eskola *et al.*, 2019; Rushing e Selim, 2019). Dada a sua elevada importância, têm sido produzidos artigos e relatórios com o objetivo de estimar a prevalência global de micotoxinas, incluindo as aflatoxinas, em culturas agrícolas (Eskola *et al.*, 2019). Na revisão de Lee e Ryu (2017), foi analisada a ocorrência de aflatoxinas nos cereais (cevada, milho, trigo, arroz, entre outros) na África, América, Ásia e Europa entre 2006 e 2016. Com base nos dados relatados, a incidência global de aflatoxinas nos cereais não processados foi de 55%, sendo que o nível máximo detetado foi de 1642µg/kg em África. Esta incidência variou entre 15% na América e 63% na Ásia. Segundo os autores, os dados publicados mostram que as aflatoxinas continuam a ser uma preocupação significativa em grande parte do mundo, ainda que o nível de contaminação possa variar dependendo da região e das condições climáticas (Lee e Ryu, 2017). Entre os diferentes cereais, destaca-se o milho, uma das principais fontes de exposição às aflatoxinas (Neme e Mohammed, 2017). A cultura de milho é particularmente suscetível ao stress hídrico, o que reduz os mecanismos de defesa da planta. Dado que os solos tropicais onde o milho é cultivado são frequentemente contaminados com *A. flavus*, um dos grandes produtores de aflatoxinas, as infeções por estes fungos são comuns nestes alimentos (Mahuku *et al.*, 2019; Taniwaki, Pitt e Magan, 2018). Particularmente no armazenamento das culturas, os fungos são a principal causa de deterioração do milho, podendo levar à perda de qualidade nutricional e organolética, reduzindo assim o seu valor para uso final em alimentos e rações. Em África, vários países detetaram níveis elevados de contaminação no milho, com a agravante de que estes níveis estão frequentemente acima dos limites máximos, nacionais e/ou internacionais, permitidos

representando um risco para a saúde dos consumidores (Neme e Mohammed, 2017). Para além do clima favorável nestes países, a maioria das suas comunidades depende da agricultura de subsistência, com sistemas tradicionais (Benkerroum, 2019). Consequentemente, estas populações seguem uma alimentação pouco variada, baseada sobretudo no milho, que é considerado o principal alimento base em grande parte dos países de África, o que aumenta o risco de exposição crónica às aflatoxinas (Liverpool-Tasie *et al.*, 2019; Mupunga, Mngqawa e Katerere, 2017). Por exemplo, num estudo no Quênia, foram analisadas 789 amostras de milho de pequenos agricultores, das quais 507 (64,3%) estavam contaminadas com aflatoxinas, com níveis entre 0,01 e 9091,8µg/kg (Mahuku *et al.*, 2019). Estes resultados foram ao encontro do estudo de Liverpool-Tasie e col. (2019) realizado na Nigéria, um dos principais produtores de milho no continente africano. Neste estudo, verificaram que 52% das amostras (76 em 147) de milho e produtos derivados para consumo humano e animal, estavam contaminadas com aflatoxinas, apresentando níveis acima do limite máximo tolerado no país (4µg/kg) (Liverpool-Tasie *et al.*, 2019).

Outro alimento que constitui particular preocupação é o amendoim. Dado o seu elevado valor nutricional, o amendoim é também um alimento importante a nível mundial, sobretudo em países menos desenvolvidos, onde constitui uma boa fonte de proteína e micronutrientes (Monyo *et al.*, 2012; Mupunga, Mngqawa e Katerere, 2017). No entanto, à semelhança do milho, a cultura do amendoim é bastante suscetível à infeção por fungos produtores de aflatoxinas, o que constitui um desafio visto que o amendoim é maioritariamente produzido em países tropicais e subtropicais (Mupunga, Mngqawa e Katerere, 2017; Taniwaki, Pitt e Magan, 2018). Por constituir motivo de preocupação para a saúde, a contaminação deste alimento com aflatoxinas afeta ainda a sua exportação, principalmente para a União Europeia (UE) (Monyo *et al.*, 2012). Tendo em conta o seu elevado consumo e a ocorrência de aflatoxinas, diversos estudos foram realizados nos últimos anos e apontam para uma prevalência significativa de contaminação do amendoim em vários países, incluindo na África (Mupunga, Mngqawa e Katerere, 2017). No estudo de Monyo e col. (2012) foram recolhidas 1397 amostras de amendoim (incluindo manteiga de amendoim) provenientes de propriedades agrícolas, mercados locais e supermercados em Malawi. No total, 46% das amostras em 2008 e 23% das amostras em 2009 apresentavam níveis de AFB1 superiores a 4µg/kg, tendo sido detetadas concentrações máximas de 2197µg/kg e 3240µg/kg, respetivamente. Este estudo revelou ainda que, tanto os agricultores menos experientes como os agricultores mais velhos tinham maior probabilidade de produzir amendoim contaminado com aflatoxinas (Monyo *et al.*, 2012).

Embora o milho e o amendoim sejam as principais fontes de exposição, as aflatoxinas podem ocorrer noutros alimentos (Benkerroum, 2020a; Neme e Mohammed, 2017). A Tabela 3 resume alguns dados publicados relativos à contaminação de diferentes matrizes alimentares.

Tabela 3 - Ocorrência de aflatoxinas nos produtos alimentares de diferentes países.

Alimento	País	N.º Total de amostras	N.º Amostras positivas (%)	Intervalo de contaminação (µg/kg   µg/L)	Referência
Chá preto	Paquistão	120	94 (78,3%)	0,11 – 16,17	Ismail <i>et al.</i> (2020)
Leite de vaca	China	734	590 (80,4%)	0,005 – 0,104	Xiong <i>et al.</i> (2020)
Especiarias e ervas aromáticas	Libano	138	21 (15,2%)	2,2 – 1118,3	Darra <i>et al.</i> (2019)
Cacau	Brasil	123	20 (16,3%)	0,35 – 30	Pires <i>et al.</i> (2019)
Milho	Vietname	378	345 (91,3%)	<1,0 – 417	Nguyen <i>et al.</i> (2018)
Trigo	China	178	11 (6,2%)	0,03 – 0,12	(Zhao <i>et al.</i> 2018)
Amendoim	Costa Rica	572	125 (21,8%)	0,48 – 400	Granados-Chinchilla <i>et al.</i> , 2017)
Milho	Costa Rica	453	175 (38,6%)	0,48 – 420	Granados-Chinchilla <i>et al.</i> (2017)
Milho	Sérvia	180	103 (57,2%)	1,3 – 91,4	Janić Hajnal <i>et al.</i> (2017)
Leite de vaca e búfalo	Itália	804	79 (9,8%)	0,004 – 0,052	Roma <i>et al.</i> (2017)
Amendoim	Zâmbia	92	51 (55,4%)	0,014 – 48,67	Bumbangi <i>et al.</i> , 2016)
Arroz	Paquistão	208	73 (35%)	0,04 – 32,2	Iqbal <i>et al.</i> , 2016)
Avelãs	Turquia	170	11 (6,5%)	0,09 – 11,3	Kabak (2016)
Figos secos	Turquia	130	16 (12,3%)	0,1 – 28,2	Kabak (2016)
Arroz	China	370	235 (63,5%)	0,03 – 21	Lai <i>et al.</i> (2015)
Pistácios	Irão	84	84 (100%)	1,28 – 77,12	Mahmoudi <i>et al.</i> (2014)
Cajus	Brasil	70	24 (34,3%)	2 – 31,5	Milhorne <i>et al.</i> (2014)
Amendoim	Etiópia	120	93 (77,5%)	15 – 11 900	Chala <i>et al.</i> (2013)
Leite de vaca	Portugal	40	11 (27,5%)	0,005 – 0,069	Duarte <i>et al.</i> (2013)
Sorgo	Índia	1606	1173 (73%)	0,01 – 263,98	Ratnavathi <i>et al.</i> (2012)

À semelhança da alimentação humana, os cereais são ingredientes importantes nas rações para animais, constituindo uma parte significativa da sua alimentação diária (Pinotti *et al.*, 2016). Contudo, as micotoxinas, incluindo as aflatoxinas, contaminam frequentemente estes alimentos. Gruber-Dorninger e col. (2019) realizaram um estudo à escala global, onde analisaram 74 821 amostras de rações e matérias-primas (como milho, trigo e soja) em 100 países entre 2008 e 2017. A AFBI foi prevalente, e detetada com concentrações elevadas, em amostras provenientes da África Subariana (76,0%), Sudeste Asiático (82,2%) e Sul da Ásia (57,4%) (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019). Consequentemente, após a ingestão de aflatoxinas, estas podem ser transferidas para os produtos animais, incluindo o leite. Num estudo na China, Xiong e col. (2018) pretenderam analisar a ocorrência de AFBI em rações de vacas leiteiras e determinar as concentrações de AFMI no leite. Este estudo revelou que, das 174 amostras de ração, 35,1% encontravam-se contaminadas com AFBI, sendo que as rações de amendoim e as de milho apresentavam concentrações superiores em relação às restantes matérias-primas analisadas. Adicionalmente, os autores constataram que, de um total de 242 amostras de leite, 178 (73,6%) foram positivas para a presença de AFMI, entre as quais 58 amostras eram de leite ultrapasteurizado (UHT) e 120 amostras de leite pasteurizado (Xiong *et al.*, 2018).

## 2.7. Legislação

Tendo em conta a toxicidade das aflatoxinas, e a sua ocorrência em diversas matrizes alimentares, vários países implementaram legislação que permite limitar a exposição humana a estes contaminantes (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016). Atualmente, cerca de 100 países estipulam limites máximos permitidos para a presença de aflatoxinas nos géneros alimentícios, no entanto os requisitos regulamentares variam entre os diversos países, dependendo do seu desenvolvimento e condição económica (Alshannaq e Yu, 2017; Ismail *et al.*, 2016). Geralmente, os países desenvolvidos possuem legislação mais rigorosa de modo a assegurar um elevado nível de proteção da saúde dos consumidores, enquanto que os países em desenvolvimento adotam limites máximos mais permissivos, visando um equilíbrio na segurança alimentar do ponto de vista sanitário (*food safety*) e a segurança do abastecimento/disponibilidade de alimentos (*food security*). Por outro lado, ainda existem países que não promulgaram legislação para a presença de aflatoxinas nos alimentos devido aos elevados custos associados e à falta de capacidade para monitorização e controlo. Isto leva à disparidade entre as legislações, dificultando a harmonização destes valores a nível mundial. A imposição de limites mais rigorosos aos países produtores afeta gravemente não só a possibilidade de exportação como ainda a saúde pública. Por representar uma parte

significativa da sua economia, estes países tendem a exportar os produtos de melhor qualidade e manter os de menor qualidade para o consumo local, geralmente com elevadas concentrações de aflatoxinas, o que aumenta a exposição destas populações tendencialmente mais vulneráveis (Benkerroum, 2019).

A nível mundial, a JECFA é o organismo responsável pela avaliação de riscos associados à contaminação dos alimentos com micotoxinas (incluindo as aflatoxinas). Na UE, a entidade responsável é a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA – *European Food Safety Authority*), que à posteriori emite pareceres científicos à Comissão Europeia (Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). São várias as autoridades competentes, nacionais e internacionais, que estabelecem limites regulamentares relativos aos níveis de aflatoxinas nos alimentos, entre as quais a Comissão do *Codex Alimentarius*, a Comissão Europeia e a Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA – *Food and Drug Administration*) (Agriopoulou, Stamatelopoulou e Varzakas, 2020). A maioria dos países em desenvolvimento implementa os limites legais instituídos pela Comissão do *Codex Alimentarius* ou pela Comissão Europeia (Ismail *et al.*, 2016). Tendo em vista a garantia do acesso a alimentos seguros, estão legalmente fixados teores máximos permitidos para a AFBI e/ou para o total de aflatoxinas (somatório da AFBI, AFB2, AFG1 e AFG2), dependendo do país, em diversos géneros alimentícios. Alguns países estabelecem ainda teores máximos para a AFMI no leite, assim como em alimentos destinados a lactentes e crianças jovens (Benkerroum, 2019) (Tabela 4).

Os teores máximos permitidos variam consoante o tipo de aflatoxinas e o produto alimentar, sendo que a UE estabelece os padrões mais rigorosos (Ismail *et al.*, 2016). No que se refere à AFMI em alimentos destinados a lactentes e crianças jovens, são estipulados teores mais reduzidos, dado que constituem um grupo vulnerável a estes contaminantes (Regulamento 1881/2006). Também os produtos destinados à alimentação animal possuem limites máximos estabelecidos para a AFBI, variando entre 5µg/kg de alimento pela Comissão Europeia (Diretiva 2002/32/CE) e 20µg/kg de alimento pela FDA (2018), destinados a animais leiteiros. Compreensivelmente, não existe legislação específica para a presença de aflatoxinas (AFMI) no leite materno (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016).

Considerando que as aflatoxinas são substâncias cancerígenas genotóxicas, a determinação dos limites regulamentares segue o princípio ALARA (*As Low As Reasonably Achievable*), ou seja, os níveis devem ser tão baixos quanto possível dado que não existe um nível considerado seguro para consumo (Ismail *et al.*, 2020). Uma vez que é difícil a total eliminação das aflatoxinas da cadeia alimentar, esta abordagem permite minimizar a exposição a estes contaminantes (Giovati *et al.*, 2015).

Tabela 4 - Limites máximos (LM; µg/kg) permitidos para a presença de aflatoxinas em diferentes produtos alimentares e segundo diferentes organismos (Codex Alimentarius, 2019; FDA, 2018; Regulamento (CE) N.º 1881/2006; Regulamento (UE) N.º 165/2010; e Regulamento (UE) N.º 1058/2012).

Género Alimentício	Aflatoxina	Comissão Europeia	FDA	Comissão do Codex Alimentarius
		LM	LM	LM
Todos os alimentos, à exceção do leite	Total	–	20,0	–
Amêndoas, castanha do Brasil, avelã e pistácios*	Total	–	–	10,0
Amendoins, frutos de casca rija e frutos secos*	AFBI	2,0	–	–
	Total	4,0	–	–
Avelãs e castanhas do Brasil*	AFBI	5,0	–	–
	Total	10,0	–	–
Pistácios*	AFBI	8,0	–	–
	Total	10,0	–	–
Todos os cereais e produtos derivados de cereais	AFBI	2,0	–	–
	Total	4,0	–	–
Figos secos	AFBI	6,0	–	–
	Total	10,0	–	10,0
Certas espécies de especiarias	AFBI	5,0	–	–
	Total	10,0	–	–
Leite	AFMI	0,05	0,5	0,5
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	AFBI	0,10	–	–
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebés e leite de transição	AFMI	0,025	–	–
Alimentos dietéticos para fins medicinais específicos (destinados a lactentes)	AFBI	0,10	–	–
	AFMI	0,025	–	–

\* Incluem produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano direto ou como ingrediente de géneros alimentícios.

Com o intuito de assegurar o cumprimento dos requisitos legislativos em vigor, a UE realiza uma monitorização dos produtos importados, nos postos fronteiriços, para a ocorrência de certos contaminantes, nomeadamente as aflatoxinas. Os resultados desta monitorização podem ser consultados no site do Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais (RASFF – *Rapid Alert System for Food and Feed*), uma ferramenta que permite o intercâmbio de informações relativas a perigos para a saúde associados aos produtos alimentares e alimentos para animais (Regulamento 178/2002). No Regulamento (CE) n.º 1881/2006, é definido que “os produtos que contenham contaminantes que excedam os teores máximos não devem ser colocados no mercado como tal, nem após mistura com outros géneros alimentícios, nem utilizados como ingredientes noutras alimentos”. De acordo com o relatório anual do RASFF, em 2019 foram registadas 534 notificações para as micotoxinas, correspondendo à categoria de “perigo alimentar” com o maior número de notificações, à semelhança de anos anteriores. As aflatoxinas são as micotoxinas mais relatadas nos alimentos, particularmente em frutos secos, provenientes de países como a Argentina, Turquia e EUA (RASFF 2020).

### **3. Avaliação da Exposição Humana**

A principal via de exposição às aflatoxinas, quer para o ser humano quer para os animais, é através da ingestão de alimentos contaminados. São preconizadas duas formas para avaliar esta exposição: (i) avaliação da exposição alimentar (abordagem indireta) – através de dados estatísticos do consumo alimentar da população e da concentração dos contaminantes nos alimentos; (ii) biomonitorização humana (abordagem direta) – determinação dos níveis de aflatoxinas em fluidos biológicos como o sangue, urina ou leite materno (Al-Jaal et al., 2019; Vidal et al., 2018). A primeira abordagem apresenta algumas limitações, nomeadamente viés de memória em relação ao consumo alimentar, ou o facto de as aflatoxinas terem uma distribuição heterogénea nos alimentos, o que pode subestimar ou sobrestimar a exposição (Al-Jaal et al., 2019; Heyndrickx et al., 2015). Deste modo, a biomonitorização humana tem vindo a ser adotada como a abordagem preferencial uma vez que, através da quantificação das substâncias químicas ou dos seus metabolitos (isto é, de biomarcadores de exposição) numa amostra biológica, é possível obter uma forte correlação com a ingestão destas toxinas (Ali et al., 2017; Vidal et al., 2018). Nesta abordagem, a variação individual da absorção, distribuição, metabolização e excreção é integrada ao analisar os níveis dos biomarcadores, o que proporciona uma avaliação mais precisa da exposição de cada indivíduo (Heyndrickx et al., 2015). Adicionalmente, permite incluir a ingestão de aflatoxinas provenientes de todas as

fontes alimentares que se encontravam contaminadas, assim como incluir todas as vias de exposição (Ali *et al.*, 2017).

### 3.1. Biomonitorização Humana

Vários metabolitos da AFBI, incluindo a AFQI, AFMI, AFPI e AFBI-N7-Gua, podem ser encontrados na urina, sangue, fezes e/ou no leite após a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas, sendo, por isso, usados como biomarcadores de exposição (Vidal *et al.*, 2018). O tipo de matriz biológica e os recursos analíticos disponíveis determinam a escolha do biomarcador para analisar os níveis de exposição. A colheita de amostras de sangue é invasiva e requer a intervenção de profissionais qualificados, enquanto a recolha de outros fluídos biológicos, como a urina e leite materno, é mais fácil e muitas vezes apresenta maior aceitabilidade por parte dos participantes (Ali *et al.*, 2017). É também importante ter em consideração as características de cada biomarcador, nomeadamente o tempo de semi-vida, já que a estimativa destes indicadores pode refletir uma exposição de curto ou de longo prazo (Al-Jaal *et al.*, 2019; Williams *et al.*, 2004). Por exemplo, o aducto aflatoxina-albumina no soro sanguíneo é considerado o biomarcador mais confiável para avaliar a exposição correspondente a um período mais alargado, devido ao seu tempo de semi-vida (em média, 20 dias), e o facto de persistir no soro durante cerca de 3 meses (Benkerroum, 2019). Por sua vez, o aducto AFBI-N7-Gua na urina tem sido frequentemente usado como biomarcador para determinar a exposição recente às aflatoxinas (entre 24 e 48 horas) (Benkerroum, 2019; Vidal *et al.*, 2018). A AFMI, detetada no leite materno e na urina, é igualmente considerada um biomarcador de curto prazo, permitindo apenas obter dados em relação a uma exposição recente às aflatoxinas (Al-Jaal *et al.*, 2019; Giovati *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, têm sido realizados vários estudos em todo o mundo com o intuito de avaliar a exposição humana às micotoxinas, incluindo as aflatoxinas. Particularmente nos países em desenvolvimento, tem sido frequentemente detetada concentrações de aflatoxinas nas diferentes matrizes biológicas, sendo a urina a mais amplamente usada (Al-Jaal *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2017). Nestes países, a maioria das comunidades depende da agricultura de subsistência, com recurso a métodos tradicionais, sem intervenção para o controlo da contaminação por aflatoxinas. Consequentemente, estas populações são continuamente expostas a estes contaminantes através da sua alimentação. Visto que nestes países os dados relativos ao nível de contaminação dos alimentos por aflatoxinas são escassos, a biomonitorização humana consiste na melhor abordagem para obter informações alusivas à exposição humana, que será importante na fundamentação da necessidade de intervenção por parte das autoridades competentes (Ali *et al.*, 2017; Benkerroum, 2019). Num trabalho recente de revisão, Al-Jaal e

col. (2019) concluíram que os resultados mais significativos foram reportados em estudos com crianças de África, expostas a micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas). Foi verificado que, em certos países, mais de 60% destas crianças estão expostas às aflatoxinas (Al-Jaal *et al.*, 2019). Por exemplo, num estudo na Tanzânia, 72% das crianças (com 24 meses de idade) apresentavam níveis detetáveis de AFBI-lisina no plasma (Chen *et al.*, 2018). Já na Nigéria, Ezekiel e col. (2018) analisaram amostras de urina de 84 participantes, incluindo crianças, adolescentes e adultos, e verificaram que 98,8% das amostras continham níveis detetáveis de AFMI. Também no trabalho de revisão de Al-Jaal e col. (2019), os autores concluíram que a exposição das populações às aflatoxinas em países da Ásia ocorre igualmente com frequência e que, na maioria dos estudos analisados, a incidência de biomarcadores foi superior a 93%, independentemente do tipo de amostra biológica analisada. No Bangladesh, foi observada uma incidência mais baixa, tendo sido detetados níveis de AFMI na urina em 40% das amostras recolhidas no período do verão e em 42% das amostras no inverno. Ainda assim, reconhecidos os efeitos destes contaminantes, estes resultados constituem motivo de preocupação para a população (Ali *et al.*, 2017). Em contraste, normalmente os resultados de estudos realizados na Europa revelam uma menor prevalência de aflatoxinas em amostras biológicas e níveis de biomarcadores mais baixos, comparativamente a outras regiões (Al-Jaal *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2017). Na Bélgica, foi desenvolvido um estudo (BIOMYCO) com o objetivo de avaliar a exposição de crianças (n=155) e adultos (n=239) a múltiplas micotoxinas, através da determinação de biomarcadores na urina. Apenas 9 dos 33 biomarcadores foram detetados nas amostras analisadas, sendo que não verificaram a presença de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFMI) (Heyndrickx *et al.*, 2015).

### 3.2. Métodos Analíticos

Desde a descoberta das micotoxinas, vários métodos analíticos foram desenvolvidos e validados para estudar estes contaminantes químicos em alimentos e rações (Alshannaq e Yu, 2017). Os avanços tecnológicos nos últimos anos, com o aumento da precisão e sensibilidade das ferramentas analíticas disponíveis, têm permitido incrementar os conhecimentos relativos às aflatoxinas. Contudo, estes mesmos avanços despertaram novos desafios para a comunidade internacional, associados sobretudo às enormes lacunas socioeconómicas, tecnológicas e legislativas verificadas entre os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento. Fundamentalmente, estes obstáculos devem ser superados com vista a alcançar o objetivo maior de reduzir ao máximo a incidência de aflatoxinas nos alimentos e rações, e os consequentes riscos para a saúde (Benkerroum, 2019).

Cada método analítico apresenta vantagens e limitações, diferenciando-se quanto à sua sensibilidade, facilidade de utilização e custo (Mahfuz *et al.*, 2018). Entre as diversas técnicas existentes, os métodos cromatográficos e imunológicos são os mais confiáveis e amplamente usados para a detecção e quantificação de aflatoxinas em estudos científicos, ou mesmo em laboratórios para controlo oficial (Benkerroum, 2019). Para além destes, novos métodos estão a ser desenvolvidos para tornar esta detecção e quantificação cada vez mais eficiente, tanto para uso no campo como em laboratório, contudo aguardam melhorias no que diz respeito à sua precisão e sensibilidade para serem oficialmente validados (Benkerroum, 2019; Mahfuz *et al.*, 2018). Embora até ao momento tenha sido alcançado grande progresso nesta área, os investigadores enfrentam ainda alguns desafios, nomeadamente a dificuldade na detecção de baixos níveis de contaminação e a complexidade das matrizes alimentares (Alshannaq e Yu, 2017).

Os procedimentos analíticos para a determinação de micotoxinas em amostras alimentares geralmente contemplam as seguintes etapas: amostragem, preparação da amostra (que pode incluir a extração e purificação) e, finalmente, a detecção e quantificação (Alshannaq e Yu, 2017; Mahfuz *et al.*, 2018). À exceção das amostras de alimentos líquidos como o leite, a distribuição das aflatoxinas é muito heterogénea (Alshannaq e Yu, 2017), principalmente em produtos alimentares com partículas grandes, como é o caso dos figos secos ou dos amendoins (Regulamento 401/2006). Por esta razão, é importante implementar um plano de amostragem eficaz, com o intuito de garantir que a amostra testada é representativa e, assim, assegurar a veracidade dos resultados (Alshannaq e Yu, 2017). Na UE, o Regulamento (CE) n° 401/2006 estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios.

Os métodos analíticos de referência para a detecção de aflatoxinas em diversos tipos de amostras são as técnicas cromatográficas, incluindo a cromatografia líquida (LC – *liquid chromatography*), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high-performance liquid chromatography*) e a cromatografia em camada fina (TLC – *thin-layer chromatography*). Embora estes métodos garantam elevada sensibilidade, são dispendiosos, exigem técnicos especializados, equipamentos sofisticados e a sua implementação é demorada. Para fazer face às dificuldades de implementação destes métodos, torna-se necessário a adoção de métodos mais simples e rápidos para a identificação de amostras positivas. Uma variedade de métodos imunológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), são usados como métodos de triagem rápida (Mahfuz *et al.*, 2018). Ressalva-se, no entanto, que estes métodos geralmente necessitam de confirmação dos resultados por um método cromatográfico (Alshannaq e Yu, 2017; Mahfuz *et al.*, 2018).

Os ensaios ELISA são métodos sensíveis, específicos e relativamente fáceis de aplicar para a detecção de aflatoxinas (Alshannaq e Yu, 2017; Mahfuz *et al.*, 2018). O princípio deste método é baseado na interação entre o antigénio e o anticorpo, isto é, a micotoxina proveniente da amostra e a micotoxina marcada com enzima competem pela ligação a locais específicos em anticorpos. A quantidade de conjugado micotoxina-enzima ligado ao anticorpo determinará a intensidade da cor produzida, ou seja, quanto maior a concentração de aflatoxinas, menor será a intensidade da cor (Alshannaq e Yu, 2017; Vaz *et al.*, 2020). Existem dois tipos de métodos ELISA competitivo: competitivo direto e competitivo indireto. No método competitivo direto, os poços da placa de microtitulação são revestidos por um anticorpo específico para o analito em análise; já no método competitivo indireto, os poços da placa são revestidos com um conjugado analito-proteína. Entre estes, o ELISA competitivo direto é o método mais usado para a análise de aflatoxinas (Vaz *et al.*, 2020). Apesar das suas vantagens, o ELISA apresenta algumas limitações como, a possibilidade de apresentar resultados falsos-positivos devido à sua sensibilidade para com os compostos interferentes da matriz, e a especificidade deste método (Alshannaq e Yu, 2017; Mahfuz *et al.*, 2018). Ainda assim, esta técnica é amplamente usada para a determinação de aflatoxinas, incluindo a AFMI em produtos lácteos, e está atualmente validada para uma variedade de matrizes alimentares, havendo vários *kits* comerciais disponíveis para a sua aplicação (Alshannaq e Yu, 2017; Vaz *et al.*, 2020).

Outro exemplo de método de triagem rápida são os ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral. Este método tem como fundamento o uso de tiras de teste, baseado em imunoenaios competitivos (Alshannaq e Yu, 2017). Os resultados são obtidos num prazo de 15 minutos e destaca-se o facto de poderem ser aplicados quer no laboratório quer no campo. Algumas das suas vantagens incluem: baixo custo, são portáteis, simplicidade do procedimento e não requerem técnicos qualificados nem equipamentos dispendiosos (Zhang *et al.*, 2013). Estes testes estão comercialmente disponíveis para detecção de diversas micotoxinas, incluindo as aflatoxinas (Alshannaq e Yu, 2017). São contínuos os trabalhos de pesquisa dedicados ao desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais rápidos e precisos, acessíveis economicamente, e que possam analisar um grande número de amostras. Atendendo à necessidade de métodos para a monitorização de produtos alimentares no local, Zhang *et al.* (2013) desenvolveram um ensaio imunocromatográfico semiquantitativo sem detetor para a monitorização das aflatoxinas, a fim de melhorar a precisão de triagem do método tradicional. Para além da obtenção de resultados qualitativos (presença ou ausência), foi possível determinar o nível de contaminação, sendo que o limite de detecção visual foi de 0,06ng/ml para a AFBI. A concordância dos resultados deste trabalho com os obtidos pelo HPLC na

deteção de AFB1 em amendoins e rações revelou que este ensaio pode ser proposto como um método alternativo de triagem rápida (Zhang *et al.*, 2013).

Dada a condicionante económica, os países em desenvolvimento, onde existe elevada incidência de exposição às aflatoxinas, têm acesso limitado a grande parte dos métodos analíticos (Benkerroum, 2019; Mahfuz *et al.*, 2018). Tendo em conta as fundadas preocupações quanto a estes contaminantes, que devido ao comércio internacional se tornam um problema global, é premente a disponibilidade de métodos simples, de baixo custo, e ainda assim confiáveis. Deste modo, os métodos de triagem rápida, em particular os que utilizem dispositivos portáteis, como o exemplo anterior dos ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral, são uma solução viável para estes países. Pretende-se que, com este tipo de métodos mais acessíveis, pequenos agricultores, bem como as pequenas e médias empresas, possam monitorizar os níveis de contaminação dos produtos alimentares nestes países, e aplicar ações corretivas sempre que necessário (Benkerroum, 2019).

**Parte II**  
**Trabalho Experimental**

#### 4. Justificação e contextualização do estudo

O leite materno é considerado o melhor alimento para os recém-nascidos, dado que a sua composição é inteiramente ajustada às necessidades nutricionais e imunológicas do bebé. Reconhecidos os seus inúmeros benefícios, é recomendado pela OMS o aleitamento materno em exclusivo durante os primeiros 6 meses de vida. Em países mais vulneráveis economicamente, o leite materno é crucial, visto que as possíveis alternativas carecem de nutrientes essenciais para esta fase de crescimento e desenvolvimento (Warth *et al.*, 2016). Ainda que seja um alimento importante, o leite materno pode também conter contaminantes químicos, como as aflatoxinas, em consequência da exposição alimentar da mãe (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016). Esta contaminação é motivo de preocupação visto que os bebés e crianças constituem um grupo particularmente vulnerável, devido à sua menor capacidade para metabolizar e excretar toxinas, à sua dieta bastante restrita e por ingerirem maior quantidade de alimentos por quilograma de peso corporal, em comparação com um adulto (Fakhri *et al.*, 2019; Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). Atendendo a esta vulnerabilidade e aos efeitos toxicológicos provocados pelas aflatoxinas, os limites estipulados na legislação para a alimentação infantil são bastante rigorosos e controlados por planos de vigilância. No entanto, o leite materno é raramente avaliado (Warth *et al.*, 2016).

O leite materno é uma matriz biológica complexa. A sua composição altera-se ao longo do tempo (por exemplo, entre colostro e leite maduro), assim como na mesma mamada, de acordo com as necessidades do bebé (Karayağiz Muslu e Özdemir, 2020; Warth *et al.*, 2016). Esta variação, particularmente em relação ao teor de gordura, pode ter um efeito na concentração das aflatoxinas, tendo em conta a sua propriedade lipofílica (Warth *et al.*, 2016). Ainda assim, considerando todos os fatores e com recurso a métodos analíticos precisos, esta matriz biológica pode permitir averiguar a exposição da mãe e do lactente às aflatoxinas, através da determinação do metabolito AFMI (Al-Jaal *et al.*, 2019; Warth *et al.*, 2016).

As estimativas de exposição alimentar às aflatoxinas variam consideravelmente entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento. Geralmente, a exposição média nos países desenvolvidos é inferior a 1ng/kg de peso corporal/dia. Em contraste, esta estimativa varia aproximadamente entre 0,1 e 49ng/kg de peso corporal/dia nos países em desenvolvimento, tendo sido reportada exposição superior a 100ng/kg de peso corporal/dia em alguns países da África Subsariana (Benkerroum, 2020a; JECFA, 2017). A exposição às aflatoxinas pode ser direta, através da ingestão de alimentos contaminados, como cereais e frutos secos; ou indireta, através de produtos de origem animal, como o leite e ovos, dada a transferência destas micotoxinas de rações contaminadas (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016).

Angola é um país da África Subsariana, situado na costa Atlântica, com uma área de 1 246 700 km<sup>2</sup> (Pacheco, Carvalho e Henriques, 2013). De acordo com o Banco Mundial, é a terceira maior economia da África Subsariana, e classificada como um país de rendimento médio-baixo (World Bank, 2020). Quanto ao Índice de Desenvolvimento Humano do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (2019), que este ano se centrou nas desigualdades e que tem por base indicadores como o rendimento, educação e saúde, Angola ocupa a posição 149 no *ranking* de 189 países, considerado um nível médio. A vasta extensão deste país integra a zona de convergência intertropical, uma região de instabilidade meteorológica intensa, que desencadeia a estação chuvosa durante o verão. O clima neste país é fortemente sazonal, com verões quentes e húmidos (entre outubro e maio) e invernos amenos e frios (entre junho e setembro) (Huntley *et al.*, 2019). Geralmente, existe mais de um tipo de clima no mesmo país, dependendo da região geográfica (Benkerroum, 2020a; Kottek *et al.*, 2006). Segundo o sistema de classificação de Köppen-Geiger, a região norte de Angola possui um clima tropical com inverno seco (Aw), a região do planalto com clima temperado e inverno seco (Cw), e o sudoeste e planície costeira com clima desértico quente e semidesértico quente (Bsh, Bwh) (Huntley *et al.*, 2019; Kottek *et al.*, 2006). A diversidade de condições edafoclimáticas verificada neste país é responsável pela variedade de culturas e tipos de exploração agrícola. A produção agrícola em Angola baseia-se sobretudo na mandioca, batata doce, milho, banana, batata, feijão e amendoim, sendo que a maior parte da área cultivada é da responsabilidade de empresas agrícolas familiares (Pacheco, Carvalho e Henriques, 2013).

Considerando a escassez de dados relativos à exposição da população às aflatoxinas em Angola, e sendo este um potencial país de risco para a contaminação alimentar, o presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência e os níveis de AFMI em amostras de leite materno provenientes de Belize, em Angola e avaliar a exposição dos lactentes a esta toxina. Pretendeu-se ainda avaliar a potencial correlação entre os níveis de AFMI, os fatores sociodemográficos e o consumo alimentar das mães.

## **5. Material e Métodos**

### **5.1. Amostragem**

As amostras de leite materno foram colhidas no Inverno, em dois momentos: o primeiro decorreu entre agosto e setembro de 2018, e o segundo em agosto de 2019. No total, foram obtidas 37 amostras de mães lactantes residentes no município de Belize, da província Angolana de Cabinda, um enclave no Congo, a norte do resto do território Angolano. As amostras foram obtidas no Centro de Saúde, e a colheita do leite foi realizada por extração manual, com auxílio de uma enfermeira, em sacos estéreis de conservação. Após esta colheita, as amostras foram imediatamente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e preservadas a temperatura constante, protegidas da luz direta, durante todo o transporte. Foram mantidas estas condições até à sua análise no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Escola Universitária Vasco da Gama, em Coimbra.

As participantes incluídas neste estudo cumpriram os seguintes critérios: em aleitamento, sem registo de doença sistémica ou mamária, termo de consentimento informado assinado e questionário preenchido. Os critérios de exclusão definidos foram: idade inferior a 18 anos e parto à menos de um mês (para evitar a análise de colostro ou leite de transição).

Os procedimentos deste trabalho foram desenvolvidos de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial (WMA) (World Medical Association, 2013), a Declaração de Taipé da WMA sobre as considerações éticas relativas às bases de dados de saúde e aos biobancos (World Medical Association, 2016), e ainda a Convenção de Oviedo para a proteção dos direitos do Homem e da dignidade do ser humano face às aplicações da biologia e da medicina (Decreto do Presidente da República n.º 1/2001). Este estudo foi aprovado pelo Conselho Científico da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Escola Universitária Vasco da Gama (parecer n.º 2019/001). A obtenção de amostras foi ainda autorizada pela Direção do Hospital do Belize, a Repartição Municipal da Saúde do Belize e Secretaria Provincial da Saúde em Cabinda. As participantes ingressaram neste estudo de forma voluntária, após assinarem o termo de consentimento informado, onde foram esclarecidos os objetivos e procedimentos do mesmo, e garantida a confidencialidade e anonimato dos dados recolhidos (ANEXO I e II).

### **5.2. Dados sociodemográficos e consumo alimentar**

Para a caracterização da amostra, as participantes foram instruídas para preencher um questionário aquando da recolha do leite materno. No primeiro período de recolha (em 2018), o questionário aplicado pretendeu obter informações relativas à idade da participante, número de filhos, formação escolar e profissão. Foram ainda obtidos dados quanto ao aleitamento

materno, se exclusivo ou complementado com fórmulas comerciais para lactentes, a data do parto e o peso do bebé à nascença e no momento da colheita do leite (ANEXO III). Adicionalmente, as participantes preencheram um questionário semi-quantitativo da frequência alimentar para determinar o consumo de alimentos na semana anterior à recolha da amostra de leite (sete dias anteriores) (ANEXO IV). Os alimentos incluídos neste questionário foram: leite, iogurte, café, arroz, pão, chocolate, cereais, bolachas, bolos e frutos secos.

No segundo período de colheita de amostras (em 2019), o questionário aplicado foi semelhante ao anterior, composto por três partes: (i) características individuais, nomeadamente idade, número de filhos, data do parto, peso do bebé no momento da recolha de leite; (ii) dados sociodemográficos, incluindo escolaridade, profissão e local de residência; e (iii) dados relativos à origem dos alimentos consumidos (produtos locais ou superfícies comerciais) (ANEXO V). Foi igualmente preenchido um questionário semi-quantitativo da frequência alimentar referente o consumo de alimentos na semana anterior à recolha da amostra de leite (sete dias anteriores) (ANEXO VI). Neste questionário foram incluídos os seguintes grupos de alimentos: laticínios; cereais e derivados; ovos, carne e pescado; fruto-hortícolas; doces (bolachas e chocolate); e frutos secos.

### **5.3. Determinação de AFMI**

Para a determinação de AFMI nas amostras de leite materno, foi realizada a técnica de ELISA competitivo através do kit comercial RIDASCREEN® Aflatoxin M1 (RI 121, R-Biopharm AG®, Alemanha), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Após a descongelação das amostras, estas foram sujeitas a uma centrifugação (centrífuga Sigma 3K15) durante 10 minutos a 3500g e 10°C. De seguida, a camada superior com gordura foi totalmente removida com uma pipeta Pasteur e o leite restante foi transferido para um novo tubo Eppendorf®. Foi necessário repetir este procedimento duas vezes uma vez que as amostras apresentavam elevado teor de gordura.

De seguida, foram registadas todas as posições das soluções padrão e das amostras na microplaca, havendo poços duplicados para cada uma. Adicionaram-se 100µl de anticorpo a cada poço, agitou-se a placa manualmente, e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente (20-25°C), no escuro. Após este período de incubação, descartou-se o líquido dos poços e sacudiu-se a microplaca vigorosamente contra papel absorvente para garantir a remoção completa do líquido dos poços. Foram adicionados 250µl de tampão de lavagem a todos os poços e removeu-se novamente o líquido. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. De seguida, adicionaram-se 100µl das soluções padrão e amostras preparadas aos

poços, em duplicado. Agitou-se a placa manualmente, e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente (20-25°C), no escuro. Repetiu-se o procedimento de lavagem, tal como descrito anteriormente. De seguida, adicionaram-se 100µl de conjugado enzimático aos poços, agitou-se a placa manualmente, e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente (20-25°C), no escuro. Efetuou-se novamente o procedimento de lavagem, tal como descrito anteriormente. Adicionaram-se 100µl de substrato/cromogénico a cada poço. Agitou-se a placa manualmente, e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente (20-25°C), no escuro. Por fim, acrescentaram-se 100µl de solução *stop* a cada poço, agitou-se a placa manualmente e mediu-se a absorbância a 450nm no leitor de microplacas (Optic Ivymen System 2100-C®).

#### 5.4. Quantificação de AFMI

As absorbâncias obtidas foram inseridas num *software* específico (RIDASOFT® Win.NET) do mesmo fabricante e, através da função spline cúbica, foi calculado o teor de AFMI em cada amostra. De acordo com o fabricante, o limite de deteção (LOD) correspondeu a 5ng/L.

#### 5.5. Ingestão Diária Estimada

A ingestão diária estimada (EDI) de AFMI foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (Degen *et al.*, 2017), e expressa em ng/kg peso corporal/dia:

$$EDI = \frac{\text{Concentração de AFM1} \times \text{consumo de leite}}{\text{Peso corporal}}$$

Equação 1. Fórmula de cálculo da Ingestão diária estimada

A concentração de AFMI corresponde ao teor determinado nas amostras positivas ( $\geq 5\text{ng/L}$ ), o consumo de leite corresponde ao volume médio de leite ingerido por dia pelos lactentes (expresso em ml/kg), e o peso corporal corresponde ao peso médio dos lactentes (expresso em kg) (Bogalho *et al.*, 2018). A estimativa de consumo diário de leite considerada foi de 150ml/kg (Yeung *et al.*, 2020). O peso corporal médio foi calculado tendo em conta o peso dos lactentes no momento da colheita do leite materno, conforme reportado pelas mães.

Para a avaliação do risco, foi calculado o quociente de perigo (HI – *Hazard Index*) através da ingestão diária tolerável (TDI), de acordo com a seguinte fórmula:

$$HI = \frac{EDI}{TDI}$$

Equação 2. Fórmula de cálculo do indicador de risco

O valor de TDI para a AFMI considerado foi 0,2ng/kg de peso corporal, proposto por Kuiper-Goodman (1990), que determinou a dose capaz de induzir o desenvolvimento de tumores em 50% dos animais, e dividiu por um fator de segurança de 50 000. O HI superior a 1,0 indica risco para os consumidores (Ishikawa *et al.*, 2016).

## 6. Resultados e Discussão

No total, foram analisadas 37 amostras de leite materno, sendo que as colheitas decorreram em dois períodos: o primeiro entre agosto e setembro de 2018 (n=18), e o segundo em agosto de 2019 (n=19). A Tabela 5 apresenta as principais características sociodemográficas e antropométricas das participantes e dos lactentes.

Tabela 5 - Principais características sociodemográficas e dados antropométricos da população em estudo (mães lactantes e bebês).

Variável	Frequência (%)	Média ± DP	Intervalo de valores
<b>Idade da mãe</b>		26,7 ± 7,08 anos	18 – 40 anos
18 – 25 anos	17/37 (45%)		
26 – 35 anos	15/37 (39%)		
≥ 36 anos	5/37 (13%)		
Sem resposta	1/37 (3%)		
<b>Profissão</b>			
Estudante	17/37 (46%)		
Doméstica	14/37 (38%)		
Operadora	1/37 (2%)	n.a.	n.a.
Professora	3/37 (8%)		
Técnica de hotelaria e turismo	1/37 (3%)		
Sem resposta	1/37 (3%)		
<b>Nível de escolaridade</b>			
Ensino primário/básico	19/37 (51%)		
Ensino secundário	15/37 (41%)		
Ensino superior (bacharelato/licenciatura)	1/37 (3%)	n.a.	n.a.
Mestrado/Doutoramento	0/37 (0%)		
Sem resposta	2/37 (5%)		
<b>Número de filhos</b>		3,0 ± 1,9 filhos	1 – 9 filhos
1	10/37 (27%)		
2	5/37 (14%)		
3	9/37 (24%)		
≥ 4	12/37 (32%)		
Sem resposta	1/37 (3%)		
<b>Idade dos lactentes</b>		6,0 ± 3,49 meses	1 – 18 meses
1 – 6 meses	21/37 (57%)		
7 – 12 meses	15/37 (34%)		
≥ 13 meses	1/37 (3%)		
<b>Peso dos lactentes <sup>(1)</sup></b>		7,5 ± 1,82kg	3,5 – 11,4kg

DP: Desvio Padrão; n.a.: não aplicável.

<sup>(1)</sup> Corresponde ao peso dos lactentes do momento da recolha das amostras de leite materno

As mães lactantes incluídas neste estudo apresentavam idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos (27±7,08 anos). Entre estas, 27% referiram ser o primeiro filho, enquanto as

restantes (70%) tinham dois ou mais filhos. Quanto ao nível de escolaridade, mais de metade das participantes (51%) tinham o ensino primário/básico, seguindo-se das participantes com ensino secundário (41%), e apenas uma com curso superior (bacharelato/licenciatura). Uma grande parte referiu ser estudante (46%), 38% das mães eram domésticas e apenas 13% mencionaram uma profissão. No que diz respeito aos lactentes, estes apresentavam idades compreendidas entre 1 e 18 meses ( $6,0 \pm 3,49$  meses) e o peso médio aquando da recolha das amostras de leite foi de  $7,5 \pm 1,82$ kg.

Das 37 amostras de leite analisadas, não foram detetados níveis de AFMI acima do LOD (5,0ng/L) (Figura 6) (ANEXO VII). Nos últimos anos, vários investigadores têm vindo a realizar estudos com o intuito de determinar a ocorrência de AFMI no leite materno em diferentes países. Alguns estudos têm reportado baixo nível de contaminação, como por exemplo no Irão (Ghiasain e Maghsood, 2012) foram detetados níveis de AFMI em 6,06% das amostras (7,1–10,8ng/L), no Brasil Ishikawa e col. (2016) verificaram 5,3% de amostras positivas (13–25ng/L), à semelhança do estudo de Iha e col. (2014) em que apenas 2 das 100 amostras analisadas se encontravam contaminadas (0,3 e 0,8ng/L). Em contraste, outros estudos na Nigéria (Ekeanyanwu, Alisi e Ekeanyanwu, 2020), Líbano (Elaridi *et al.*, 2017), Irão (Azarikia, Mahdavi e Nikniaz, 2018) e Colômbia (Diaz e Sánchez, 2015), têm verificado elevada incidência de contaminação do leite materno com AFMI (Tabela 6).

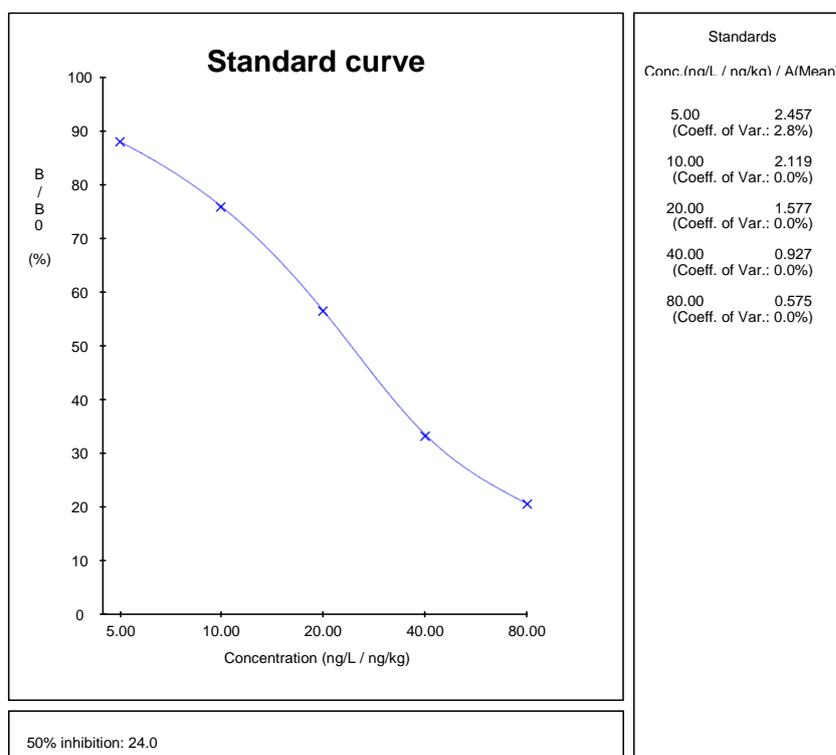


Figura 6 - Curva de calibração obtida a partir das soluções padrão de diferentes níveis de concentração (0, 5, 10, 20, 40, 80ng/L).

Tabela 6 - Ocorrência de AFMI em amostras de leite materno de acordo com estudos recentes.

País (ano)	Incidência (%)	Concentração de AFMI (ng/L)		Método analítico (LOD, ng/L)	Referência
		Média ± DP	Intervalo		
Angola (2018-2019)	0/37 (0%)	–	< 5,00	ELISA (5)	Presente estudo
Nigéria (2019)	225/225 (100%)	4,02 ± 1,12	2,33 – 7,08	HPLC (n.d.)	Ekeanyanwu, Alisi e Ekeanyanwu (2020)
Turquia (2017)	53/100 (53%)	6,36	5,10 – 8,31	ELISA (5)	Karayağiz Muslu e Özdemir (2020)
Irão (2016)	39/250 (15,6%)	21,00 ± 0,99	11,07 – 39,25	ELISA (2,3)	Jafari e col. (2017)
Portugal (2015-2016)	22/67 (32,8%)	7,4 ± 1,9	5,1 – 10,6	ELISA (5)	Bogalho e col. (2018)
Líbano (2015-2016)	104/111 (93,8%)	4,31 ± 1,8	0,22 – 7,89	ELISA (0,2)	Elaridi e col. (2017)
Irão (2015)	88/88 (100%)	3,16	0,1 – 13,6	ELISA (0,04)	Azarikia, Mahdavi e Nikniaz (2018)
Chipre (2015)	40/50 (80%)	7,84 ± 1,72	5,36 – 28,44	ELISA (5)	Kunter e col. (2017)
México (2014)	100/112 (89%)	10,35	3,01 – 34,24	ELISA (0,92)	Cantú-Cornelio e col. (2016)
Brasil (2013)	5/94 (5,3%)	18 ± 5	13 – 25	HPLC (4)	Ishikawa e col. (2016)
Colômbia (2013)	45/50 (90%)	5,2	0,9 – 18,5	HPLC (0,6)	Diaz e Sánchez (2015)
Brasil (2011/2012)	2/100 (2%)	0,55	0,3 – 0,8	LC (0,3)	Iha e col. (2014)
Jordânia (2011)	80/80 (100%)	67,78 ± 4,6	9,71 – 137,18	ELISA (5)	Omar (2012)
Egipto (2010)	87/125 (69,6%)	74,413 ± 7,070	7,3 – 328,6	ELISA (5)	El-Tras, El-Kady e Tayel (2011)

DP: Desvio Padrão; LOD: Limite de detecção; n.d.: não disponível.

As diferenças observadas entre os vários estudos, no que diz respeito à ocorrência e aos níveis de contaminação de AFMI, podem ser atribuídas a diversos fatores, entre os quais fatores ambientais, condições de armazenamento dos alimentos, métodos analíticos usados para determinar a AFMI, fatores socioeconômicos e os hábitos alimentares das mães (Elaridi *et al.*, 2017; Jafari *et al.*, 2017). No que diz respeito ao método analítico utilizado, tem sido demonstrado que o LOD pode influenciar a ocorrência destas diferenças. Um LOD mais elevado torna o método menos sensível, o que pode justificar um menor número de amostras positivas em alguns estudos (Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane, 2016). Dado que este foi

um estudo inicial em Angola, foi aplicada uma técnica de *screening* (ELISA) com um LOD de 5,0ng/L. Comparando, por exemplo, com os resultados de Iha e col. (2014) (LC; 0,3ng/L), os níveis de AFMI detetados nas únicas amostras positivas foram consideravelmente inferiores ao LOD do presente estudo. Ainda assim, salienta-se que, considerando os dados obtidos na análise das amostras de Angola, verificou-se que a exposição das mães lactantes às aflatoxinas foi baixa. Tanto quanto é do conhecimento do autor, este é o primeiro estudo de ocorrência de AFMI no leite materno em Angola, pelo que não foi possível a comparação com dados anteriores de ocorrência neste país. Atendendo à elevada prevalência de AFMI no leite materno em países de África reportada em estudos anteriores (Fakhri *et al.*, 2019), pode-se considerar que os resultados obtidos no presente estudo foram inesperados.

Em Cabinda, província onde foram recolhidas as amostras analisadas, a precipitação média anual é de 800mm e a temperatura média anual é de 25,0°C (Huntley *et al.*, 2019). Sob estas condições, os fungos aflatoxigénicos desenvolvem-se e produzem quantidades significativas de aflatoxinas, principalmente quando a  $a_w$  do substrato se encontra entre 0,90 e 0,99. Para além das condições climáticas favoráveis, uma das variáveis mais importantes na produção de aflatoxinas, os países de baixo rendimento apresentam maior risco de contaminação dada a falta de condições para o armazenamento das culturas agrícolas (Benkerroum, 2020). Angola é um país em recuperação económica após o período de Guerra Civil (1975–2002), que resultou na destruição de infraestruturas rurais, serviços sociais e capacidade produtiva do país (Pacheco, Carvalho e Henriques, 2013). Consequentemente, assume-se que o clima predominante e o nível económico em Angola constituam fatores de risco para a contaminação de aflatoxinas. Porém, os dados relativos à ocorrência de aflatoxinas nos alimentos em Angola são escassos. No trabalho de dissertação de Panzo (2011), foram analisadas 60 amostras de milho obtidas em mercados locais em Luanda, tendo sido verificado que 81,7% das amostras encontravam-se contaminadas com aflatoxinas (0,4–425,9µg/kg). Quanto aos dados da UE no Portal do RASFF, em 2019 foi apenas registada uma notificação referente à deteção de amendoins contaminados com aflatoxinas provenientes de Angola (AFBI = 204µg/kg; aflatoxinas totais = 244µg/kg), níveis que excedem significativamente os teores máximos permitidos (2,0µg/kg e 4,0µg/kg, respetivamente) (European Commission, 2019). Apesar da falta de dados que permitam conhecer o panorama global da prevalência de aflatoxinas nos alimentos em Angola, considerando os resultados de estudos anteriores realizados em países da África Subsariana (Liverpool-Tasie *et al.*, 2019; Mahuku *et al.*, 2019), verifica-se que a esta contaminação é frequente e que, por vezes, ocorre em níveis elevados. Pelo que antecede, seria espectável que as amostras de leite materno analisadas no presente estudo estivessem contaminadas, contudo, tal não se verificou. Ressalva-se, no entanto, que,

não é assumido que em Angola não haja contaminação dos produtos alimentares com aflatoxinas, mas que as participantes não foram expostas a alimentos contaminados com AFBI. Assim, são propostas algumas interpretações para explicar os resultados obtidos que inclui, o nível económico da família, o local de residência e os hábitos alimentares da mãe.

O nível económico das populações pode ser um fator determinante no risco de exposição às aflatoxinas. Entre as 18 províncias de Angola, Cabinda é uma das mais urbanizadas, com menor vulnerabilidade à pobreza. Segundo o relatório do Banco Mundial, esta região apresenta uma baixa prevalência de desnutrição crónica em crianças menores de 24 meses, comparativamente às restantes províncias de Angola, assim como o melhor acesso à água, saneamento, higiene, alimentação e saúde. No que diz respeito à empregabilidade, os setores mais importantes são os do comércio, da hotelaria e dos serviços sociais (World Bank, 2020). Uma vez que os alimentos de elevada qualidade tendem a ser mais caros em relação aos de qualidade inferior, as famílias com rendimentos mais elevados têm menor risco de consumir alimentos contaminados com aflatoxinas (Karayağiz Muslu e Özdemir, 2020). Quanto às participantes deste estudo, a maioria tinha no mínimo a escolaridade obrigatória (9º ano), sendo que 44% concluiu pelo menos o ensino secundário. Pressupondo que o nível de escolaridade possa determinar as oportunidades de emprego com remuneração mais elevada (Karayağiz Muslu e Özdemir, 2020), sugere-se que estas participantes possam estar numa faixa socioeconómica que lhes permita o acesso a alimentos mais seguros.

Segundo alguns estudos, o local de residência também poderá influenciar a exposição das populações. Na Colômbia (Diaz e Sánchez, 2015) e no Irão (Jafari *et al.*, 2017) foi reportado uma maior ocorrência de AFMI no leite materno correspondente a mães residentes em áreas rurais, comparativamente às residentes em áreas urbanas. Geralmente, nas áreas rurais dos países em desenvolvimentos, as populações dependem de alimentos produzidos localmente, que poderão ser mais suscetíveis ao risco de contaminação por aflatoxinas, dada a falta de controlo da segurança e qualidade alimentar (Diaz e Sánchez, 2015). Considerando que a população de Cabinda reside sobretudo em zonas consideradas urbanas, este fator também poderá ter contribuído para a ausência de amostras positivas no presente estudo.

Sendo a ingestão de alimentos contaminados a principal via de exposição às aflatoxinas, a ocorrência do biomarcador AFMI no leite materno está diretamente relacionada com os hábitos alimentares das mães lactantes. Diferentes fatores podem influenciar as escolhas alimentares individuais como questões económicas, sociais e culturais. Pressupõe-se que uma dieta mais variada, contendo alimentos de diferentes grupos alimentares como carne, pescado, ovos, frutas e hortícolas, diminua a probabilidade de ocorrência de AFMI no leite materno, comparativamente às dietas mais restritas, essencialmente à base de cereais e seus produtos

derivados, alimentos mais suscetíveis à contaminação (Fakhri *et al.*, 2019). Uma vez que não foram detetados níveis de AFMI no leite materno, sugere-se que, os alimentos ingeridos pelas participantes nos dias anteriores à colheita não se encontravam contaminados com AFBI, ou que o nível de contaminação seria extremamente baixo, ou ainda que a sua alimentação não tenha incluído alimentos tendencialmente mais suscetíveis de contaminação.

No estudo de revisão de Fakhri e col. (2019) foi observada uma correlação negativa entre a concentração de AFMI no leite materno e o ano de realização do estudo. Apesar de não terem sido consideradas as razões que levaram à diminuição dos níveis de contaminação nos últimos anos, os autores sugerem que poderá estar relacionado com a melhoria das medidas de controlo e monitorização de aflatoxinas nos géneros alimentícios dos diferentes países, a implementação de regulamentação nos países de rendimento médio e baixo, ou ainda devido à alteração dos hábitos alimentares das mães lactantes (Fakhri *et al.*, 2019). Particularmente em Angola, têm vindo a ser dada importância a estratégias que visem o acesso da população a alimentos seguros e de qualidade. Exemplo disto, e na tentativa de progresso do país, o Plano de Desenvolvimento Nacional para o período de 2018–2022 visa o incremento de uma produção agrícola orientada para o mercado, reconhecendo a necessidade de melhoria da segurança alimentar no país, nomeadamente no que diz respeito às infraestruturas para o armazenamento de bens alimentares (Ministério da Economia e Planeamento, 2018). Assumindo que mais de 50% dos alimentos consumidos em Angola são importados (World Bank, 2020), outra medida que poderá ter impacto no nível de contaminação consiste na implementação do Regulamento sobre a Sujeição a Análises Laboratoriais dos Produtos Destinados ao Consumo Humano e Animal (Decreto Presidencial n.º 179/18). Este controlo visa aferir a qualidade e segurança dos géneros alimentícios, incluindo a monitorização dos limites máximos de micotoxinas, como as aflatoxinas. Embora ainda seja necessário o reforço da implementação das estratégias nacionais de segurança alimentar e nutricional, bem como um sistema de acompanhamento e monitorização das intervenções e políticas públicas, a adoção das diversas medidas pode contribuir para a redução da exposição às aflatoxinas.

Visto que não foram detetados níveis de AFMI no presente estudo ( $<5,0\text{ng/L}$ ), não foi determinada a EDI para averiguar a exposição dos lactentes. Ainda assim, considera-se que as preocupações relacionadas com o risco de exposição às aflatoxinas são fundadas, principalmente no que diz respeito às crianças. Uma vez que as aflatoxinas são substâncias comprovadamente genotóxicas e carcinogénicas, a JECFA não determina um valor de TDI, afirmando que mesmo níveis de exposição inferiores a  $1\text{ng/kg}$  peso corporal/dia, contribuem para o risco de cancro de fígado (JECFA, 2017). Consequentemente, tanto os resultados

obtidos no presente estudo, como os de outros autores que concluíram existir exposição dos lactentes às aflatoxinas, devem ser interpretados com precaução. Por um lado, dado o reduzido número de amostras e o facto de as participantes residirem todas na mesma região impede que estes dados sejam representativos da exposição dos lactentes em Angola. Como mencionado anteriormente, Cabinda é uma das regiões com menor taxa de pobreza do país, o que pode influenciar a qualidade dos alimentos disponíveis para a população. Por outro lado, a possível contaminação do leite materno não deve constituir um motivo para desaconselhar a prática do aleitamento materno, mas incentivar à implementação de medidas preventivas da contaminação dos alimentos por aflatoxinas.

Embora o leite materno possa ser uma via de exposição dos bebés às aflatoxinas, considera-se que os diversos benefícios da amamentação superem este potencial risco (Warth *et al.*, 2016). O leite materno possui uma adequada composição nutricional, promove o desenvolvimento cognitivo e reduz a incidência de infeções do trato gastrointestinal e respiratório. Existem ainda evidências que demonstram o seu efeito protetor contra algumas doenças a curto e longo prazo e reduz a taxa de mortalidade infantil (Ishikawa *et al.*, 2016; UNICEF, 2019). Para além das suas propriedades nutricionais e imunológicas, a prática do aleitamento materno apresenta ainda um efeito benéfico a nível social, económico, ambiental e psicológico (Bogalho *et al.*, 2018). Angola apresenta uma das maiores taxas de mortalidade de crianças até aos 5 anos, com 94 000 óbitos em 2018 (UNICEF, 2019). Num país com uma taxa de aleitamento materno em exclusivo durante os primeiros 6 meses de vida de apenas 37,4% (2015), o incentivo à amamentação poderá contribuir para a melhoria da saúde infantil (UNICEF, 2020). Adicionalmente, o nível de contaminação do leite materno poderá ser inferior comparativamente aos alimentos introduzidos após a interrupção da amamentação. Embora existam opções no mercado de fórmulas infantis nutricionalmente equilibradas e controladas no contexto da segurança alimentar, em algumas regiões do mundo, o seu acesso poderá ser limitado (Warth *et al.*, 2016; Watson *et al.*, 2016). Por exemplo, em vários países de África, o milho é tipicamente usado como primeiro alimento por constituir a base da alimentação familiar (Watson *et al.*, 2016). Na Guiné, foi constatado por Watson e col. (2016) que bebés parcialmente amamentados apresentavam concentrações significativamente menores de aflatoxinas no sangue ( $p < 0,001$ ), em comparação com bebés que já não eram amamentados. Segundo Iha e col. (2014), a amamentação pode resultar numa menor exposição às micotoxinas, em comparação com uma alimentação que inclua leite de vaca.

Apesar do nível atual de conhecimentos científicos e dos melhoramentos das técnicas de produção e de armazenamento, não é possível a total eliminação das aflatoxinas dos géneros alimentícios. Sendo assim, a prevenção do desenvolvimento dos fungos produtores é a forma

mais eficaz para reduzir o risco de exposição dos consumidores (Fakhri *et al.*, 2019; Pereira, Fernandes e Cunha, 2012). As estratégias de prevenção envolvem ações a aplicar tanto no campo como após a colheita. Estas incluem a implementação de boas práticas agrícolas, como a gestão sustentável dos solos, controlo químico e biológico de pragas e a manipulação genética para aumentar a resistência das culturas. Uma vez que a contaminação por aflatoxinas depende das condições de temperatura e humidade após a colheita, as estratégias devem também passar por um processo de secagem rápido e eficiente, assim como pelo controlo destes fatores ambientais durante o armazenamento (Agriopoulou, Stamatelopoulou e Varzakas, 2020; Neme e Mohammed, 2017). Para além da adoção de medidas preventivas adequadas, é importante a implementação de programas que envolvam uma monitorização e controlo oficial dos níveis de contaminação dos alimentos, para assegurar o cumprimento das normas, bem como a consciencialização da população perante os riscos das aflatoxinas (Fakhri *et al.*, 2019; Neme e Mohammed, 2017). Nos países da África Subariana, ainda se verifica a falta de conhecimento dos produtores e consumidores em relação às aflatoxinas e aos seus efeitos adversos na saúde, considerada um desafio no controlo desta contaminação (Benkerroum, 2019; Udomkun *et al.*, 2017). Neste sentido, organizações internacionais como a FAO e a OMS têm realçado a necessidade de uma comunicação do risco eficaz, envolvendo neste processo a indústria, organizações não governamentais, comunicação social, consumidores e o governo. Esta abordagem assume um papel preponderante no aumento do nível de conhecimento público face ao risco associado às aflatoxinas e as suas medidas de mitigação (Benkerroum, 2019).

## **7. Conclusões**

A exposição humana às aflatoxinas representa uma das principais preocupações em termos de saúde pública em todo o mundo. Este estudo pretendeu averiguar a ocorrência de AFMI no leite materno de Angola, e permitiu contribuir para a obtenção dos primeiros dados de exposição dos lactentes. Das 37 amostras de leite materno analisadas, não foram detetados níveis de AFMI acima do limite de deteção (5,0ng/L). Apesar do clima propício ao desenvolvimento de fungos aflatoxigénicos predominante nesta região, sugere-se que um nível socioeconómico mais elevado, a residência em áreas urbanas e os hábitos alimentares da mãe possam ter sido fatores determinantes para a baixa exposição das mães e, conseqüentemente, dos lactentes. É ainda sugerido que a implementação de medidas de controlo de aflatoxinas nos géneros alimentícios importados, possa ter contribuído para a diminuição dos níveis de contaminação. Embora o leite materno seja considerado uma possível via de exposição dos bebés às aflatoxinas, considera-se que, dado os inúmeros benefícios da prática do aleitamento materno, esta deve ser incentivada sempre que possível, principalmente nos países em desenvolvimento. Assim, uma vez que as aflatoxinas são substâncias cancerígenas, e não sendo possível a sua total eliminação dos alimentos, as estratégias para a diminuição do risco de exposição devem passar pela adoção de medidas preventivas da infeção por fungos produtores e pela implementação de programas que envolvam um controlo e monitorização dos níveis de contaminação dos alimentos. Futuramente, será importante a realização de novos estudos de biomonitorização, que visem a avaliação contínua da exposição dos lactentes, envolvendo outras regiões de Angola, que possam permitir uma comparação entre diferentes regiões, assim como a variação sazonal.

## 8. Referências Bibliográficas

- ABDEL-HADI, Ahmed *et al.* - A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. **Journal of the Royal Society Interface**. . ISSN 17425662. 9:69 (2012) 757–767. doi: 10.1098/rsif.2011.0482.
- AGRIOPOULOU, Sofia; STAMATELOPOULOU, Eygenia; VARZAKAS, Theodoros - Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. **Foods**. . ISSN 23048158. 9:2 (2020). doi: 10.3390/foods9020137.
- AL-JAAL, Belqes Ahmad *et al.* - Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: A systematic literature review, 2001–2018. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 129:January (2019) 211–228. doi: 10.1016/j.fct.2019.04.047.
- ALI, Nurshad *et al.* - Determination of aflatoxin M1 in urine samples indicates frequent dietary exposure to aflatoxin B1 in the Bangladeshi population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. . ISSN 1618131X. 220:2 (2017) 271–281. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.11.002.
- ALSHANNAQ, Ahmad; YU, Jae Hyuk - Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 14:6 (2017). doi: 10.3390/ijerph14060632.
- AZARIKIA, Manizheh; MAHDAVI, Reza; NIKNIAZ, Leila - Occurrence and dietary factors associated with the presence of aflatoxin B1 and M1 in breast milk of nursing mothers in Iran. **Food Control**. . ISSN 09567135. 86:2018) 207–213. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.009.
- AZZIZ-BAUMGARTNER, Eduardo *et al.* - Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. **Environmental Health Perspectives**. . ISSN 15529924. 113:12 (2005) 1779–1783. doi: 10.1289/ehp.8384.
- BATTACONE, G. *et al.* - Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. **Journal of Dairy Science**. . ISSN 00220302. 88:9 (2005) 3063–3069. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72987-8.
- BENKERROUM, Noredine - Retrospective and prospective look at aflatoxin research and development from a practical standpoint. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 16:19 (2019). doi: 10.3390/ijerph16193633.
- BENKERROUM, Noredine - Aflatoxins: Producing-molds, structure, health issues and incidence in southeast asian and sub-saharan african countries. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 17:4 (2020). doi: 10.3390/ijerph17041215.
- BENKERROUM, Noredine - Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 17:2 (2020) 1–28. doi: 10.3390/ijerph17020423.
- BERNÁLDEZ, Victoria *et al.* - The influence of ecophysiological factors on growth, aflR gene expression and aflatoxin B1 production by a type strain of *Aspergillus flavus*. **LWT - Food Science and Technology**. . ISSN 00236438. 83:2017) 283–291. doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.030.
- BOGALHO, Fernando *et al.* - Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. **Food Control**. . ISSN 09567135. 90:2018) 140–145. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.02.043.
- BRYDEN, Wayne L. - Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**. . ISSN 03778401. 173:1–2 (2012) 134–158. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014.
- BUMBANGI, N. F. *et al.* - Occurrence and factors associated with aflatoxin contamination of raw peanuts from Lusaka district's markets, Zambia. **Food Control**. . ISSN 09567135. 68:2016) 291–296. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.04.004.
- BUSZEWSKA-FORAJTA, Magdalena - Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on

animals. **Toxicol.** . ISSN 18793150. 182:May (2020) 34–53. doi: 10.1016/j.toxicol.2020.04.101.

CANTÚ-CORNELIO, F. *et al.* - Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxin M1 in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. **Food Control.** . ISSN 09567135. 62:2016) 16–22. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.004.

CASTELINO, Jovita M. *et al.* - Aflatoxin exposure is inversely associated with IGF1 and IGFBP3 levels in vitro and in Kenyan school children. **Mol Nutr Food Res.** 59:3 (2015) 574–581. doi: 10.1002/mnfr.201300619.

CHALA, Alemayehu *et al.* - Natural occurrence of aflatoxins in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) from eastern Ethiopia. **Food Control.** . ISSN 09567135. 30:2 (2013) 602–605. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.08.023.

CHEMSPIDER ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY - **ChemSpider Search and share chemistry** [Online], atual. 2020. [Consult. 8 jul. 2020]. Disponível em WWW:<URL:http://www.chemspider.com/>.

CHEN, Chen *et al.* - Exposure to aflatoxin and fumonisin in children at risk for growth impairment in rural Tanzania. **Environment International.** . ISSN 18736750. 115:March (2018) 29–37. doi: 10.1016/j.envint.2018.03.001.

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

CODEX ALIMENTARIUS - General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed. CXS 193-19:2019).

COSTANZO, Paola *et al.* - Toxicity of aflatoxin B1 towards the vitamin D receptor (VDR). **Food and Chemical Toxicology.** . ISSN 18736351. 76:2015) 77–79. doi: 10.1016/j.fct.2014.11.025.

COTTY, Peter J.; JAIME-GARCIA, Ramon - Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. **International Journal of Food Microbiology.** . ISSN 01681605. 119:1–2 (2007) 109–115. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060.

DARRA, Nada EL; GAMBACORTA, Lucia; SOLFRIZZO, Michele - Multimycotoxins occurrence in spices and herbs commercialized in Lebanon. **Food Control.** . ISSN 09567135. 95:July 2018 (2019) 63–70. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.07.033.

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

DENG, Jiang *et al.* - Aflatoxin B1 metabolism: Regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research.** . ISSN 13882139. 778:September (2018) 79–89. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.10.002.

DIAZ, Gonzalo J.; SÁNCHEZ, Marlib Paloma - Determination of aflatoxin M1 in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment.** . ISSN 19440057. 32:7 (2015) 1192–1198. doi: 10.1080/19440049.2015.1049563.

DOHNAL, Vlastimil; WU, Qinghua; KUČA, Kamil - Metabolism of aflatoxins: Key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. **Archives of Toxicology.** . ISSN 14320738. 88:9 (2014) 1635–1644. doi: 10.1007/s00204-014-1312-9.

DUARTE, S. C. *et al.* - Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. **Food Control.** . ISSN 09567135. 30:2 (2013) 411–417. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.08.002.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) - Risk assessment of aflatoxins in food. **EFSA Journal.** . ISSN 18314732. 18:3 (2020). doi: 10.2903/j.efsa.2020.6040.

EKEANYANWU, Chidinma Lynda; ALISI, Chinwe Sylvanus; EKEANYANWU, Raphael Chukwuma - Levels of Aflatoxin M1 and selected heavy metals (Pb, Cd, Cr, Cu, Zn, Fe, As, and Hg) in the breast milk of lactating mothers in South Eastern, Nigeria. **Food Control**. . ISSN 09567135. 112:November 2019 (2020) 107150. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107150.

EL-TRAS, Wael F.; EL-KADY, Nevein N.; TAYEL, Ahmed A. - Infants exposure to aflatoxin M I as a novel foodborne zoonosis. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 49:11 (2011) 2816–2819. doi: 10.1016/j.fct.2011.08.008.

ELARIDI, Jomana *et al.* - Analysis of aflatoxin M1 in breast milk and its association with nutritional and socioeconomic status of lactating mothers in Lebanon. **Journal of Food Protection**. . ISSN 19449097. 80:10 (2017) 1737–1741. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-083.

ESKOLA, Mari *et al.* - Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 15497852. 2019) 1–17. doi: 10.1080/10408398.2019.1658570.

EUROPEAN COMMISSION - **RASFF Portal** [Online], atual. 2019. [Consult. 10 out. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>.

EZEKIEL, Chibundu N. *et al.* - Urinary aflatoxin exposure monitoring in rural and semi-urban populations in Ogun state, Nigeria. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440057. 35:8 (2018) 1565–1572. doi: 10.1080/19440049.2018.1475752.

FAKHRI, Yadolah *et al.* - Aflatoxin M1 in human breast milk: A global systematic review, meta-analysis, and risk assessment study (Monte Carlo simulation). **Trends in Food Science and Technology**. . ISSN 09242244. 88:February (2019) 333–342. doi: 10.1016/j.tifs.2019.03.013.

FDA (U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION) - **Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed** [Online], atual. 2018. [Consult. 25 ago. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed#afla>.

FINK-GREMMELS, Johanna - Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440057. 25:2 (2008) 172–180. doi: 10.1080/02652030701823142.

FRAZZOLI, Chiara *et al.* - The hotspot for (global) one health in primary food production: Aflatoxin M1 in dairy products. **Frontiers in Public Health**. . ISSN 22962565. 4:FEB (2017) 1–11. doi: 10.3389/fpubh.2016.00294.

GALLO, Antonia *et al.* - Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. **International Journal of Food Microbiology**. . ISSN 18793460. 217:2016) 162–169. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026.

GHIASAIN, S. A.; MAGHSOOD, A. H. - Infants' exposure to aflatoxin M1 from Mother's breast milk in Iran. **Iranian Journal of Public Health**. . ISSN 22516093. 41:3 (2012) 119–126.

GIOVATI, Laura *et al.* - AFM1 in milk: Physical, biological, and prophylactic methods to mitigate contamination. **Toxins**. . ISSN 20726651. 7:10 (2015) 4330–4349. doi: 10.3390/toxins7104330.

GONG, Yunyun *et al.* - Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: A longitudinal study in Benin, West Africa. **Environmental Health Perspectives**. . ISSN 00916765. 112:13 (2004) 1334–1338. doi: 10.1289/ehp.6954.

GRANADOS-CHINCHILLA, Fabio *et al.* - Aflatoxins occurrence through the food chain in Costa Rica: Applying the One Health approach to mycotoxin surveillance. **Food Control**. . ISSN 09567135. 82:2017) 217–226. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.06.023.

GRUBER-DORNINGER, Christiane; JENKINS, Timothy; SCHATZMAYR, Gerd - Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. **Toxins**. . ISSN 20726651. 11:7 (2019). doi: 10.3390/toxins11070375.

HAVELAAR, Arie H. *et al.* - World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **PLoS Medicine**. . ISSN 15491676. 12:12 (2015) 1–23. doi: 10.1371/journal.pmed.1001923.

HEYNDRICKX, Ellen *et al.* - Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. **Environment International**. . ISSN 18736750. 84:2015) 82–89. doi: 10.1016/j.envint.2015.06.011.

HUNTLEY, Brian J. *et al.* - Angola, um perfil: fisiografia, clima e padrões de biodiversidade. Em **Biodiversidade de Angola, Ciência e Conservação: uma síntese moderna**. 1ª ed. Porto : Arte e Ciência, 2019. ISBN 978-989-54126-2-4. p. 39–73.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) - **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volumes 1-125** [Online], atual. 2012. [Consult. 1 mai. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) - **Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens**. Lyon, France : [s.n.]

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) - **Global Cancer Observatory** [Online], atual. 2020. [Consult. 2 ago. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://gco.iarc.fr/>.

IHA, Maria Helena *et al.* - Aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Control**. . ISSN 09567135. 40:1 (2014) 310–313. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.12.014.

INGENBLEEK, Luc *et al.* - Regional sub-saharan Africa total diet study in benin, cameroon, mali and nigeria reveals the presence of 164 mycotoxins and other secondary metabolites in foods. **Toxins**. . ISSN 20726651. 11:1 (2019) 1–23. doi: 10.3390/toxins11010054.

IQBAL, Shahzad Zafar *et al.* - The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; And evaluation of dietary intake. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 210:2016) 135–140. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.104.

ISHIKAWA, Angélica T. *et al.* - Exposure assessment of infants to aflatoxin M1 through consumption of breast milk and infant powdered milk in Brazil. **Toxins**. . ISSN 20726651. 8:9 (2016) 1–11. doi: 10.3390/toxins8090246.

ISMAIL, Amir *et al.* - Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. **Critical Reviews in Microbiology**. . ISSN 15497828. 42:3 (2016) 418–427. doi: 10.3109/1040841X.2014.958051.

ISMAIL, Amir *et al.* - Prevalence and Exposure Assessment of Aflatoxins Through Black Tea Consumption in the Multan City of Pakistan and the Impact of Tea Making Process on Aflatoxins. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664302X. 11:March 2020 (2020) 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2020.00446.

JAFARI, Tina *et al.* - Aflatoxin M1 in human breast milk in Shahrekord, Iran and association with dietary factors. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**. . ISSN 19393229. 10:2 (2017) 128–136. doi: 10.1080/19393210.2017.1282545.

JANIĆ HAJNAL, Elizabet *et al.* - Aflatoxins contamination of maize in Serbia: the impact of weather conditions in 2015. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440057. 34:11 (2017) 1999–2010. doi: 10.1080/19440049.2017.1331047.

JUBERT, Carole *et al.* - Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B1 pharmacokinetics in human volunteers. **Cancer Prevention Research**. . ISSN 19406207. 2:12 (2009)

1015–1022. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0099.

KABAK, Bulent - Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: Occurrence and exposure assessment. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 211:2016) 8–16. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.141.

KACHAPULULA, P. W. *et al.* - Aflatoxin contamination of groundnut and maize in Zambia: observed and potential concentrations. **Journal of Applied Microbiology**. . ISSN 13652672. 122:6 (2017) 1471–1482. doi: 10.1111/jam.13448.

KARAYAĞIZ MUSLU, Gonca; ÖZDEMİR, Mehmet - Occurrence of and Factors Associated With the Presence of Aflatoxin M1 in Breast Milk of Mothers in Fethiye, Turkey. **Biological Research for Nursing**. . ISSN 15524175. 22:3 (2020) 362–368. doi: 10.1177/1099800420919900.

KOTTEK, Markus *et al.* - World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**. . ISSN 09412948. 15:3 (2006) 259–263. doi: 10.1127/0941-2948/2006/0130.

KUIPER-GOODMAN, T. - Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: Aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. . ISSN 00084212. 68:7 (1990) 1017–1024. doi: 10.1139/y90-155.

KUNTER, Imge *et al.* - Assessment of Aflatoxin M1 and Heavy Metal Levels in Mothers Breast Milk in Famagusta, Cyprus. **Biological Trace Element Research**. . ISSN 15590720. 175:1 (2017) 42–49. doi: 10.1007/s12011-016-0750-z.

LAHOUAR, Amani *et al.* - Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. **Revista Argentina de Microbiología**. . ISSN 03257541. 48:1 (2016) 78–85. doi: 10.1016/j.ram.2015.10.001.

LAI, Xianwen *et al.* - Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. **Food Control**. . ISSN 09567135. 50:1881 (2015) 401–404. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.029.

LAUER, Jacqueline M. *et al.* - Maternal aflatoxin exposure during pregnancy and adverse birth outcomes in Uganda. **Maternal and Child Nutrition**. . ISSN 17408709. 15:2 (2019) 1–7. doi: 10.1111/mcn.12701.

LEE, Hyun Jung; RYU, Dojin - Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 15205118. 65:33 (2017) 7034–7051. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04847.

LIU, Xiao *et al.* - Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. **Food Control**. . ISSN 09567135. 82:2017) 325–332. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.07.012.

LIU, Yan; WU, Felicia - Global burden of Aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. **Environmental Health Perspectives**. . ISSN 00916765. 118:6 (2010) 818–824. doi: 10.1289/ehp.0901388.

LIVERPOOL-TASIE, Lenis Saweda O. *et al.* - The occurrence and co-occurrence of aflatoxin and fumonisin along the maize value chain in southwest Nigeria. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 129:January (2019) 458–465. doi: 10.1016/j.fct.2019.05.008.

LU, Pei-Xin *et al.* - Longitudinal study of aflatoxin exposure in the development of primary liver cancer in patients with chronic hepatitis. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. 90:24 (2010) 1665–1669.

LV, Cong *et al.* - Interaction of water activity and temperature on the growth, gene expression and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy and polished rice. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 293:April (2019) 472–478. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.009.

MAGOHA, H. *et al.* - Association between aflatoxin M exposure through breast milk and growth impairment in infants from northern Tanzania. **World Mycotoxin Journal**. . ISSN 18750796. 7:3

(2014) 277–284. doi: 10.3920/WMJ2014.1705.

MAHFUZ, Mustafa *et al.* - General and advanced methods for the detection and measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites: a review. **Toxin Reviews**. . ISSN 15569551. 39:2 (2018) 123–137. doi: 10.1080/15569543.2018.1514638.

MAHMOUDI, Razzagh *et al.* - Occurrence of aflatoxin B1 in pistachio nuts during various preparing processes: tracing from Iran. **Journal of Mycology Research**. 1:11 (2014) 1–5.

MAHUKU, George *et al.* - Pre-harvest management is a critical practice for minimizing aflatoxin contamination of maize. **Food Control**. . ISSN 09567135. 96:June 2018 (2019) 219–226. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.08.032.

MARCHESE, Silvia *et al.* - Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. **Toxins**. . ISSN 20726651. 10:6 (2018) 1–19. doi: 10.3390/toxins10060214.

MASOERO, F. *et al.* - Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. **Animal**. . ISSN 17517311. 1:9 (2007) 1344–1350. doi: 10.1017/S1751731107000663.

MCMILLAN, Amy *et al.* - Aflatoxin exposure in Nigerian children with severe acute malnutrition. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 111:November 2017 (2018) 356–362. doi: 10.1016/j.fct.2017.11.030.

MILHOME, M. A. L. *et al.* - Occurrence of aflatoxins in cashew nuts produced in northeastern Brazil. **Food Control**. . ISSN 09567135. 42:2014) 34–37. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.01.033.

MINISTÉRIO DA ECONOMIA E PLANEAMENTO - **Plano de Desenvolvimento Nacional 2018-2022**. Luanda : [s.n.]

MONYO, E. S. *et al.* - Occurrence and distribution of aflatoxin contamination in groundnuts (*Arachis hypogaea* L) and population density of Aflatoxigenic *Aspergilli* in Malawi. **Crop Protection**. . ISSN 02612194. 42:2012) 149–155. doi: 10.1016/j.cropro.2012.07.004.

MOSCHINI, Maurizio *et al.* - Mucosal absorption of aflatoxin B1 in lactating dairy cows. **Italian Journal of Animal Science**. . ISSN 15944077. 6:SUPPL. 1 (2007) 324–326. doi: 10.4081/ijas.2007.1s.324.

MUPUNGA, Innocent; MNGQAWA, Pamela; KATERERE, David R. - Peanuts, aflatoxins and undernutrition in children in Sub-Saharan Africa. **Nutrients**. . ISSN 20726643. 9:12 (2017) 1–12. doi: 10.3390/nu9121287.

NEME, Kumera; MOHAMMED, Ali - Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**. . ISSN 09567135. 78:2017) 412–425. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.012.

NGUYEN, Xuan Thi Thanh *et al.* - Assessment of aflatoxin B1 in maize and awareness of aflatoxins in Son La, Vietnam. **Infection Ecology and Epidemiology**. . ISSN 20008686. 8:1 (2018). doi: 10.1080/20008686.2018.1553464.

OMAR, Sharaf S. - Incidence of aflatoxin M1 in human and animal milk in Jordan. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**. . ISSN 15287394. 75:22–23 (2012) 1404–1409. doi: 10.1080/15287394.2012.721174.

PACHECO, Fernando; CARVALHO, M<sup>a</sup> Leonor Da Silva; HENRIQUES, Pedro Damião - Contribuição para o debate sobre a sustentabilidade da agricultura angolana. **Economia, Sociologia, Ambiente e Desenvolvimento Rural - Actas do 2.º Encontro Luso-Angolano na Universidade Metodista de Angola**. 2013) 311–343.

PANZO, Josué Domingos - **The incidence of fungi and their mycotoxins in angolan food and crops with particular reference to maize**. [S.l.] : University of Johannesburg, 2011

PARTANEN, Heidi A. *et al.* - Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. **Toxicological Sciences**. . ISSN 10966080. 113:1 (2009) 216–225. doi: 10.1093/toxsci/kfp257.

- PATERSON, Robert Russell M.; LIMA, Nelson - Thermophilic fungi to dominate aflatoxigenic/mycotoxigenic fungi on food under global warming. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 14:2 (2017) 1–11. doi: 10.3390/ijerph14020199.
- PATRIARCA, Andrea; FERNÁNDEZ PINTO, Virginia - Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Current Opinion in Food Science**. . ISSN 22147993. 14:2017) 50–60. doi: 10.1016/j.cofs.2017.01.011.
- PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. - Micotoxinas em Portugal: Ocorrência e Toxicidade. **Acta Farmacêutica Portuguesa**. 2:1 (2012) 61–73.
- PINOTTI, Luciano *et al.* - Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on Cereal Byproducts. **Toxins**. . ISSN 20726651. 8:2 (2016). doi: 10.3390/TOXINS8020045.
- PIRES, Polyane Novais *et al.* - Aflatoxins and ochratoxin A: occurrence and contamination levels in cocoa beans from Brazil. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440057. 36:5 (2019) 815–824. doi: 10.1080/19440049.2019.1600749.
- PITT, John I.; HOCKING, Ailsa - **Fungi and Food Spoilage**. 3ª Edição ed. New York : Springer US, 2009. ISBN 9780387922065.
- PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (PNUD) - **Relatório do Desenvolvimento Humano 2019** [Online]. New York : [s.n.] Disponível em WWW:<URL:http://hdr.undp.org/en/2019-report>.
- PUBCHEM NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - **Explore Chemistry** [Online], atual. 2020. [Consult. 8 jul. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- QI, Lu Nan *et al.* - The p53 mutation spectrum in hepatocellular carcinoma from Guangxi, China : Role of chronic hepatitis B virus infection and aflatoxin B1 exposure. **Liver International**. . ISSN 14783231. 35:3 (2015) 999–1009. doi: 10.1111/liv.12460.
- RAMALHO, Leandra N. Z. *et al.* - Aflatoxin B1 residues in human livers and their relationship with markers of hepatic carcinogenesis in São Paulo, Brazil. **Toxicology Reports**. . ISSN 22147500. 5:May (2018) 777–784. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.07.005.
- RATNAVATHI, Chamarthi Venkata *et al.* - Natural occurrence of aflatoxin B1 in sorghum grown in different geographical regions of India. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. . ISSN 00225142. 92:12 (2012) 2416–2420. doi: 10.1002/jsfa.5646.
- RODRIGUES, Paula; VENÂNCIO, Armando; LIMA, Nelson - Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 48:1 (2012) 76–90. doi: 10.1016/j.foodres.2012.02.007.
- ROMA, Antonella DE *et al.* - A survey on the Aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. **Food Control**. . ISSN 09567135. 81:2017) 30–33. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.05.034.
- RUSHING, Blake R.; SELIM, Mustafa I. - Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 124:May 2018 (2019) 81–100. doi: 10.1016/j.fct.2018.11.047.
- STERN, Mariana C. *et al.* - Hepatitis B, aflatoxin B1, and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. . ISSN 10559965. 10:6 (2001) 617–625.
- TAI, Bowen *et al.* - Recent progress of the effect of environmental factors on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production on foods. **Food Quality and Safety**. . ISSN 2399-1399. 4:1 (2020) 21–28. doi: 10.1093/fqsafe/fyz040.

TANG, L. *et al.* - Aflatoxin–albumin adducts and correlation with decreased serum levels of vitamins A and E in an adult ghanaiian population. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440057. 26:1 (2009) 108–118. doi: 10.1080/02652030802308472.

TANIWAKI, Marta Hiromi; PITT, John I.; MAGAN, Naresh - Aspergillus species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Current Opinion in Food Science**. . ISSN 22147993. 23:2018) 38–43. doi: 10.1016/j.cofs.2018.05.008.

TCHANA, Angele N.; MOUNDIPA, Paul F.; TCHOUANGUEP, Félicité M. - Aflatoxin contamination in food and body fluids in relation to malnutrition and cancer status in Cameroon. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 7:1 (2010) 178–188. doi: 10.3390/ijerph7010178.

TURNER, Paul C. *et al.* - Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. **International Journal of Epidemiology**. . ISSN 03005771. 36:5 (2007) 1119–1125. doi: 10.1093/ije/dym122.

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

UNICEF - **The State of the World's Children 2019. Children, food and nutrition: growing well in a changing world**. New York : [s.n.]. ISBN 9789280650037.

UNICEF - DIVISION OF DATA, ANALYSIS, PLANNING AND MONITORING - **Global UNICEF Global Databases: Infant and Young Child Feeding: Exclusive breastfeeding, Predominant breastfeeding**. New York : [s.n.]

VAZ, Andreia *et al.* - Detection methods for aflatoxin m1 in dairy products. **Microorganisms**. . ISSN 20762607. 8:2 (2020) 1–16. doi: 10.3390/microorganisms8020246.

VIDAL, Arnau *et al.* - Mycotoxin Biomarkers of Exposure: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. . ISSN 15414337. 17:5 (2018) 1127–1155. doi: 10.1111/1541-4337.12367.

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

WATSON, Sinead *et al.* - Dietary exposure to aflatoxin and micronutrient status among young children from Guinea. **Mol Nutr Food Res**. 60:3 (2016) 511–518. doi: 10.1002/mnfr.201500382.

WILLIAMS, Jonathan H. *et al.* - Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**. . ISSN 00029165. 80:5 (2004) 1106–1122. doi: 10.1093/ajcn/80.5.1106.

WORLD BANK - **Angola Poverty Assessment [Online]**. Washington, DC : [s.n.] Disponível em WWW:<URL:https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/34057>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION & JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA) - **Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva : [s.n.] (2017).

WORLD MEDICAL ASSOCIATION - **Declaration of Helsinki [Online]**, atual. 2013. [Consult. 25 set. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/>.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION - **Declaration of Taipei [Online]**, atual. 2016. [Consult. 25 set. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-taipei-on-ethical-considerations-regarding-health-databases-and-biobanks/>.

WU, Hui-Chen *et al.* - Aflatoxin B1 Exposure, Hepatitis B Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma

in Taiwan. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 18:3 (2009) 846–853. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0697.

XIONG, Jianglin *et al.* - Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow feedstuff and aflatoxin M1 in UHT and pasteurized milk in central China. **Food Control.** . ISSN 09567135. 92:May (2018) 386–390. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.05.022.

XIONG, Jianglin *et al.* - Prevalence of aflatoxin M1 in raw milk and three types of liquid milk products in central-south China. **Food Control.** . ISSN 09567135. 108:June 2019 (2020) 106840. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106840.

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

ZHANG, Daohong *et al.* - Development of a detector-free semiquantitative immunochromatographic assay with major aflatoxins as target analytes. **Sensors and Actuators, B: Chemical.** . ISSN 09254005. 185:2013) 432–437. doi: 10.1016/j.snb.2013.05.034.

ZHANG, J. *et al.* - Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. **Food and Chemical Toxicology.** . ISSN 18736351. 83:2015) 54–60. doi: 10.1016/j.fct.2015.05.020.

ZHAO, Yarong *et al.* - Aflatoxin B1 and sterigmatocystin in wheat and wheat products from supermarkets in China. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance.** . ISSN 19393229. 11:1 (2018) 9–14. doi: 10.1080/19393210.2017.1388295.

### **Legislação consultada**

Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.

Regulamento (UE) N.º 165/2010 da Comissão de 26 de fevereiro de 2010 que altera o Regulamento (CE) N.º 1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que diz respeito às aflatoxinas.

Regulamento (UE) N.º 1058/2012 da Comissão de 12 de novembro de 2012 que altera o Regulamento (CE) N.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de aflatoxinas nos figos secos.

Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.

Diretiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 7 de maio de 2002 relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais.

Regulamento (CE) N.º 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios.

Decreto Presidencial n.º 179/18 de 2 de agosto de 2018 que aprova o Regulamento sobre a Sujeição a Análises Laboratoriais dos Produtos Destinados ao Consumo Humano e Animal.

**Anexos**

ANEXO I – Termo de consentimento informado (2018)

Questionário Alimentar

---

---

AFM1 - \_\_\_\_\_

DECLARAÇÃO

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

Coimbra, ..... de ..... de 2016

Assinatura: .....

## ANEXO II – Termo de consentimento informado (2019)

### PARTE II: TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que:

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

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

*Tive a oportunidade de colocar questões e, se eventualmente coloquei questões, foram respondidas satisfatoriamente. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências.*

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

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

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

**Nome (legível) da participante:** \_\_\_\_\_

**Assinatura da participante:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_

**Se participante legal iletrada:**

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

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

**Nome (legível) da testemunha:** \_\_\_\_\_

**Assinatura da testemunha:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_

**Declaração do investigador/ colaborador da investigação que obteve consentimento**

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

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

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

\_\_\_\_\_

**Assinatura do investigador/ colaborador da investigação:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_

A preencher conforme questionário correspondente:

Nome (próprio) da participante: \_\_\_\_\_

Código interno: \_\_\_\_\_

## ANEXO III – Questionário sociodemográfico (2018)

## Questionário Alimentar

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

Características Individuais
Data:
Nome:
Idade:
Nº filhos:
Formação escolar:
Profissão:
Data parto:
Peso do bebé à nascença:

Características da Amamentação
<b>Mista (Peito/outro)</b>
<b>Só Peito</b>
<b>Tempo de amamentação (m)</b>
<b>Idade do bebé (m)</b>
<b>Peso da criança (kg)</b>

ANEXO IV – Questionário de frequência alimentar (2018)

Questionário Alimentar

**NOTAS PRÉVIAS**

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

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

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

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

## ANEXO V – Questionário sociodemográfico (2019)



Questionário para participantes no estudo intitulado

**“BIOMONITORIZAÇÃO DE MICOTOXINAS E OUTROS CONTAMINANTES EM LEITE MATERNO”**

Nome (próprio) da participante: _____	Recolha de leite materno: _____
Código interno: _____	Data: ____/____/20__
	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**

Idade: \_\_\_\_\_ anos  
 Número de filhos: \_\_\_\_\_  
 Data do (último) parto: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Peso do bebé (aquando da recolha de leite): \_\_\_\_\_ kg  
 Medicação na última semana:  Não  Sim: qual: \_\_\_\_\_  
 Fumadora activa/passiva:  Não  Sim

**II. DADOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS DA MÃE**

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

- Ensino Primário/Básico  Ensino Secundário (≤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



## ANEXO VI – Questionário de frequência alimentar (2019)

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 rodelas)								
	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)								

## ANEXO VII: Resultados obtidos com o método ELISA

Ser. No.	Concentration ng/L / ng/kg	Absorbance		Standards		
		(Mean)	(CV)	B/B0 (%)	calculated ng/L / ng/kg	Deviation (%)
1	0.00	2.792E	5.6	100.0		
2	5.00	2.457E	2.8	88.0	5.01	0.2
3	10.00	2.119E	0.0	75.9	9.99	0.1
4	20.00	1.577E	0.0	56.5	19.95	0.3
5	40.00	0.927E	0.0	33.2	40.23	0.6
6	80.00	0.575E	0.0	20.6	79.65	0.4

Ser. No.	ID	Absorbance			Samples			
		(Mean)	(CV)	(%)	calculated ng/L / ng/kg	*	=	ng/L / ng/kg
1	1	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
2	2	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
3	3	2.951E	16.5	105.7	< 5.00	1.00		< 5.00
4	5	3.335E	6.5	119.4	< 5.00	1.00		< 5.00
5	6	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
6	7	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
7	8	3.204E	13.1	114.8	< 5.00	1.00		< 5.00
8	9	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
9	10	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
10	11	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
11	12	3.101E	8.8	111.1	< 5.00	1.00		< 5.00
12	14	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
13	15	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
14	16	2.942E	12.6	105.4	< 5.00	1.00		< 5.00
15	17	3.228E	1.8	115.6	< 5.00	1.00		< 5.00
16	18	3.483E	0.7	124.7	< 5.00	1.00		< 5.00
17	19	3.500E	0.0	125.4	< 5.00	1.00		< 5.00
18	20	2.882E	11.1	103.2	< 5.00	1.00		< 5.00

C:\Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins\R1121 Aflatoxin M1.met

Ser. No.	ID	Absorbance			Samples		ng/L / ng/kg
		(Mean)	(CV)	(%)	calculated ng/L / ng/kg	* =	
19	A	3.129E	2.6	112.1	< 5.00	1.00	< 5.00
20	B	3.378E	5.1	121.0	< 5.00	1.00	< 5.00
21	C	3.490E	0.4	125.0	< 5.00	1.00	< 5.00
22	D	3.024E	6.1	108.3	< 5.00	1.00	< 5.00
23	E	3.242E	6.5	116.1	< 5.00	1.00	< 5.00
24	F	3.378E	5.1	121.0	< 5.00	1.00	< 5.00
25	G	3.340E	6.8	119.6	< 5.00	1.00	< 5.00
26	H	3.021E	4.0	108.2	< 5.00	1.00	< 5.00
27	I	3.185E	4.1	114.1	< 5.00	1.00	< 5.00
28	J	3.247E	9.6	116.3	< 5.00	1.00	< 5.00
29	L	3.243E	3.9	116.2	< 5.00	1.00	< 5.00
30	M	2.843E	0.5	101.8	< 5.00	1.00	< 5.00
31	N	2.911E	3.2	104.3	< 5.00	1.00	< 5.00
32	O	2.890E	4.9	103.5	< 5.00	1.00	< 5.00
33	P	2.833E	0.9	101.5	< 5.00	1.00	< 5.00
34	Q	2.820E	0.7	101.0	< 5.00	1.00	< 5.00
35	R	2.798E	6.6	100.2	< 5.00	1.00	< 5.00
36	S	2.641E	6.2	94.6	< 5.00	1.00	< 5.00
37	T	2.608E	0.5	93.4	< 5.00	1.00	< 5.00
38	.....	0.000	0.0	0.0	> 80.00	1.00	> 80.00
39	.....	0.000	0.0	0.0	> 80.00	1.00	> 80.00
40	.....	0.000	0.0	0.0	> 80.00	1.00	> 80.00
41	.....	0.000	0.0	0.0	> 80.00	1.00	> 80.00
42	.....	0.000	0.0	0.0	> 80.00	1.00	> 80.00

C:\Ridawin.NET\FOOD\Mycotoxins\R1121 Aflatoxin M1.met