

Karina Merini Tonon

**AVALIAÇÃO DA MICROFLORA CONTAMINANTE E
MICOTOXINAS EM LEITE HUMANO E ALIMENTOS
INFANTIS PARA LACTENTES E CRIANÇAS DE PRIMEIRA
INFÂNCIA POR LC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Vildes Maria Scussel, PhD

Co-orientadora: Prof.^a Mercedes G. R. Reiter, PhD.

FLORIANÓPOLIS
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tonon, Karina Merini

Avaliação da micoflora contaminante e micotoxinas em leite humano e alimentos infantis para lactentes e crianças de primeira infância por LC-MS/MS / Karina Merini Tonon ; orientador, Vildes Maria Scussel ; co-orientador, Mercedes Gabriela Ratto Reiter. - Florianópolis, SC, 2013.
129 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Micotoxinas. 3. Leite humano. 4. Alimentos infantis. 5. LC-MS/MS. I. Scussel, Vildes Maria. II. Ratto Reiter, Mercedes Gabriela. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Favor inserir a página com assinaturas

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Nilo Tonon e Conceição Zita Merini
Tonon, pelo seu exemplo de força e
resiliência.*

AGRADECIMENTOS

Aos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu sincero reconhecimento e agradecimento.

À Professora Vildes Maria Scussel, pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos como sua aluna e pela confiança em meu trabalho.

À Professora Mercedes Gabriela Ratto Reiter por todos os anos de orientação e trabalhos conjuntos.

Ao Sérgio de Souza, Secretário da Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela assistência aos alunos do programa.

Aos colegas do Laboratório de Micotoxinas e Contaminantes Alimentares: Karina Koerich de Souza, Geovana Dagostim Savi, Janaína Nones, Laura Garcia, Maristela Martins, Menithen Beber Rodrigues e Daniel Manfio pela amizade conquistada durante esses dois anos, pelos momentos de desabafo conjunto e de também de descontração. Meus agradecimentos especiais à xará Karina Koerich de Souza e à Geovana Dagostim Savi, por toda a sua ajuda, especialmente durante o período em que fiquei ausente do laboratório.

Aos profissionais do Banco de Leite Humano de Blumenau (BLH), especialmente à Elisabeth Kuehn de Souza e Maria Goreti Dassoler, por disponibilizarem as amostras de leite humano, o mais precioso dos alimentos, e o acesso às doadoras do BLH.

Às bolsistas de Iniciação Científica da Universidade Regional de Blumenau, Fernanda Piazero e Jesley Lechinowski, por seu trabalho durante a coleta de dados e amostras de leite humano.

Ao gerente da Garantia da Qualidade da Nestlé Brasil, Sr. Donizeti Cezari, pelo interesse neste trabalho, pela disponibilização das amostras de fórmulas e leites infantis e principalmente pela oportunidade de realizar as análises de micotoxinas em parceria com a Nestlé Brasil.

Aos profissionais do Nestlé Quality Assurance Center – NQAC/ São Paulo, em especial à equipe do Laboratório de Físico-Química, liderada

por Fernando Vitorino da Silva, pela assistência e carinho com o qual me receberam. Agradeço de forma especial à Lincoln Kurihara, por sua paciência e dedicação para me orientar nas análises de micotoxinas por LC-MS/MS.

Às pessoas maravilhosas que conheci em São Paulo: Roberta de Souza, Gabriela Avelino e Sarah Santos Gonçalves, que me abrigaram em suas casas durante a minha estadia na cidade, mesmo sem me conhecer. À Denise Cobaiashi e Pedro Angelini, pelas inestimáveis caronas de ida e volta ao NQAC, mas principalmente, pelos bate-papos e amizade.

Ao meu querido Hemílio Xafranski, namorado, amigo e conselheiro, por todo o seu carinho e apoio, principalmente durante momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos meus pais, Nilo Tonon e Conceição Zita Merini Tonon, minha referência e porto seguro, obrigada por suas orações e por sempre poder contar com vocês.

Por fim, mas acima de tudo, agradeço a Deus por sua companhia, por me dar saúde e a força necessária para superar as dificuldades, por colocar pessoas especiais em meu caminho e encher a minha vida com experiências maravilhosas.

Resumo

Alguns fungos que contaminam alimentos possuem a capacidade de produzir substâncias tóxicas, conhecidas como micotoxinas. Determinados fungos, como os do gênero *Fusarium*, infectam alimentos durante o seu cultivo e outros são capazes de se desenvolver durante o seu armazenamento, como os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Algumas micotoxinas são conhecidas por apresentarem propriedades carcinogênicas para humanos e animais, como as aflatoxinas e a ocratoxina A. Outras micotoxinas possuem propriedades teratogênicas, estrogênicas e imunossupressivas, como as fumonisinas, zearalenona e tricotecenos, respectivamente. Os seres humanos são expostos às micotoxinas principalmente através da ingestão de alimentos contaminados. Alguns dos alimentos mais propensos à contaminação por micotoxinas são cereais, oleaginosas, leite e seus derivados. Nas mulheres em fase de lactação, as micotoxinas presentes na sua dieta podem ser absorvidas e transferidas para o leite humano e em seguida ingeridas pelo bebê. O mesmo processo ocorre no gado leiteiro. Micotoxinas presentes na alimentação do gado podem ser transferidas para o leite bovino e, em seguida, aos seus produtos, como queijos e manteiga. Como a maioria das fórmulas infantis são produtos à base de leite de bovino, com exceção das fórmulas à base de proteína de soja, elas também podem conter micotoxinas. Bebês e crianças são considerados mais suscetíveis aos efeitos tóxicos das micotoxinas do que os adultos, devido ao seu menor peso corporal, maior taxa metabólica, baixa capacidade de desintoxicação e ao desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos, tais como o sistema nervoso central. A presença universal de micotoxinas em alimentos e a elevada suscetibilidade infantil aos seus efeitos tóxicos gera uma grande preocupação sobre a exposição infantil às micotoxinas, e tem motivado a adoção de regulamentos restritivos sobre os limites tolerados destes compostos nos alimentos. O objetivo do trabalho foi investigar a ocorrência de fungos filamentosos e de aflatoxina M₁ (AFM₁), ocratoxina A (OTA) e deoxivalenol (DON) em leite humano, fórmulas infantis e produtos à base de leite para a alimentação infantil. Para a análise de micotoxinas, um método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) foi validado para leite e fórmula infantil. Os resultados deste estudo indicam adequadas condições higiênico-sanitárias dos alimentos avaliados e que os lactentes da região estudada não estão expostos às micotoxinas através do aleitamento materno. A ausência de AFM₁, OTA e DON no leite

humano como bioindicadores da exposição materna às micotoxinas através da dieta, sugere o consumo de alimentos de elevada qualidade, ausentes de contaminação por micotoxinas pelas lactantes participantes. Os baixos níveis de AFM₁ nas fórmulas infantis e nos produtos à base de leite para a alimentação infantil avaliados indicam a excelente qualidade dos produtos fabricados no Brasil, embora em poucos casos, os níveis encontrados ultrapassem os limites estabelecidos pela legislação europeia. Para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, a prevenção da contaminação de alimentos por fungos toxigênicos e a seleção de matéria-prima de qualidade são cruciais para a produção de alimentos seguros e para a redução da exposição humana às micotoxinas.

Palavras-chave: micotoxinas, fungos, leite humano, fórmulas infantis, leites infantis, segurança dos alimentos.

Abstract

Some food spoilage fungi produce toxic substances known as mycotoxins. Certain fungi, such as the *Fusarium* genera, infect food during their growing and others are able to develop during storage, such as *Aspergillus* and *Penicillium* fungi. Some mycotoxins are known to have carcinogenic properties in animals, such as ochratoxin A and in humans, like aflatoxins. Other mycotoxins have teratogenic, immunosuppressive and estrogenic properties, as fumonisins, trichothecenes and zearalenone, respectively. Humans are exposed to mycotoxins primarily through ingestion of contaminated food. Some of the foods prone to contamination by mycotoxins are cereals, oilseeds, milk and dairy products. In lactating women, mycotoxins present in their diet can be absorbed and transferred to human milk and then ingested by the baby. The same process occurs in the dairy cattle. Mycotoxins present in cattle feed and silage may be transferred to cow's milk and then to their products, such as cheese and butter. Like most infant formulas are milk-based products, with the exception of formulas based on soy protein, they can also contain mycotoxins. Infants and children are considered more susceptible to the toxic effects of mycotoxins than adults, due to their lower body weight, higher metabolic rate, low capacity for detoxification and the incomplete development of some organs and tissues such as the central nervous system. The universal presence of mycotoxins in food and the high infant susceptibility to its toxic effects creates a great concern about children's exposure to mycotoxins and has motivated the adoption of restrictive regulations on the limits tolerated of these compounds in infant food. The aim of this study was to investigate the occurrence of filamentous fungi and aflatoxin M₁ (AFM₁), ochratoxin A (OTA) and deoxynivalenol (DON) in human milk, infant formula and milk-based products for infant feeding. For the analysis of mycotoxins, a method by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was validated for milk and infant formula. The results of this study indicate adequate sanitary conditions of the evaluated samples and that the infants of the studied region are not exposed to mycotoxins through breastfeeding. The absence of AFM₁, OTA and DON in human milk as biomarkers of maternal exposure to mycotoxins through diet, suggests the intake of high quality food, absent from mycotoxin contamination by the lactating women who participated of the study. Low levels of AFM₁ in the evaluated infant formulas and milk-based products for children indicates the excellent quality of the products

manufactured in Brazil, although in a few cases, the levels found exceeded the limits set by European legislation. To ensure quality and food safety, the prevention of food contamination by toxigenic fungi and selection of high quality raw material are crucial for the production of safe food and to reduce human exposure to mycotoxins.

Key-words: mycotoxins, fungi, human milk, infant formula, infant milk, food safety.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1		
Figura 1.1	Estrutura química da AFB ₁ (precursor da AFM ₁) e da AFM ₁ (hidroxi-AFB ₁)	29
Capítulo 2		
Figura 2.1	Interference of the components of bovine milk in AFM ₁ , OTA and DON signal intensities	81
Figura 2.2	LC-MS/MS chromatograms: (a) spiked sample containing DON at 10 ng/mL and (b) suspected DON peak of a human milk sample	84
Capítulo 3		
Figura 3.1	LC-MS/MS chromatograms: (a) spiked blank sample with AFM ₁ at the LOQ level and (b) milk-based product for young children where AFM ₁ was detected at 0.067 ng/mL	100
Figura 3.2	Interference of infant formula components in the signal intensities of AFM ₁ , OTA and DON.	103
Capítulo 4		
Figura 4.1	Macroscopic (a) and microscopic (b) aspects of <i>Aspergillus</i> (a ₁ ; b ₁ ; b ₂) and <i>Penicillium</i> (b ₃ ; b ₄) genera isolated from the samples of human milk, infant formula and milk-based products for young children	118

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1		
Quadro 1.1	Dados de consumo alimentar relacionados à presença de micotoxinas no leite humano em diferentes estudos	36
Quadro 1.2	Efeitos tóxicos de algumas micotoxinas de relevância para a saúde da criança	43

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1	Classificação do leite humano conforme as fases de lactação	26
Tabela 1.2	Composição básica do leite humano maduro	27
Tabela 1.3	Características físico-químicas da AFM ₁ e OTA	33
Tabela 1.4	Níveis de micotoxinas no leite humano em diversos países	35
Tabela 1.5	Presença de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo infantil reportados em diversos países	40
Tabela 1.6	Limites máximos permitidos para micotoxinas em alimentos para o consumo infantil estabelecidos no Brasil, na União Européia, nos Estados Unidos e na China	44
Tabela 1.7	Métodos analíticos desenvolvidos para micotoxinas em leite e derivados por LC-MS/MS reportados na literatura	49

Capítulo 2

Tabela 2.1	Optimised MS/MS parameters for AFM ₁ , OTA and DON	77
Tabela 2.2	Frequency distribution on food intake by the studied population	79
Tabela 2.3	Recovery, repeatability and inter-day precision for AFM ₁ , OTA and DON	81
Tabela 2.4	Relative standard deviations in the retention time and ion ratio obtained of real samples compared to a standard spiked sample	83

Capítulo 3

Tabela 3.1	Optimised MS/MS parameters for AFM ₁ , OTA and DON	96
Tabela 3.2	Occurrence of AFM ₁ in the analyzed samples	99
Tabela 3.3	Literature available on the presence of mycotoxins in products intended for infant and young child feeding, including the present study	101
Tabela 3.4	Recovery, repeatability and inter-day precision for AFM ₁ , OTA and DON	104
Tabela 3.5	LOD and LOQs obtained in infant formula. IARC classification and MRLs for mycotoxins in baby food according to EC 1881/2006 Commission Regulation	105

Capítulo 4

Tabela 4.1	Characteristics of the food for infants and young children evaluated in the present study	115
Tabela 4.2	Enumeration of yeasts and filamentous fungi in the human milk samples	117
Tabela 4.3	Occurrence of filamentous fungi in infant formula and milk-based products for young children	118
Tabela 4.4	Frequency distribuion of the filamentous fungi genera isolated from foods for infants and young children	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AFLs	Aflatoxinas
AFM₁	Aflatoxina M ₁
AME	Aleitamento Materno Exclusivo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLH	Banco de Leite Humano
DON	Deoxinivalenol
FBs	Fumonisinias
HMBB	Banco de Leite Humano de Blumenau
IARC	International Agency for Research on Cancer
LC	Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry
LH	Leite Humano
LMT	Limite Máximo Tolerável
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
OTA	Ocratoxina A
PTL	Patulina
RSD	Relative Standard Deviation
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDI	Tolerable Daily Intake
UE	União Européia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

Sumário

Introdução	19
Referências	21
Capítulo 1 – Revisão de literatura: Micotoxinas no leite humano e em alimentos infantis	25
1. Revisão de Literatura: Micotoxinas no leite humano e em alimentos infantis	26
1.1 Composição do leite humano	26
1.2 Micotoxinas	28
1.3 Transferência de micotoxinas para o leite humano	31
1.4 Micotoxinas no leite humano	32
1.5 Prováveis causas da presença de micotoxinas no leite humano	36
1.6 Alimentos infantis	37
1.6.1 Tipos de alimentos infantis	37
1.6.2 Contaminação de alimentos infantis por micotoxinas	38
1.7 Efeitos da exposição às micotoxinas na saúde da criança	41
1.8 Legislação e ingestão diária tolerável (TDI) de micotoxinas	43
1.9 Métodos para a análise de micotoxinas	45
1.9.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	46
1.9.2 Análise de micotoxinas em leite por LC-MS/MS	47
1.10 Validação de métodos analíticos	50
1.10.1 Parâmetros analíticos para a validação de métodos	50
Referências	53
Capítulo 2 – LC-MS/MS multi-mycotoxin analysis of human milk and dietary intake of Brazilian nursing mothers	71
Abstract	72
1. Introduction	73
2. Materials and methods	74
2.1 Materials	74
2.1.1 Subjects and Samples	74
2.1.2 Food Frequency Questionnaire	74
2.1.3 Chemicals	75
2.1.4 Mycotoxin standards	75
2.1.5 Equipment	75
2.1.6 Others	76
2.2 Methods	76
2.2.1 Mycotoxin standard solution preparation	76
2.2.2 MS/MS parameters optimisation for the mycotoxins	76
2.2.3 LC parameters' settings for the mycotoxins	77

2.2.4	Analytical procedure	77
2.2.5	Method validation	78
3.	Results	79
3.1	Maternal dietary intake	79
3.2	Method validation	80
3.2.1	Matrix effect and linearity (R^2)	80
3.2.2	Recovery, repeatability and inter-day precision	81
3.2.3	LOD, LOQ and selectivity	82
3.3	AFM ₁ , OTA and DON analysis in human milk	82
4.	Discussion	84
4.1	Method validation	84
4.2	Mycotoxins in human milk and maternal dietary habits	84
	Aknowledgements	86
	References	86
	Capítulo 3 – Application of an LC-MS/MS method for multi-mycotoxin analysis in infant formula and milk-based products for young children commercialized in Brazil	91
	Abstract	92
1.	Introduction	93
2.	Experimental section	94
2.1	Materials	94
2.1.1	Samples	94
2.1.2	Chemicals	94
2.1.3	Mycotoxin standards	95
2.1.4	Equipment	95
2.1.5	Others	95
2.2	Methods	96
2.2.1	Mycotoxin standard solution preparation	96
2.2.2	MS/MS parameters optimisation for the mycotoxins	96
2.2.3	LC parameters' settings for the mycotoxins	97
2.2.4	Analytical procedure	97
2.2.5	Method validation	98
3.	Results and discussion	98
3.1	Mycotoxins in infant formula and milk-based products	98
3.2	Method validation	102
3.2.1	Matrix effect and linearity (R^2)	102
3.2.2	Recovery, repeatability and inter-day precision	103
3.2.3	LOD, LOQ and selectivity	104
4.	Conclusion	105
	Aknowledgements	106
	References	107

Capítulo 4 – Occurrence of filamentous fungi in human milk, infant formula and milk-based products for young children	111
Abstract	112
1. Introduction	113
2. Materials and Methods	114
2.1 Materials	114
2.2 Methods	116
2.2.1 Isolation	116
2.2.2 Enumeration of yeasts and molds	116
2.2.3 Identification of filamentous fungi genera	116
3. Results and Discussion	117
4. Conclusion	120
Referências	122
Considerações finais	126
APÊNDICE A - Questionário de hábitos e frequência alimentar de lactantes para investigação de contaminantes no leite humano	128

Introdução

Dentre os contaminantes químicos que podem estar presentes nos alimentos encontram-se resíduos de pesticidas, metais pesados, dioxinas, acrilamidas, plastificantes e micotoxinas (BORCHERS et al., 2010). Estas últimas são responsáveis por epidemias de intoxicação alimentar desde a idade média e até hoje o seu controle é necessário na produção e comercialização de alimentos (RICHARD, 2007).

Micotoxinas são compostos secundários do metabolismo de alguns fungos filamentosos, que apresentam efeitos adversos sobre os seres humanos, animais e plantas, que resultam em doenças e perdas econômicas (ZAIN, 2011).

Os principais gêneros fúngicos produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Penicillium*, e *Fusarium* e as principais classes de micotoxinas produzidas por esses gêneros são as aflatoxinas (*Aspergillus*), ocratoxinas (*Aspergillus* e *Penicillium*), tricotecenos e fumonisinas (*Fusarium*) (BRYDEN, 2007).

A produção de micotoxinas ocorre com maior frequência em regiões de clima quente e úmido, propício para o desenvolvimento de fungos, mas também em zonas temperadas (CAST, 2003). Alguns fatores que influenciam a presença de micotoxinas em alimentos incluem condições ambientais relacionadas ao armazenamento que podem ser controladas, como temperatura e umidade (MAGAN; ALDRED, 2007). Outros fatores incluem a disponibilidade de substrato, atividade de água e a infestação por insetos ou outros animais, que conduzem à contaminação fúngica (BHATNAGAR et al., 2002).

No que se refere à saúde pública, a contaminação de alimentos por micotoxinas representa um grave problema devido à sua ocorrência ubíqua e à ampla diversidade de efeitos tóxicos que podem causar ao organismo humano, desde episódios agudos à doenças crônicas (WILD; GONG, 2010).

Os efeitos crônicos têm um impacto muito maior sobre a saúde humana. Crescimento e desenvolvimento reduzidos, imunossupressão e câncer são alguns dos principais efeitos crônicos que podem ser conduzidos pela exposição contínua a baixos níveis de micotoxinas durante um longo período de tempo (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Mulheres gestantes e lactantes merecem atenção especial, bem como as crianças, devido à capacidade teratogênica de algumas micotoxinas e a maior suscetibilidade infantil aos seus efeitos tóxicos

(ETZEL, 2006). As micotoxinas ingeridas pela mãe através de alimentos contaminados podem ser transferidas para o leite humano, expondo os bebês aos seus efeitos tóxicos (JONSYN, 1995; HASSAN et al., 2006a; BIASUCCI et al., 2011). Este é um tema de ainda maior preocupação, pois o aleitamento materno é fundamental para o pleno desenvolvimento da criança e por isso deve ser preservado e promovido (WHO, 2010).

No entanto, não é apenas através do leite humano que bebês podem ingerir micotoxinas. Fórmulas infantis são produzidas à base de leite ou soro de leite bovino, matérias-primas altamente propensas à contaminação por micotoxinas (SIGNORINI et al., 2012), podendo conduzir à exposição de bebês alimentados com fórmulas (KABAK et al., 2012).

Em ambos os casos, a prevenção da exposição infantil às micotoxinas deve ocorrer através de uma dieta materna composta por alimentos saudáveis e a utilização de matérias-primas de alta qualidade para a produção de fórmulas infantis (MAHDAVI et al., 2010). Micotoxinas são notoriamente difíceis de remover dos alimentos e o melhor método de controle é a sua prevenção (ERKEKOĞLU et al., 2008).

Embora existam diversos estudos publicados sobre a ocorrência de micotoxinas em leite humano realizados em vários países, há poucos dados sobre este tema no Brasil, havendo apenas um trabalho publicado, realizado por Navas et al., (2005). Em outros países, a exemplo da Itália e do Egito, o monitoramento de micotoxinas no leite humano é constante, havendo diversos estudos publicados (ABDALLA et al., 2002; TURCONI et al., 2004; HASSAN et al., 2006a; HASSAN et al., 2006b; POLYCHRONAKI et al., 2007; GALVANO et al., 2008; BIASUCCI et al., 2011;). A Organização Mundial da Saúde ressalta a importância do monitoramento de contaminantes no leite humano (WHO, 2009).

A ocorrência de micotoxinas em fórmulas infantis também é monitorada constantemente em estudos realizados na Europa e Ásia (RUBERT et al., 2012; KABAK et al., 2012). Até o momento, dados como esses em produtos comercializados no Brasil não foram encontrados na literatura.

Este trabalho teve o objetivo de expandir o conhecimento disponível sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos consumidos por lactentes no Brasil e será apresentado através dos seguintes capítulos:

(a) Capítulo 1: revisão de literatura abordando os principais temas envolvidos no trabalho: leite humano, alimentos infantis, micotoxinas,

efeitos das micotoxinas na saúde da criança, ocorrência de micotoxinas em leite humano e em alimentos infantis, legislação sobre micotoxinas em alimentos infantis, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e métodos LC-MS/MS para a análise de micotoxinas em leite.

(b) Capítulo 2: dieta materna e micotoxinas no leite humano, cujo objetivo foi investigar hábitos de frequência alimentar e verificar a ocorrência de aflatoxina M₁, ocratoxina A e deoxinivalenol em leite humano obtido de lactantes doadoras do Banco de Leite Humano de Blumenau/ SC, através da validação e utilização de metodologia por LC-MS/MS.

(c) Capítulo 3: ocorrência de aflatoxina M₁, ocratoxina A e deoxinivalenol em fórmulas e leites infantis disponíveis no mercado brasileiro através da validação e aplicação de metodologia por LC-MS/MS, cujo objetivo foi verificar o cumprimento das marcas aos níveis máximos de resíduo para micotoxinas em alimentos infantis estabelecidos pela legislação brasileira e europeia.

(d) Capítulo 4: ocorrência de fungos em leite humano e fórmulas e leites infantis, que teve por objetivo investigar a qualidade higiênico-sanitária no que se refere à contaminação fúngica desses alimentos, como possibilidade para o desenvolvimento de micotoxinas.

Referências

ABDALLA, E. A. M. A.; ALY S. E.; NEAMAT-ALLAH, A. A. Human exposure to mycotoxins in Egypt. **Mycotoxin Research**, v.18, n.1, p. 23-30, 2002.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; ERLICH, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chem immunol**, v. 81, p. 167-206, 2002.

BIASUCCI, G.; CALABRESE, G.; DI GIUSEPPE, R.; CARRARA, G.; COLOMBO, F.; MANDELLI, B.; MAJ, M.; BERTUZZI, T.; PIETRI, A.; ROSSI, F. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. **Eur J Nutr**, v.50, n. 3, p. 211-218, 2011.

BORCHERS, A.; TEUBER, S. S.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Food Safety. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 39, p. 95-141, 2010.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 16, (Suppl 1), p. 95–101, 2007.

CAST. **Mycotoxins**: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report no. 139. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 191 p.

ERKEKOĞLU, P.; ŞAHİN, G.; BAYDAR, T. A special focus on mycotoxin contamination in baby foods: their presence and regulations. **J Pharm Sci**, v. 33, p. 51–66, 2008.

ETZEL, R. A. What the Primary Care Pediatrician Should Know about Syndromes Associated with Exposures to Mycotoxins. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, p.282-305, set. 2006.

GALVANO, F.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; GAGLIARDI, L.; CIOTTI, S.; LUISI, S.; BOGNANNO, N.; LA FAUCI, L.; IACOPINO, A. M.; NIGRO, F.; LI VOLTI, G.; VANELLA, L.; GIAMMANCO, G.; TINA, G. L.; GAZZOLO, D. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. **Molecular and Nutrition Food Research**, v. 52, p. 496–501, 2008.

HASSAN, A. M.; SHEASHAA, H. A.; FATAH, M. F. A.; IBRAHIM, A. Z.; GABER, O. A. Does aflatoxin as an environmental mycotoxin adversely affect the renal and hepatic functions of Egyptian lactating mothers and their infants? A preliminary report. **International urology and nephrology**, v. 38, n. 2, p. 339-42, 2006a.

HASSAN, A. M.; SHEASHAA, H. A.; FATTAH, M. F. A.; IBRAHIM, A. Z.; GABER, O. A.; SOBH, M. A. Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants. **Pediatr Nephrol**, v. 21, p. 102–105, 2006b.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101–34, 2001.

JONSYN, F. Intake of Aflatoxins and Ochratoxins by infants in Sierra Leone: possible effects on the general health of these children. **Journal of Nutrition and Environmental Medicine**, v. 9, p. 15-22, 1999.

KABAK, B. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: occurrence and safety evaluation. **Food Control**, v. 26, n. 1, p.182-7, 2012.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International journal of food microbiology**, v. 119, p. 131–9, 2007.

MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L.; AREFHOSSEINI, S. R.; JABBARI, M. V. Determination of Aflatoxin M₁ in Breast Milk Samples in Tabriz–Iran. **Matern Child Health Journal**, v. 14, p. 141–145, 2010.

NAVAS, S. A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 5, p. 457–62, 2005.

POLYCHRONAKI, N., WEST, R. M., TURNER, P. C., AMRA, H., ABDEL-WAHHAB, M., MYKKÄNEN, H.; EL-NEZAMI, H. A longitudinal assessment of aflatoxin M₁ excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 7, p. 1210-5, 2007.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses: an overview. **International journal of food microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 176–83, 2012.

SIGNORINI, M. L.; GAGGIOTTI, M.; MOLINERI, A.; CHERICATTI, C. A.; ZAPATA DE BASÍLICO, M. L.; BASÍLICO, J. C; PISANI, M. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 2, p. 250–7, 2012.

TURCONI, G.; GUARCELLO, M.; LIVIERI, C.; COMIZZOLI, S.; MACCARINI, L.; CASTELLAZZI, A. M.; PIETRI, A.; PIVA, G.; ROGGI, C. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn: an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). **Eur J Nutr**, v. 43, n. 4, p. 191–197, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Biomonitoring of human milk**. Geneva, World Health Organization, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/chem/POPtechnicalnote.pdf>> Acesso em: 11 jan. 2013.

_____. **Facts for life**. 4. ed, 2010. Disponível em: www.factsforlifeglobal.org. Acesso em 04 jan 2013.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogen**, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2010.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

Capítulo 1
Revisão de Literatura:
Micotoxinas no leite humano e em alimentos infantis

1. Revisão de literatura: Micotoxinas no leite humano e em alimentos infantis

1.1 Composição do leite humano

O leite humano (LH) é um fluido complexo que exerce efeitos muito além de seu valor nutricional. No entanto, mesmo a sua composição não é completamente conhecida (NEVILLE et al., 2012). O LH é considerado o alimento ideal para crianças de até seis meses em virtude de possuir todos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (da SILVA et al., 2007), além de possibilitar diversos benefícios através da prática do aleitamento, tanto para mãe, quanto para o bebê (NETO, 2006). O LH é um alimento dinâmico, pois sofre alterações em sua composição nutricional durante o dia, conforme o esvaziamento da mama, o estágio de lactação (Tabela 1.1) e a dieta materna.

Tabela 1.1 Classificação do leite humano conforme as fases de lactação

Classificação	Período
Colostro	0 a 5 dias após o parto
Leite de transição	6 a 14 dias após o parto
Leite maduro	A partir de 15 dias após o parto

FONTE: WHO, 2002.

A composição do LH é constituída basicamente por 3 a 5% de lipídios, dentre os quais 98% são triacilgliceróis, 1% fosfolipídios e 0,5% esteróis (PICCIANO, 2001). Os lipídios estão na forma de glóbulos de cerca de 4 μ m de diâmetro em emulsão do tipo óleo em água, que é estabilizada por uma membrana contendo fosfolipídios e proteínas (da SILVA et al., 2007). A fração lipídica do LH representa a maior fonte de energia para crianças amamentadas, contribuindo com 40 a 55% do total de energia ingerida e provê nutrientes essenciais tais como vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), incluindo ácido linoléico da série ω -6 (LA, 18:2 ω -6) e α -linolênico da série ω -3 (ALA, 18:3 ω -3) (INNIS, 2003). O conteúdo de ácidos graxos insaturados no LH é maior que no de leite de vaca (SILVA et al., 2005) e pode variar conforme a dieta materna (YUHAS et al., 2006; PATIN et al., 2006).

As proteínas do LH são estruturais e qualitativamente diferentes das proteínas do leite bovino. Do seu conteúdo protéico, 80% são

constituídos pela lactalbumina, enquanto que no leite bovino a caseína corresponde a aproximadamente 80%. Desse modo, a relação proteínas do soro/caseína do LH é aproximadamente 80/20, enquanto a do leite bovino é 20/80. A baixa concentração de caseína no LH resulta na formação de coalho gástrico mais leve, de mais fácil digestão e com reduzido tempo de esvaziamento gástrico (DA SILVA et al., 2007). Além disso, o conteúdo de nitrogênio não-protéico do LH é mais elevado que o do leite bovino, variando de 18 a 30% do nitrogênio total, e tem sido bastante estudado em virtude de suas propriedades funcionais (CARRATÙ et al., 2002).

O principal carboidrato no LH é a lactose, sendo que mais de 30 açúcares já foram identificados, como a galactose, frutose e outros oligossacarídeos (ZIVKOVIC et al., 2011). A concentração de lactose é de cerca de 4% no colostro e de até 7% no leite maduro. A lactose facilita a absorção de cálcio e ferro e promove a colonização intestinal com *Lactobacillus bifidus* (PICCIANO, 2001; SILVA; GIOIELLI, 2009). A Tabela 1.2 reúne a composição de macro e micronutrientes do LH maduro.

Tabela 1.2 Composição básica do leite humano maduro

Macronutrientes	Concentração
Carboidratos (g/L)	70,0
Proteínas (g/L)	9,0
Lipídios (g/L)	35,0
Vitaminas Lipossolúveis	
A (mol/L)	1,7
D (µg/L)	0,55 ± 0,10
E (mg/L)	2,3 ± 1,0
Vitaminas Hidrossolúveis	
C (mg/L)	40 ± 10
Niacina (mg/L)	1,500 ± 0,020
B ₆ (mg/L)	0,24
Ácido fólico (µg/L)	85±37
Minerais	
Cálcio (mg/L)	250 - 300
Fósforo (mg/L)	142 ± 25
Ferro (mg/L)	0,2 - 0,4
Zinco (mg/L)	1,0 - 2,0
Iodo (mg/L)	110 ± 40

Selênio ($\mu\text{g/L}$) 20 ± 5

FONTE: ZIVKOVIC et al., 2011; WHO, 2002

Além de seus componentes naturais, o LH pode conter substâncias xenobióticas, provenientes do meio externo, como resíduos de pesticidas, medicamentos e micotoxinas, que se presentes em quantidades elevadas, podem afetar o desenvolvimento das crianças (ABDALLA et al., 2002; BORCHERS et al., 2010). As micotoxinas contaminam a dieta de grande parte da população mundial, sendo que, aliada à especial suscetibilidade infantil aos seus efeitos tóxicos, tornam a presença de micotoxinas no LH um motivo de preocupação internacional e têm estimulado pesquisas em diversos países, inclusive no Brasil (CAST, 2003; NAVAS et al., 2005).

1.2 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de fungos que infectam alimentos, principalmente cereais, oleaginosas, especiarias e frutas (BORCHERS et al., 2010). Estima-se que 25% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo sejam contaminados por micotoxinas (CAST, 2003).

Na posição de um dos países líderes na produção de alimentos agrícolas e de commodities, com clima predominantemente quente e úmido, o Brasil apresenta condições excelentes para o crescimento de fungos micotoxigênicos (FREIRE et al, 2007). As micotoxinas que merecem atenção especial quanto à saúde infantil são as aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, deoxinivalenol e zearalenona (SHERIF et al., 2009; ETZEL, 2006).

As micotoxinas são compostos lipossolúveis, facilmente absorvidos pelo intestino, vias respiratórias e pele (RAI; VARMA, 2010). São capazes de provocar intoxicações agudas, subagudas e crônicas. Os efeitos crônicos geralmente são resultado da ingestão moderada de micotoxinas a longo período de tempo (VAN EGMOND et al., 2007). Algumas destas substâncias possuem capacidade mutagênica e carcinogênica, sendo as aflatoxinas as mais potentes (MCQUEEN, 2010).

As aflatoxinas (AFLs) são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e algumas outras espécies de *Aspergillus* sp. (JAY, 2005). Amendoim e milho são os alimentos mais frequentemente contaminados, mas a castanha-do-Brasil e demais

oleaginosas também podem conter níveis elevados. As principais AFLs são chamadas de B₁, B₂, G₁, e G₂, devido a sua fluorescência sob luz ultravioleta, que pode ser azul ou verde (blue / green). A AFB₁ é a substância natural com maior poder carcinogênico conhecida até o momento, considerada pelo IARC (International Agency for Research on Cancer) um carcinógeno do grupo 1, como causa de carcinoma hepatocelular em humanos (ZAIN, 2011; BARKAI-GOLAN, 2008). A hidroxilação da AFB₁ e da AFB₂ no fígado conduz a formação das AFM₁ e AFM₂, respectivamente, que podem ser encontradas no leite de animais e humanos que consumiram alimentos contaminados com AFBs (HOLZAPFEL et al., 1966).

A AFM₁ é o principal produto hidroxilado da AFB₁, produzida no fígado pela enzima citocromo P450 1A2 (CYP1A2) (Figura 1.1) e considerada um carcinógeno humano (grupo 1) pelo IARC (IARC, 2002). A AFM₁ é excretada na urina e nas fezes, bem como no leite de vacas leiteiras e também no LH de lactantes que tenham ingerido alimentos contaminados com AFB₁. A taxa de conversão da AFB₁ para a AFM₁ varia de 0,3 a 6,2% tanto em humanos quanto em animais (CREPPY, 2002).

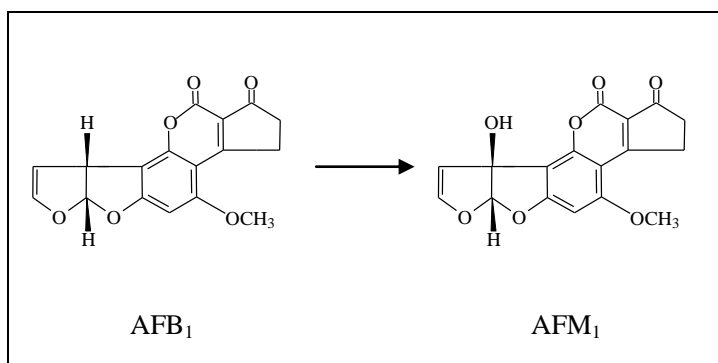


Figura 1.1 Estrutura química da AFB₁ e da AFM₁ (hidroxi-AFB₁)

FONTE: do autor

A ocratoxina A (OTA), isolada originalmente de cepas de *Aspergillus ochraceus*, é nefrotóxica e nefrocarcinogênica, sendo também produzida por *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. ostianus*, *A. niger*, *A. carbonarius* e produzida principalmente por *Penicillium verrucosum* em países de clima temperado (SCUSSEL et

al., 2008). A OTA é considerada pelo IARC como um provável carcinógeno humano, classificada no grupo 2B (IARC, 1993). A contaminação por OTA é frequente em diversos alimentos, entre eles o cacau, grãos de café, farinha de mandioca, cereais, peixes, amendoim, frutas secas, ovos e leite (ZAIN, 2011). A absorção da OTA ocorre na parte superior do trato gastrointestinal e varia entre 40% e 66% em várias espécies animais. No sangue, a OTA permanece ligada às proteínas e é distribuída principalmente para os rins e também para o fígado, músculos e tecido adiposo. A meia-vida da OTA no soro humano é estimada em aproximadamente 35 dias e sua excreção ocorre principalmente através da bile e urina (BORCHERS et al., 2009).

As fumonisinas (FBs) são produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*, contaminando principalmente o milho e produtos derivados do trigo. Estudos epidemiológicos sugerem que a exposição às FBs pode levar ao câncer esofágico (RICHARD, 2007). As FBs são pouco absorvidas e rapidamente eliminadas, entretanto, uma pequena porção de FBs e de seus metabólitos são retidas no fígado e nos rins (BORCHERS et al., 2009). Estudos em animais demonstraram que a exposição às FBs pode causar defeitos de tubo neural. Isso seria possível através da interrupção da biossíntese de esfingolipídios e conseqüente detrimento da estrutura e função das membranas celulares. Os defeitos do tubo neural são conhecidos por estarem associados com níveis reduzidos de folato e é possível que o rompimento da membrana induzido pelas FBs possa levar à redução da absorção de folato através de danos aos seus receptores na membrana celular (WILD; GONG, 2010).

A zearalenona (ZON) é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Fusarium* sp., inclusive *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, que podem infectar o milho, trigo, aveia, cevada e gergelim (JAY, 2005). Possui atividade estrogênica, podendo levar a alterações hormonais (PITT, 2000), o que gera preocupação em relação à saúde humana. Geralmente, alimentos contaminados com ZON apresentam simultaneamente outras micotoxinas de *Fusarium* sp., como tricotecenos e fumonisinas. Após a administração oral, a ZON é rapidamente absorvida. Em seguida, é extensivamente metabolizada no intestino e/ou no fígado, sofrendo hidroxilação, resultando na formação de seus metabólitos α - e β -ZON. A ZON e seus metabólitos são conjugados com ácido glicurônico, o que facilita a sua excreção urinária (BORCHERS et al., 2009).

O deoxinivalenol (DON), também conhecido por vomitoxina, é produzido principalmente por *F. graminearum*, e pode coexistir com a ZON, sendo encontrado principalmente no milho, trigo, aveia e cevada (RICHARD, 2007). Os efeitos tóxicos do DON têm sido estudados em animais, sendo que em diversas espécies, os principais efeitos da exposição ao DON são anorexia e a diminuição do ganho de peso, em virtude da aversão à comida (BORCHERS et al., 2009). Em crianças, o consumo de alimentos intensamente contaminados por DON pode levar a episódios de vômito poucas horas após a ingestão (SHERIF et al., 2009).

1.3 Transferência de micotoxinas para o leite humano

Muitas micotoxinas apresentam elevada afinidade por lipídios, são facilmente absorvidas no organismo e tendem a ser acumuladas no tecido adiposo humano. Durante a lactação, a reserva de gordura da mãe é mobilizada para a produção do leite materno, e juntamente com os lipídios que constituirão o leite, são transferidos os compostos estocados no tecido adiposo, como as micotoxinas (WALSH; NEVILLE, 1994; RAI; VARMA, 2010).

A exposição materna às micotoxinas ocorre principalmente através dos alimentos e, uma vez que esses compostos podem ser transferidos para o leite humano, a exposição de bebês pode ocorrer através do aleitamento materno, embora também por passagem através da placenta durante a gravidez (ULASZEWSKA et al., 2011).

Em geral, o transporte de xenobióticos para o LH ocorre através da difusão passiva desses compostos a partir do plasma, e a sua concentração no LH é proporcional à sua solubilidade e lipofilicidade (ANDERSON; WOLFF, 2000). As características bioquímicas do leite, como pH reduzido e alto teor de lipídios comparado ao plasma, contribuem para este fenômeno. Além disso, a composição do LH muda ao longo de várias semanas após o parto (colostro/ leite de transição/ leite maduro) e durante o esvaziamento da mama (leite inicial/ leite final). Esses fatores contribuem para a variação da excreção de xenobióticos para o LH (ITO; LEE, 2003). Devido à variação do conteúdo lipídico do LH durante a lactação, é possível que a acumulação e a mobilização de contaminantes lipofílicos variem durante o período do aleitamento materno (POLYCHRONAKI et al., 2006). Entretanto, informações sobre a toxicocinética de compostos químicos no LH são incompletas (LANDRIGAN et al., 2002).

É possível que a excreção de micotoxinas para o LH seja suportada pela BCRP, uma proteína de resistência ao câncer de mama, membro da família de transportadores de efluxo dependentes de ATP, conhecida por ser responsável pela excreção de vários xenobióticos para o leite materno (JONKER et al., 2005; VAN HERWAARDEN; SCHINKEL, 2006; EFSA, 2006).

1.4 Micotoxinas no leite humano

A maior preocupação referente à contaminação do LH por micotoxinas está basicamente limitada à AFM₁ e à OTA (GALVANO et al., 2008), embora também já tenham sido detectadas as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em LH (POLYCHRONAKI et al. 2007). Estudos sobre a presença de outras micotoxinas no LH, como FBs, ZON e DON estão indisponíveis na literatura até o momento, embora seja possível encontrá-las em leite bovino (COFFEY et al., 2009). Alguns metabólitos, como o α - e β -ZOL, α - e β -ZAL e deepoxi-deoxinivalenol (DOM-1) também já foram encontrados no leite bovino e em urina humana (SORENSEN; ELBAEK, 2005; TURNER et al., 2010).

A AFM₁ é resistente à pasteurização e até mesmo à esterilização (ABDULRAZZAQ et al. 2003). A OTA também se mantém estável quando submetida a pasteurização, mas seu conteúdo pode ser reduzido em alimentos submetidos à temperaturas de autoclavagem e extrusão (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Dessa forma, o processamento do LH realizado pelos Bancos de Leite Humano (BLHs), onde se inclui a pasteurização a 62,5 °C por 30 minutos (FIOCRUZ, 2005), não é suficiente para eliminar essas micotoxinas, permitindo que as mesmas estejam presentes no LH distribuído a hospitais e Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) que, na maioria dos casos, abrigam crianças prematuras.

A AFM₁ (Tabela 1.3), cujo nome significa *milk aflatoxin*, têm sido a micotoxina mais abordada em estudos com LH, provavelmente em virtude de sua característica transferência para o leite e de sua utilização como biomarcador, fornecendo informações sobre a qualidade dos alimentos ingeridos e a exposição humana à AFB₁ em uma determinada região, sem a necessidade de coletas invasivas de amostras de sangue ou demais tecidos biológicos (WHO, 2009b). A contaminação de alimentos por OTA é bastante comum em países de clima temperado, principalmente na Europa, e por isso a sua ocorrência no LH também tem sido monitorada por estudos conduzidos nesses países. No sul do

Brasil, onde há a predominância de temperaturas mais moderadas em relação às outras regiões do país, a contaminação por OTA em alimentos popularmente consumidos também já foi reportada, sugerindo a possibilidade de ocorrência de OTA no LH de mulheres desta região (NUNES et al., 2003; FURLONG et al., 1999). Outras micotoxinas detectadas com frequência em alimentos no Brasil, como as FBs, também merecem investigação no LH (SCUSSEL; SCAFF, 2004; SCUSSEL; GALVÃO, 2009). Além disso, existe a possibilidade de co-ocorrência de micotoxinas, conforme Copetti et al. 2012, que encontraram co-ocorrência de AFLs e OTA em 80% das 125 amostras de chocolate comercializado no Brasil e Moreno et al. 2009, que detectaram co-ocorrência de FBs e AFLs em 8% das 300 amostras de milho produzido no Brasil.

Tabela 1.3 Características físico-químicas da AFM₁ e da OTA

Características	Aflatoxina M₁ (AFM₁)	Ocratoxina A (OTA)
<i>Sinônimos</i>	4-hydroxyafatoxin B ₁ , milk aflatoxin	(-)-N- [(5-Chloro- 8-hydroxy- 3-methyl- 1-oxo- 7-isochromanyl) carbonyl]- 3-phenylalanine, Phenylalanine-ochratoxin A
<i>Fórmula molecular</i>	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆
<i>Peso molecular</i>	328.273	403.813
<i>Número CAS</i>	6795-23-9	303-47-9
<i>Densidade</i>	1.66 g/cm ³	1.425 g/cm ³
<i>Ponto de ebulição</i>	644.3°C at 760 mmHg	632.4°C at 760 mmHg
<i>Índice de refração</i>	1.718	1.628
<i>Ponto de chama</i>	246.1°C	336.3°C
<i>Pressão de vapor</i>	1.76E-17mmHg at 25°C	7.3E-17mmHg at 25°C

FONTE: CAS - Chemical Abstracts Service (www.cas.chemservice.com)

Alguns estudos têm demonstrado uma maior prevalência na contaminação por OTA do que por AFM₁ no LH na Europa e também

no Brasil, com diferenças entre os países em relação à frequência de amostras contaminadas (de 10% na Suíça a 100% no Chile e Turquia) e nos níveis de contaminação (2-60 ng/L na Eslováquia a 620-13,111ng/L na Turquia (TURCONI et al., 2004; DOSTAL et al., 2008; GALVANO et al., 2008; GÜRBAY et al., 2009; MUÑOZ et al., 2010). Por outro lado, no estudo conduzido por Abdalla et al. 2002, no Egito, a presença de AFM₁ foi constatada em 55% das 120 amostras analisadas, enquanto que a OTA foi detectada em 35,8% das mesmas.

A Tabela 1.4 apresenta dados sobre a contaminação do LH por micotoxinas, gerados em diversos países.

Tabela 1.4 Níveis de micotoxinas no leite humano em diversos países

País	Período de coleta	Leite	Micotoxina	Dieta	Positivas/ Total	Positivas (%)	Concentração (ng/l)	Método	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)	Referência
Europa											
Suíça	Ago/1992- Fev/1993	NI	OTA	NO	1/40	2.5	14	LC/FD	NI	5	Zimmerli; Dick, 1995
Alemanha	Ago-Out/1986	NI	OTA	NO ^a	4/36	11.1	17 - 30	LC/FD ^b	100	NI	Gareis et al., 1988
Noruega	Maio-Ago/1994 Jul/1995 a Set/1996	Colostro	OTA	NO	38/115	33	10 - 130	LC/FD	NI ^c	10	Skaug et al., 1998
		Maduro	OTA	QFA ^d	17/80	21	10 - 182	LC/FD	NI	10	Skaug et al., 2001
Itália	Mar-Jul/2000	Colostro	AFM ₁	QFA	1/231	0.43	194	LC/FD	0.5	NI	Turconi et al., 2004
			OTA	QFA	198/231	85.7	0.5 - 57	LC/FD	0.5	NI	
	Jan-Dez/2006	Maduro	AFM ₁	QFA	4/82	5	< 7 - 140	LC/FD	3.0	7.0	Galvano et al., 2008
Eslováquia	Jan-Jun/2007	Colostro	OTA	QFA	61/82	74	< 5 - 405	LC/FD	2.0	5.0	
			OTA	QFA	45/57	78.9	1.1 - >75.1	LC/FD	0.5	1.0	Biasucci et al., 2011
	Mar-Ago/2007	Maduro	OTA	NO	9/76	11.8	2.3 - 60.3	LC/FD	4.8	14.4	Dostal et al., 2008
	Out/2007 a Mar/2008 2009	NI	AFM ₁	NO	75/75	100	60.90 - 299.99	LC/FD	5	NI	Gürbay et al., 2010
			AFB ₁	NO	75/75	100	94.50 - 4123.80	LC/FD	5	NI	
			OTA	NO	75/75	100	620.87-13111.30	LC/FD	10	NI	Gürbay et al., 2009
Américas											
Chile	Out/2008 a Jan/2009	Colostro	OTA	NO	9/9	100	44 - 184	LC/FD	10	30	Muñoz et al., 2010
Brasil	NI	NI	AFM ₁	NO	1/50	2	24	LC/FD	NI	10	Navas et al., 2005
			OTA	NO	2/50	4	10 - 24	LC/FD	NI	10	
Outros Países											
Irã	Maio-Set/2006	NI	AFM ₁	QFA	157/160	98.1	0.3 - 26.7	ELISA ^e	5	NI	Sadeghi et al., 2009
	Mar-Abr/2007	Maduro	AFM ₁	QFA	20/182	11	5.1 - 8.1	ELISA	5	NI	Mahdavi et al., 2010
Sierra Leoa	NI	NI	AFLs	NO	99/113	88	5 - 372.000	LC/FD	50	NI	Jonsyn et al., 1995
			OTA	NO	40/113	35	200-337.000	LC/FD	200	NI	
Egito	Abr/2000- Maio/2002	NI	AFM ₁	NO	66/120	55	0.02 - 2.09	LC/FD	NI	NI	Abdalla et al., 2002
			OTA	NO	43/120	35.8	5.07 - 45.01	LC/FD	NI	NI	
	NI	Maduro	AFM ₁	NO	24/50	48	1.9 ± 0.6	ELISA	NI	NI	Hassan et al., 2006a
	NI	Maduro	OTA	NO	36/50	72	NO	LC/MF ^f	NI	NI	Hassan et al., 2006b
Maio-Set/2003	NI	AFM ₁	QFA	248/443	56	6.3-497 (verão) 4.2-108 (inv.)	LC/FD LC/FD	4.2 4.2	NI	Polychronaki et al., 2007	

AFLs: aflatoxinas; AFM₁: aflatoxina M₁; OTA: ocratoxina A; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; ^aNO: dados não obtidos; ^bLC/FD: Cromatografia líquida com detector de fluorescência; ^cNI: não informado; ^dQFA: Questionário de frequência alimentar; ^eELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ^fLC/MF: Cromatografia líquida com detector microfluorométrico. FONTE: do autor.

1.5 Prováveis causas da presença de micotoxinas no leite humano

A exposição humana às micotoxinas ocorre principalmente através da ingestão de alimentos contaminados, embora a exposição por inalação tem sido cada vez mais estudada e relacionada ao desenvolvimento de micotoxicoses agudas (BORCHERS, 2010; ZAIN, 2011).

A inalação de esporos fúngicos ainda não foi relacionada à transferência de micotoxinas para o LH, entretanto, Novak et al. (2002), alertam para uma possível contaminação de LH por fungos ambientais durante sua coleta e armazenamento, que deve ser considerada nos casos dos bancos de leite humano e também pelas mães que armazenam seu leite para administrá-lo posteriormente à criança.

Estudos conduzidos em vários países têm analisado o LH e empregado questionário de frequência alimentar (QFA) com as lactantes a fim de identificar os principais alimentos envolvidos na transferência de micotoxinas através da dieta materna. Entre estes trabalhos, Mahdavi et al. (2010), relacionaram a presença de AFM_1 no LH ao elevado consumo de leite bovino pelas lactantes no Irã. Para Galvano et al. (2008), o consumo habitual de pães e carne de porco curada contribuiu para os níveis elevados de OTA em LH na Itália. Os autores defendem a criação de recomendações alimentares específicas para gestantes e lactantes, a fim de reduzir a contaminação de LH por OTA e garantir os benefícios do aleitamento materno.

Demais alimentos como cereais e seus produtos, sucos, refrigerantes, patês e produtos de panificação também são citados por diversos autores como produtos relacionados à contaminação de LH por micotoxinas. O Quadro 1.1 apresenta estes resultados.

Quadro 1.1 Dados de consumo alimentar relacionados à presença de micotoxinas no leite humano em diferentes estudos

Micotoxina	País	Hábitos alimentares/ alimentos	Referências
OTA	Noruega	Bolos, patê de fígado, sucos e carnes processadas	Skaug et al., 2001
	Itália	Consumo habitual de pães	Turconi et al., 2004
	Itália	Consumo habitual (>7x/semana) de pães, produtos de panificação e carne de porco curada	Galvano et al., 2008
		Bolos, puddings, biscoitos, óleos	Biasucci et al.,

AFM₁	Egito	e refrigerantes Amendoim	2011 Polychronaki et al., 2007
	Irã	Cereais	Sadeghi et al., 2009
		Consumo diário de leite	Mahdavi et al., 2010

AFM₁: aflatoxina M₁; OTA: ocratoxina A.

FONTE: do autor.

1.6 Alimentos infantis

Embora o leite humano seja o alimento ideal para o recém-nascido (WHO, 2009a), as fórmulas infantis são as alternativas mais seguras ao aleitamento materno e constituem uma importante e, muitas vezes, única fonte alimentar para recém-nascidos e crianças nos primeiros meses de vida (BHATIA; GREER, 2008). Desempenham um papel indispensável na nutrição infantil quando o aleitamento materno não é possível, sobretudo em casos de crianças com necessidades dietoterápicas específicas (BALLHAUSEN et al., 2011). As fórmulas infantis são projetadas para fornecer os nutrientes necessários para o ótimo crescimento e o desenvolvimento infantil. Segundo a WHO, as crianças devem ser alimentadas preferencialmente com leite humano ordenhado ou então, com fórmula infantil de qualidade a partir de um copo limpo (WHO, 2010).

1.6.1 Tipos de alimentos infantis

A indústria de alimentos disponibiliza no mercado uma grande variedade de produtos especificamente produzidos para o consumo por lactentes e crianças de até 5 anos de idade. Segundo a Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes e Crianças de Primeira Infância (NBCAL), os seguintes termos são utilizados para a denominação dos produtos e de seu público-alvo (BRASIL, 2001):

- Lactente: criança de até um ano de idade (de zero a 11 meses e 29 dias);
- Criança de primeira infância: criança de 12 meses a 3 anos de idade;

- Fórmula infantil para lactente: é o produto em forma líquida ou em pó, destinado à alimentação de lactentes, até o sexto mês, sob prescrição, em substituição total ou parcial do LH;
- Fórmula infantil de seguimento para lactentes: é o produto em forma líquida ou em pó utilizado, quando indicado, como substituto do LH a partir do sexto mês;
- Fórmula infantil de seguimento para crianças de primeira infância: é o produto em forma líquida ou em pó utilizado como substituto do leite materno ou humano para crianças de primeira infância;
- Leite em pó modificado: é o produto elaborado a partir de leite "in natura" ou de leite em pó integral, semidesnatado ou desnatado, ou pela combinação destes.

1.6.2 Contaminação de alimentos infantis por micotoxinas

Além das fórmulas, os alimentos geralmente introduzidos entre o aleitamento e a primeira infância costumam ser leite, tanto fluido quanto em pó reconstituído, papinhas de frutas ou legumes, mingaus elaborados a partir de farinhas à base de cereais e farinhas lácteas (EGOUNLETY, 2002). Esses produtos podem apresentar micotoxinas em virtude dos ingredientes utilizados em sua formulação, principalmente leite bovino, milho, arroz, trigo e também polpa e suco de maçã (SHERIF et al., 2009).

O leite bovino é considerado a principal fonte de exposição humana a AFM₁, já os cereais podem conter a maioria das micotoxinas, como aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas e tricotecenos, inclusive de forma simultânea. Sucos e polpas de frutas são especialmente suscetíveis à contaminação por patulina e ocratoxina A (EL TRAS et al., 2011; BARREIRA et al., 2010; BARKAI-GOLAN; PASTER, 2008).

A ocorrência de micotoxinas em fórmulas infantis acarreta uma preocupação ainda maior em relação à saúde de lactentes, visto que estes produtos são frequentemente utilizados como única fonte alimentar da criança, e a exposição contínua mesmo a baixos níveis pode acarretar graves consequências a longo prazo (ALVITO et al., 2010). Isso tem estimulado a adoção de limites cada vez mais rígidos pela legislação de micotoxinas em alimentos de diversos países, inclusive do Brasil, através da RDC n°07, de 18/02/2011 (BRASIL, 2011).

A Tabela 1.5 apresenta resultados de estudos sobre a presença de micotoxinas em alimentos infantis. Como pode ser observado, a AFM₁

tem sido a micotoxina de maior interesse nas pesquisas feitas em fórmulas infantis, e alguns estudos têm reportado níveis acima de 0,025 ng/mL, o limite máximo tolerado pela legislação européia para AFM₁ em fórmulas infantis (Commission regulation (EC) 1881/2006). Poucos estudos investigaram a ocorrência de OTA em fórmulas, embora Rubert et al. (2012), Meucci et al. (2008), Baydar et al. (2007), e Kabak (2012) tenham encontrado níveis iguais ou superiores ao limite máximo tolerado pela legislação européia para OTA em alimentos infantis (0,5 ng/mL). Nos demais alimentos, como cereais e produtos à base de maçã, a investigação de outras micotoxinas além de AFM₁ e OTA têm sido mais comum, visto que esses alimentos podem ser sujeitos à contaminação por uma maior variedade de micotoxinas, conforme discutido previamente.

Tabela 1.5 Presença de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo infantil reportados em diversos países

País	Alimento	Micotoxina	Nº amostras	Nº positivas (%)	Concentração (µg/kg)	Método	Referência
Europa							
Espanha	Cereais infantis à base de milho	FBS	27	6 (22)	<LOQ - 19,4 ^a	LC-MS/MS ^c	D'Arco et al., 2008
	Papinhas	PTL	17	0 (0)	-	LC/UV ^d	Marín et al., 2011
	Suco de maçã para crianças	PTL	20	14 (70)	<LOD - 29,6	MEKC ^e	Murillo-Arbizu et al., 2010
	Cereais infantis	OTA	3	2 (66)	0,050 ^b	UHPLC-MS/MS ^f	Beltrán et al., 2011
	Fórmulas infantis	AFM ₁	7	1 (14)	0,006		
	Cereais infantis	AFM ₁	35	1 (3)	<0,05	LC-MS/MS	Rubert et al., 2012
Itália	Fórmulas infantis	OTA	35	2 (6)	0,35 - 0,5		
		OTA	185	133 (72)	0,0351 - 0,6895	LC/FD ^g	Meucci et al., 2008
		ZEA	185	17 (9)	0,76	LC/FD	Meucci et al., 2011
	Papinhas à base de carne	α-zearalenol	185	49 (26)	12,91		
		β-zearalenol	185	53 (28)	73,24		
		α-zearalanol	44	12 (27)	30,50		
Portugal	Farinhas à base de cereais	AFB ₁	44	1 (2,3)	950		
		AFM ₁	27	1 (7)	0,009	LC/FD	Alvito et al., 2010
	Fórmulas infantis	AFM ₁	27	4 (26)	0,017 - 0,041		
		OTA	27	10 (67)	0,034 - 0,212		
	Puré de maçã	PTL	76	5 (7)	<LOQ-5,7	LC/UV	Barreira et al., 2010
	Suco de maçã	PTL	10	-	-		
Outros							
China	Farinha láctea	AFM ₁	6	2 (33)	0,0095 - 0,0158	ELISA ^h	Guan et al., 2011
		AFM ₁	9	7 (77)	0,012 - 0,2239		
Egito	Fórmulas infantis	AFM ₁	125	54 (43,2)	0,0003 - 0,0218	ELISA	El-Tras et al., 2011
Índia	Leites infantis	AFM ₁	17	17 (100)	0,077 - 0,844	ELISA	Rastogi et al., 2004
	Fórmulas infantis	AFM ₁	18	17 (94)	0,143 - 0,77		
	Farinha láctea	AFM ₁	40	38 (5)	0,065 - 1,012		
	Leite fluido	AFM ₁	12	4 (33)	0,028 - 0,164		
Irã	Fórmulas infantis	AFM ₁	120	116 (96)	0,001 - 0,014	ELISA	Oveisi et al., 2007
		AFM ₁	80	72 (90)	0,003 - 0,035		
Marrocos	Cereais infantis	ENS	20	2 (10)	14,500	LC/DAD ⁱ	Mahnine et al., 2011
		BEA	20	2 (10)	10,600		
		FUS	20	1 (5)	7,400		
		AFB ₁	29	27 (93)	0,10 - 6,04	ELISA	Baydar et al., 2007
Turquia	Fórmulas infantis	AFM ₁	29	13 (45)	0,06 - 0,32		
		OTA	29	7 (24)	0,27 - 4,50		
		AFM ₁	62	5 (8)	0,016 - 0,022	LC-FD	Kabak, 2012
	Fórmulas infantis	OTA	62	12 (19)	0,017 - 0,184		

^avariação; ^bvalor máximo encontrado; ^cLC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; ^dLC/UV: cromatografia líquida com detector de luz visível; ^eMEKC: cromatografia eletrocínética micelar; ^fUHPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas; ^gLC/FD: cromatografia líquida com detector de fluorescência; ^hELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ⁱLC/DAD: cromatografia líquida com detector de foto-diodos; FBS: fumonisinas; PTL: patulina; AFM₁: aflatoxina M₁; OTA: ocratoxina A; ZEA: zearalenona; ENS: eniatinas; BEA: beauvericina; FUS: fusaproliferina. FONTE: Do autor.

1.7 Efeitos da exposição às micotoxinas na saúde da criança

Devido à elevada toxicidade em humanos adultos e animais, pesquisadores têm buscado por evidências de efeitos tóxicos da AFM₁ e da OTA no organismo de bebês, cuja imaturidade fisiológica propõe efeitos ainda mais sérios. Lactentes e crianças são considerados mais suscetíveis às micotoxinas do que os adultos, devido ao seu menor peso corporal, maior taxa metabólica, menor capacidade de desintoxicação e desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos como o sistema nervoso central (SHERIF et al., 2009).

Hassan et al. (2006a), relacionaram a presença de AFLs no leite materno (1,9 ng/ mL), e no soro da mãe (8,9 ng/ mL) e do bebê (1,8 ng/ mL) com as funções renais da criança, no entanto, não foi encontrada disfunção hepática ou renal associada aos níveis de toxinas encontrados. Já em outro estudo, abordando OTA, os autores encontraram microalbuminúria e β_2 microglobulinúria significativamente mais elevadas em crianças que apresentaram OTA sérica em relação às controle, sugerindo possíveis efeitos na função renal das crianças (HASSAN et al., 2006b).

A transferência de AFLs e OTA pode ocorrer *in utero*, através da placenta, quando a gestante é exposta às micotoxinas, principalmente pela ingestão de alimentos contaminados. A exposição fetal *in utero* foi comprovada pela presença de AFLs e OTA em amostras de soro fetal e cordão umbilical humano (BIASUCCI et al., 2011; TURNER et al., 2007).

Turner et al. (2007), investigaram o efeito da exposição *in utero* no crescimento durante o primeiro ano de vida de crianças no Gâmbia e demonstraram que a exposição materna a AFLs durante a gravidez apresenta efeitos deletérios no crescimento da criança. Ainda demonstraram que uma redução nos complexos aflatoxina-albumina (AF-alb) maternos de 110 pg/mg para 10 pg/mg levariam a um aumento de 0,8 kg de peso e 2 cm de altura durante o primeiro ano de vida do bebê. Nos Emirados Árabes Unidos, Abdulrazzaq et al. (2002), encontraram significativa relação inversa entre AFLs no cordão umbilical e peso do bebê ao nascer.

Os efeitos da exposição às AFLs sobre o crescimento infantil também foram estudados por Mahdavi et al. (2010), que encontraram relação entre a ingestão de LH contaminado com AFM₁ e retardo no crescimento dos lactentes. Shouman et al. (2012), encontraram menor ganho de altura nas crianças que apresentaram complexos AF-alb

séricos, embora não encontraram diferença no ganho de peso entre casos positivos e negativos para AFLs. Os autores hipotetizam que o déficit de altura seja devido à inibição da síntese protéica promovida pelas AFLs, mas que as quantidades presentes no soro das crianças não foram suficientes para provocar problemas no ganho de peso.

Além dos efeitos no crescimento infantil, as AFLs e OTA desempenham papel imunossupressor, tornando as crianças ainda mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças e infecções (WILD; GONG, 2010).

A exposição às AFLs pode estar relacionada ao desenvolvimento de Kwashiorkor, sendo considerada um dos possíveis fatores etiológicos da doença (HENDRICKSE, 1997). A inibição de síntese protéica, hipoalbuminemia, estenose hepática, depleção do glicogênio hepático e imunossupressão são algumas similaridades entre os efeitos tóxicos das AFLs e os sintomas apresentados por pacientes com Kwashiorkor (CAST, 2003). Jonsyn (1999), encontrou maior concentração sérica de AFLs e OTA em crianças com Kwashiorkor do que nos controles negativos para a doença. Além disso, pacientes com baixo peso apresentaram maior frequência de contaminação por AFLs e OTA. A presença simultânea das duas toxinas pode ter contribuído para o déficit no ganho de peso. Embora alguns trabalhos tenham encontrado relação entre exposição às AFLs e desenvolvimento de Kwashiorkor, o assunto ainda é motivo de controvérsias e necessita de mais estudos.

A ZON é uma micotoxina estrogênica, capaz de adotar uma conformação muito semelhante ao 17β -estradiol, permitindo que se ligue a receptores de estrógeno em células-alvo (SHIER et al., 2001). Um estudo consuzido na Itália associou níveis séricos elevados de ZON (933.7 ± 200.3 pg / mL) e seu congênere α -zearalenol (106.5 ± 1.9 pg / mL) em meninas com puberdade precoce central (PCC). As meninas apresentaram maior altura, peso e velocidade de crescimento do que o grupo controle (MASSART et al., 2008). Por outro lado, Bandera et al. (2011), sugerem que a ZON exerce efeitos anti-estrogênicos, pois em seu estudo envolvendo 163 meninas de 9 a 10 anos de idade, constataram que as meninas que apresentaram ZON e seus congêneres na urina apresentaram menor altura e desenvolvimento mamário. Os resultados conflitantes mostram que os efeitos da exposição à ZON na saúde da criança ainda necessitam de mais estudos.

A transferência de tricotecenos para o LH ainda não foi reportada, embora já existam estudos que demonstram o transporte de ZON e deoxinivalenol (DON) através da placenta animal e humana

(DÄNICKE et al., 2007; PROUILLAC et al., 2009; NIELSEN et al., 2011). A ingestão de alimentos contaminados por DON pode levar a episódios persistentes de vômito em crianças (SHERIF et al., 2009).

A exposição às FBs pode levar ao câncer esofágico (RICHARD, 2007) e também está relacionada a anomalias congênitas como espinha bífida e anencefalia, bem como na redução da absorção do ácido fólico (SHERIF et al., 2009).

Micotoxinas têm sido associadas a uma ampla variedade de efeitos adversos à saúde em crianças, incluindo no crescimento, desenvolvimento e supressão imunológica (Quadro 1.2).

Quadro 1.2 Efeitos tóxicos de algumas micotoxinas de relevância para a saúde da criança

Micotoxinas	Efeitos tóxicos associados
Aflatoxinas	Déficit no crescimento (ganho de peso e altura), imunossupressão, Kwashiorkor (suspeita)
Ocratoxina A	Função renal prejudicada, nefropatias
Deoxinivalenol	Vômito
Fumonisinias	Má formação do tubo neural, redução da absorção do ácido fólico, câncer esofágico
Zearalenona	Efeitos estrogênicos, câncer cervical (suspeita)

FONTE: ETZEL, (2006).

1.8 Legislação e ingestão diária tolerável de micotoxinas

A ingestão diária tolerável (TDI) representa uma estimativa da quantidade de um contaminante, expressa em base no peso corporal, que pode ser ingerida diariamente durante a vida sem riscos à saúde (GALVANO et al., 2008). Embora seus valores sejam baixos, o TDI foi calculado para adultos e não para crianças, que possuem maior sensibilidade aos contaminantes devido à sua imaturidade fisiológica. Para AFM₁ não existe um valor diário tolerável, sendo desejável que sua ingestão seja a mais baixa possível. Diversos valores de TDI para OTA foram sugeridos, sendo o mais alto o proposto pelo EFSA, de 17 ng/kg de peso diariamente (EFSA, 2006). O *Nordic Working group on Food Toxicology and the Scientific Committee for Food* propuseram um TDI de 5 ng/kg de peso diariamente (NNT 1991; SCF 1998) e Kuiper-Goodman (1996), sugeriu o TDI de OTA em 1.2 a 5.7 ng/kg de peso diariamente. O JEFCA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) conduziu uma avaliação de risco detalhada sobre DON e

estabeleceu um nível máximo de ingestão diária provisional (PMTDI) de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso (WHO, 2001).

A Comissão Científica da Comunidade Européia, os Estados Unidos e o *Codex Alimentarius* estabelecem o limite máximo permitido de 0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFM_1 em alimentos infantis, enquanto que na Austrália e na Suíça o limite máximo permitido é 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para os mesmos produtos (Commission regulation (EC) 1881/2006; SADEGHI et al., 2009). Para OTA em alimentos destinados ao consumo infantil, a Comissão Científica da Comunidade Européia estabelece o limite de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Na Tabela 1.6 estão listados os limites máximos permitidos para micotoxinas em alimentos destinados ao consumo infantil segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2011), da União Européia (COMMISSION REGULATION (EC), 2006), Estados Unidos e China (FAO, 2003). A União Européia possui a legislação mais completa para alimentos infantis até o momento, incluindo AFB_1 , AFM_1 , OTA, DON, FBs, ZON e PTL. Em 2011, o Brasil estabeleceu limites para AFLs ($\text{B}_1 + \text{B}_2 + \text{G}_1 + \text{G}_2$), AFM_1 , OTA, DON, ZON e PTL em alimentos como fórmulas e alimentos infantis à base de leite e cereais. Os Estados Unidos não possuem regulamentação para micotoxinas especificamente em alimentos infantis até o momento. A China possui limites para AFB_1 e AFM_1 em alimentos infantis. Outros países (que não adotaram a legislação da União Européia) possuem legislação específica para micotoxinas em alimentos destinados ao consumo infantil como a Eslováquia e a República Tcheca (AFLs, AFB_1 , AFM_1 , OTA e PTL), Ucrânia (AFB_1 , AFM_1 , DON, ZON e PTL), entre outros (FAO, 2003).

Os níveis de micotoxinas encontrados em leite humano têm sido comparados aos níveis permitidos para alimentos infantis, como fórmulas e leites em pó, pois não há legislação específica para micotoxinas em leite humano.

Tabela 1.6 Limites máximos permitidos para micotoxinas em alimentos para o consumo infantil estabelecidos no Brasil, na União Européia, nos Estados Unidos e na China

Micotoxina	Alimento	LMT ^a ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		Brasil ^b	UE ^{c,d}	FDA ^e	China ^{e,f}
Aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2)	Fórmulas infantis	1	-	-	-
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	1	-	-	-
	Todos os alimentos, exceto	-	-	20	-

leite					
AFB ₁	Fórmulas infantis para lactentes e de seguimento	-	-	-	0,50
	Cereais processados e demais alimentos infantis	-	0,10	-	-
	Alimentos dietéticos infantis para necessidades especiais	-	0,10	-	0,50
	Fórmula infantil à base de soja e demais alimentos infantis	-	-	-	ND
AFM ₁	Leite em pó	5	-	-	-
	Fórmulas e leites infantis	-	0,025	-	0,50
	Alimentos dietéticos infantis para necessidades especiais	-	0,025	-	0,50
	Leite fluido	0,5		0,5	0,50
OTA	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	2	0,50	-	-
	Alimentos dietéticos infantis para necessidades especiais	-	0,50	-	-
DON	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	200	200	-	-
	Produtos à base de trigo para alimentação humana	-	-	1000	1000
ZON	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	20	20	-	-
FBs (FB ₁ + FB ₂)	Alimentos à base de milho para alimentação infantil	200	200	-	-
PTL	Suco e polpa de maçã	50	-	-	50
	Alimentos infantis	-	10	-	-

^alimite máximo de tolerância; ^bRDC n°07, de 18/02/2011; ^cUnião Européia; ^dCommission Regulation (EC) 1881/2006; ^eFAO 2003; ^fGain Report Number CH11031; AFB₁: aflatoxina B₁; AFM₁: aflatoxina M₁; OTA: ocratoxina A; DON: deoxinivalenol; ZON: zearalenona; FBs: fumonisinas; FB₁: fumonisina B₁; FB₂: fumonisina B₂; PTL: patulina; ND: não-detectável; (-): níveis não contemplados pela legislação. FONTE: do autor.

1.9 Métodos para a análise de micotoxinas

A grande maioria dos métodos analíticos utilizados para a determinação precisa, seletiva e sensível das micotoxinas em diversas matrizes pertencem ao grupo dos métodos de separação, especialmente da cromatografia (CIGIC; PROSEN, 2009). Uma delas, a cromatografia

líquida de alta performance (HPLC), com diferentes detectores, é frequentemente utilizada tanto para a análise de rotina quanto como método de rastreamento e de confirmação para novas técnicas (MAGAN; OLSEN, 2004). Para algumas micotoxinas, como os tricotecenos, a cromatografia gasosa (GC) é o método mais frequentemente utilizado (KOS et al., 2002). Exceto para métodos diretos por espectrometria de massas (MS), as demais metodologias utilizadas para determinação de micotoxinas são baseadas em imunoenensaio ou pertencem à categoria de métodos de rastreamento direto ou indireto, como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), TLC (*thin-layer chromatography*) e NIR (*near-infrared spectroscopy*) (TURNER et al., 2009).

Embora possua fatores limitantes importantes, como o alto custo e a demanda de profissionais altamente treinados, um dos grandes avanços na análise de micotoxinas tem sido a crescente utilização do MS como detector de escolha, sobretudo do espectrômetro de massa tandem (MS/MS) (BERTHILLER et al., 2007). O detector de fluorescência para HPLC ainda é muito popular devido à sua sensibilidade, seletividade, baixo custo e facilidade de uso, apesar de que a derivatização seja necessária para a maioria das micotoxinas. Outros detectores para HPLC também são utilizados, sobretudo o de ultravioleta (CIGIĆ; PROSEN, 2009).

Informações detalhadas sobre as metodologias empregadas para a análise de micotoxinas, principalmente sobre novas tecnologias desenvolvidas, estão disponíveis nas revisões de Turner et al. (2009), e de Cigić & Prosen (2009).

1.9.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Tendo em conta os riscos associados ao consumo de micotoxinas por crianças, a União Europeia estabeleceu um limite muito baixo para a presença de micotoxinas em alimentos infantis, o que tem gerado a necessidade de métodos analíticos sensíveis e específicos para a determinação de micotoxinas neste produtos (RUBERT et al., 2012).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) tem atingido o estado de referência e de método definitivo no campo da análise de micotoxinas, devido ao desenvolvimento de interfaces de ionização cada vez mais eficientes, do melhoramento da tecnologia dos analisadores de massa e de uma

considerável maior acessibilidade aos espectrômetros de massa tandem (CIGIĆ; PROSEN, 2009).

A cromatografia líquida (LC) é um dos vários métodos cromatográficos para a separação e a análise de misturas químicas, em que os compostos são separados ao se passar a mistura através de uma coluna que retém alguns compostos por mais tempo do que outros. A sua aplicabilidade quase universal, onde poucos compostos são excluídos da possibilidade de separação por LC, sua alta precisão ($\pm 0,5$ % ou melhor, em muitos casos) e a grande variedade de equipamentos, colunas e outros materiais comercialmente disponíveis têm ampliado o uso da técnica e permitido que a maioria dos laboratórios que lidam com a análise de misturas complexas adotem a LC como técnica de primeira escolha. Essas características tornam a LC excepcional em comparação às demais técnicas de separação (SNYDER et al., 2010).

A espectrometria de massas (MS) transforma moléculas em estado natural em íons no estado gasoso, e obtém a sua massa molecular (m) por meio da análise da razão massa-carga, indicada por m/z , onde m é a massa do composto e z a sua carga (PFLIEGER; FOREST; VINH, 2010). O espectrômetro de massa é o mais poderoso detector existente para cromatografia, pois o espectrômetro é sensível a baixas concentrações de analitos, fornece tanto informação qualitativa como quantitativa e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, 2011). Após a ionização, os íons gerados são em seguida separados de acordo com a sua razão massa-carga (m/z), e expostos a campos eletrostáticos (analisador de massa) e finalmente detectados. Uma etapa adicional de fragmentação de íons pode ser incluída antes da detecção para obter informação estrutural em uma técnica conhecida como espectrometria de massas tandem (MS/MS). O resultado da geração de íons, a separação, a fragmentação e a detecção é manifestada como um espectro de massa que pode ser utilizado para interpretar o peso molecular ou a informação estrutural. A singularidade deste processo permite que o método seja utilizado para a detecção e identificação de um composto desconhecido (SMITH; THAKUR, 2010).

1.9.2 Análise de micotoxinas em leite por LC-MS/MS

Embora a AFM₁ tenha sido a micotoxina de maior preocupação no que se refere ao leite, em produtos à base de leite e em seus derivados em virtude de sua elevada toxicidade e carcinogenicidade, outras

micotoxinas podem estar presentes na alimentação do gado leiteiro, especialmente nos cereais e silagens e transferidas para o leite como tricotecenos, zearalenona, ocratoxina A e fumonisinas (COFFEY et al., 2009). No entanto, a não ser no caso de AFM₁ onde o interesse global resultou em métodos analíticos padronizados internacionalmente, apenas poucos métodos cromatográficos, sobretudo métodos LC-MS/MS, têm sido publicados para a determinação de micotoxinas no leite (SORENSEN; ELBAEK, 2005). Além disso, métodos validados para análise de fórmulas infantis são escassos devido às dificuldades associadas à alta sensibilidade necessária para satisfazer a regulamentação rigorosa neste tipo de matriz (BELTRÁN et al., 2011).

A Tabela 1.7 apresenta métodos publicados para a análise de micotoxinas em leite, derivados e produtos à base de leite, como fórmulas infantis por LC-MS/MS. É possível observar que todos os métodos contemplam a análise de AFM₁ e alguns incluem OTA. A utilização de cartuchos C₁₈ ou colunas de imunoafinidade na etapa de limpeza é feita pela maioria dos métodos, podendo ser atribuída à complexidade do leite como matriz analítica. A ionização por electrospray (ESI) foi utilizada por todas as metodologias. Outro aspecto notável é o baixo limite de quantificação obtido, que varia de 0,001 a 0,03 ng/mL para AFM₁.

Tabela 1.7 Métodos analíticos desenvolvidos para micotoxinas em leite e derivados por LC-MS/MS reportados na literatura

Micotoxina	Matriz	Preparo da amostra		Cromatografia		FI	LOD (ng/kg)	LOQ (ng/kg)	Referência
		Extração	Limpeza	Coluna	Fase móvel				
AFM ₁ , OTA, T ₂ e HT ₂	Leite (fluido)	H ₂ O	SPE: Cartucho C ₁₈	C ₁₈ 100 × 2.1 mm, 1.7 μm	MeOH:H ₂ O com CH ₃ NO ₂ a 5 mM	ESI	AFM ₁ : 10 T ₂ : 50	AFM ₁ : 30 T ₂ : 170	Aguilera-Luiz et al., (2011)
AFM ₁ , OTA	Leite (fluido)	ACN	IAC: AflaOchra®	C ₁₈ 50 × 2.1 mm, 1.7 μm	H ₂ O:MeOH com 0.5 mM NH ₄ Ac e 0.1% HCOOH	ESI	AFM ₁ : 2	AFM ₁ : 7	Beltrán et al., (2011)
AFM ₁	Fórmula infantil Leite com cereais Leite (fluido)	Acetona	SPE: Carbograph-4	C ₁₈ 150 x 1 mm	H ₂ O:ACN com 2mmol/l de NH ₄ Ac	ESI	AFM ₁ : 1 OTA: 2	AFM ₁ : 3 OTA: 6	Cavaliere et al., (2006a)
AFM ₁ , OTA, DON, entre outras.	Leite (fluido)	ACN:hexano	SPE: Oasis HLB	C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μm	MeOH:H ₂ O com 0,020% AcOH	ESI	AFM ₁ : 10 OTA: 10 DON: 100	AFM ₁ : 20 OTA: 20 DON: 150	Sorensen; Elbaek, (2005)
AFM ₁	Leite (integral, fluido) Leite (desnatado, fluido) Leite (pó)	H ₂ O	IAC	C ₁₈ 150 × 2.1 mm, 3 μm	ACN:H ₂ O com 10mM de 4-metilmorfolina	ESI	0,59±0,19 0,66 ± 0,12	AFM ₁ : 1 ^a AFM ₁ : 0,94 ^b	Chen et al., (2005)
AFM ₁ , OTA, DON, entre outras	Queijo	ACN:H ₂ O:AcOH	NR	C ₁₈ 150 × 4.6 mm, 5 μm	MeOH: H ₂ O: AcOH com 5 mM de NH ₄ Ac	ESI	8.5 ± 0.50 AFM ₁ : 1,5* OTA: 1* DON: 20*	AFM ₁ : 9,6 ^a NI	Sulyok et al., (2007)
AFM ₁	Queijo	DCM (parmesão), Acetona (mussarela)	SPE: Carbograph-4	C ₁₈ 150 x 1 mm, 5 μm	ACN:H ₂ O com 2 mmol/l de NH ₄ Ac	ESI	NI	AFM ₁ : 15	Cavaliere et al., (2006b)
AFM ₁ , OTA, entre outras	Queijo	ACN:hexano	NR	C ₁₈ 100 x 2.1 mm, 3.5 μm	H ₂ O:ACN com 0,1% AcOH	ESI	AFM ₁ : 0,3* OTA: 0,3*	AFM ₁ : 0,6* OTA: 5*	Kokkonen et al., (2005)

AFM₁: aflatoxina M₁; OTA: ocratoxina A; DON: deoxinivalenol; ACN: acetoneitrila; MeOH: metanol; CH₃NO₂: formiato e amônio; NH₄Ac: acetato de amônio; NaOH: hidróxido de sódio; HCOOH: ácido fórmico; AcOH: ácido acético; DCM: diclorometano; IAC: coluna de imunoafinidade; ESI: electrospray ionization; FI: Fonte de ionização; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; LC-MS/MS: cromatografia líquida – detecção de massa tandem; ^avalores em ng/ml; ^bpedaço de 1 cm²; ^cmatrix solid phase dispersion; NR: não realizado; NI: não informado; *valores em ng/g. FONTE: Do autor.

1.10 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002). Segundo Ribani et al. (2004), existem diversas definições para o termo “validação”, que estão sob constante consideração pelas agências reguladoras. Entre os principais conceitos estão:

- “A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2003).
- A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (USP, 1999).
- “Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (WHO, 1992).

Existem diversos protocolos que estabelecem critérios de aceitação de desempenho analítico, entre eles a Resolução RE nº 899, da ANVISA (BRASIL, 2003) e a Commission Regulation (EC) No. 657/2002, da União Européia (EU, 2002).

Os parâmetros que devem ser avaliados durante um processo de validação de um método analítico geralmente incluem: seletividade, efeito matriz, curva de calibração (linearidade), precisão, exatidão, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), eficiência de extração (recuperação) e robustez.

1.10.1 Parâmetros analíticos para a validação de métodos

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A seletividade pode ser avaliada através da comparação de cromatogramas de amostras brancas e de amostras fortificadas com o analito em questão, sendo que outros compostos não devem eluir no tempo de retenção da substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

Alterações na resposta do instrumento (aumento/diminuição de sinal) podem ocorrer em função de interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz, caracterizando o efeito matriz. O efeito matriz pode exercer um impacto negativo sobre importantes parâmetros do método (LOQ, LOD, linearidade, exatidão e precisão), e por isso precisa ser avaliado durante o procedimento de validação (SMITH; THAKUR, 2010). A intensidade do efeito matriz, utilizando métodos LC-MS/MS pode ser avaliada de duas maneiras: através da adição pós-extração e da infusão pós-coluna. No modo de adição pós-extração, as respostas obtidas para as amostras cujos analitos de interesse foram adicionados pós-extração são comparadas com as soluções preparadas na fase móvel, sob as mesmas condições. A diferença de resposta entre a amostra pós-extração e a solução preparada em solvente, dividida pela resposta da solução em solvente determina o grau do efeito de matriz (CASSIANO et al., 2009). A avaliação do efeito matriz através da infusão pós-coluna é conduzida monitorando a resposta do instrumento à infusão constante do analito, após injetar um extrato branco da amostra no sistema LC-MS/MS. Qualquer componente endógeno da matriz que elui a partir da coluna e induz um efeito matriz pode ser visto como uma supressão ou aumento do sinal do analito infundido em regiões específicas do cromatograma (TRUFELLI et al., 2010). Uma das formas mais empregadas para se compensar o efeito matriz é a utilização de curvas de calibração na matriz (RIBANI et al., 2004).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes e que o coeficiente de correlação (r) obtido seja maior ou igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

A precisão e a exatidão determinam os erros de uma medida analítica e são os principais critérios usados para julgar a qualidade de um método analítico. A precisão deve ser avaliada através da repetibilidade (precisão intra-dia), da precisão intermediária (precisão inter-dias) e da reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). A repetibilidade (precisão intra-dia), define a precisão do método em repetir, em um curto intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições de análise (mesmo analista, dia e equipamento). A repetibilidade pode ser verificada por, no mínimo, 9 determinações,

contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações (baixa, média e alta) com 3 réplicas cada (BRASIL, 2003). A precisão intermediária define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, por diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos. Para a determinação da precisão intermediária é recomendado um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003). A reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) é utilizada para demonstrar a precisão entre laboratórios. Os resultados são obtidos utilizando o mesmo método e as mesmas amostras em diferentes laboratórios, analistas e equipamentos. A investigação da reprodutibilidade não é necessária quando a precisão intermediária foi previamente avaliada ou quando o método não será utilizado por diferentes laboratórios (CASSIANO et al., 2009). A ANVISA também não exige ensaios de reprodutibilidade para a concessão de registros (BRASIL, 2003).

O LOD é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído de fundo, sendo geralmente recomendado que o LOD seja no mínimo 3 vezes superior ao ruído da linha de base (CASSIANO et al., 2009). O LOQ é definido como a menor concentração do analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantitativamente determinada com valores aceitáveis de precisão e exatidão, sendo geralmente recomendado que o LOQ seja no mínimo 10 vezes superior ao ruído da linha de base (RIBANI et al., 2004).

A recuperação avalia a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas (CASSIANO et al., 2009). É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em

uma concentração próxima à média da faixa de uso do método (RIBANI et al., 2004).

Segundo a ANVISA, a avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, estas deverão ser adequadamente controladas ou precauções deverão ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003). Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Vários fatores podem ser avaliados, como pH, quantidade de aditivo de fase móvel, temperatura da coluna, diferentes colunas, fluxo de fase móvel, entre outros (CASSIANO et al., 2009).

Referências

ABDULRAZZAQ, Y. M.; OSMAN, N.; IBRAHIM, A. Fetal exposure to aflatoxins in United Arab Emirates. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 22, p. 3 – 9, 2002.

ABDULRAZZAQ, Y. M., OSMAN, N., YOUSIF, Z. M.; AL-FALAH, S. Aflatoxin M1 in breast milk of UAE women. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 23, p. 173–179, 2003.

ABDALLA, E. A. M. A.; ALY S. E.; NEAMAT-ALLAH, A. A. Human exposure to mycotoxins in Egypt. **Mycotoxin Research**, v.18, n.1, p. 23-30, 2002.

AGUILERA-LUIZ, M.M.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, p. 2863–75, 2011.

ALVITO, P. C.; SIZOO, E. A.; ALMEIDA, C. M. M.; EGMOND, H. P. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 1, p. 22–30, 2008.

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

BALLHAUSEN, D.; EGLI, D.; BICKLE-GRAZ, M.; BIANCHI, N.; BONAFÉ, L. Born at 27 weeks of gestation with classical PKU: challenges of dietetic management in a very preterm infant. **Pediatric reports**, v. 3, n. 4, p. 26, 2011.

BANDERA, E. V., CHANDRAN, U., BUCKLEY, B., LIN, Y., ISUKAPALLI, S., MARSHALL, I., KING, M., ET AL. Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New Jersey girls. **The Science of the Total Environment**, v. 409, n. 24, p. 5221-7, 2011.

BARKAI-GOLAN, R. Aspergillus mycotoxins. In: _____. **Mycotoxins in fruits and vegetables**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 408.

BARKAI-GOLAN, R., PASTER, N. (eds.). **Mycotoxins in Fruits and Vegetables**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 408.

BARREIRA, M. J.; ALVITO, P.; ALMEIDA, C. M. M. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 653–8, 2010.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p.175-177, jul./dez., 2002.

BAYDAR, T.; ERKEKOGLU, P.; SIPAHI, H.; SAHIN, G.; SAMPLES, I. Aflatoxin B₁, M₁ and Ochratoxin A Levels in infant formulae and baby foods marketed in Ankara, Turkey. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, n. 1, p. 89–92, 2007.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; CORTÉS, M. Á.; YUSÀ, V.; HERNÁNDEZ, F. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M₁ and ochratoxin A in baby food and milk. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 737–44, 2011.

BERTHILLER, F.; SULLYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 33–37, 2007.

BHATIA, J.; GREER, F. Use of soy protein-based formulas in infant feeding. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, p. 1062–8, 2008.

BIASUCCI, G.; CALABRESE, G.; DI GIUSEPPE, R.; CARRARA, G.; COLOMBO, F.; MANDELLI, B.; MAJ, M.; BERTUZZI, T.; PIETRI, A.; ROSSI, F. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. **European Journal of Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 211-218, 2011.

BORCHERS, A.; TEUBER, S. S.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Food Safety. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 39, p. 95–141, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun, 2003.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 2051/GM, de 08/11/2001. Novos Critérios da Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes e Crianças de Primeira Infância, Bicos, Chupetas e Mamadeiras. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 215, p.44, 09 nov. 2001, Seção 1.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N°7, de 18/02/2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International journal of food microbiology**, v. 119, p. 140-6, 2007.

CARRATÙ, B; BONIGLIA, C; SCALISEA, F; AMBRUZZI A. M.; SANZINI, E. Nitrogenous components of human milk: non-protein

nitrogen, true protein and free amino acids. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 357-362, 2003.

CAS. **Chemical Abstracts Service**. Physico-chemical characteristics of aflatoxin M₁. Disponível em: <www.cas.chemservice.com>. Acesso em: 22 mar 2012.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CAST. **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Task Force Report no. 139. Council for Agricultural Science and Technology: Ames, 2003. 191 p.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M₁ in cow milk: comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. **Journal of chromatography A**, v. 1101, p. 69–78, 2006a.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MARZIONI, F.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Aflatoxin M₁ determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1135, n. 2, p. 135–41, 2006b.

CHEN, C. Y.; LI, W. J.; PENG, K. Y. Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 8474-8480, 2005.

CIGIĆ, I. K.; PROSEN, H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, p. 62-115, 2009.

COFFEY, R.; CUMMINS, E.; WARD, S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. **Food Control**, v. 20, p. 239–249, 2009.

COMMISSION REGULATION (EC) n° 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**. pp. L364/5-L364/24. Disponível em: <eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20110520:EN:PDF> Acesso em: 02 abr. 2013.

COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T.; PEREIRA, J. L.; LEMES, D. P.; NAKANO, F.; TANIWAKI, M. H. Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. **Food Control**, v.26, n. 1, p.36-41, 2012.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effect of mycotoxins in Europe. **Toxicology letters**, v. 127, p. 19-27, 2002.

DÄNICKE, S., BRÜSSOW, K.-P., GOYARTS, T., VALENTA, H., UEBERSCHÄR, K.-H., TIEMANN, U. On the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1565-74, 2007.

D'ARCO, G.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; FONT, G.; DAMIANI, P.; MAÑES, J. Analysis of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1209, p. 188–94, 2008.

DA SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A.; QUINTAL, V. S.; IBIDI, S. M.; ALBUQUERQUE, E. M. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1535-538, 2007.

DOSTAL, A.; JAKUSOVA, L.; CAJDOVA, J.; HUDECKOVA, H. Results of the first studies of occurrence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. **Bratisl Lek Listy**, v. 109, n. 6, p. 276-278, 2008.

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

EGOUNLETY, M. Production of legume-fortified weaning foods. **Food Research International**, v.35, p. 233–7, 2002.

EL-TRAS, W. F.; EL-KADY, N. N.; TAYEL, A. A. Infants exposure to aflatoxin M₁ as a novel foodborne zoonosis. **Food and chemical toxicology**, v. 49 , n. 11, p. 2816–9, 2011.

ETZEL, R. A. What the Primary Care Pediatrician Should Know about Syndromes Associated with Exposures to Mycotoxins. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, p. 282-305, set. 2006.

EU. Commission Decision 2002/657/EC of August 12th 2002, concerning the performance of analytical methods and the interpretation of the results. **Official Journal of the European Communities**, L221–L232, 2002.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>>. Acesso em 26 mar 2012.

FIOCRUZ. **Normas técnicas RedeBLH-BR para bancos de leite humano: Pasteurização de Leite Humano Ordenhado- BLH- IFF/NT- 34.05**. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/redeblh/media/pasteuriza.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa, 2007. 48 p.

FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. DE; VIEIRA, A. P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região Sul do Rio Grande do Sul / Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in foods of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, .n 2, p. 105-111, 1999.

GAIN REPORT NUMBER CH11031. **Maximum Levels of Mycotoxins in Foods** (2011). Disponível em: <

http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Maximum%20Levels%20of%20Mycotoxins%20in%20Foods_Beijing_China%20-%20Peoples%20Republic%20of_5-25-2011.pdf . Acesso em: 22 mar 2012.

GAREIS, M.; MÄRTLBAUER, E.; BAUER, J.; GEDEK, B. Bestimmung von Ochratoxin A in Muttermilch. **Zeit für Lebens untersuch und Forsch**, v. 186, p. 114 – 7, 1988.

GALVANO, F.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; GAGLIARDI, L.; CIOTTI, S.; LUISI, S.; BOGNANNO, N.; LA FAUCI, L.; IACOPINO, A. M.; NIGRO, F.; LI VOLTI, G.; VANELLA, L.; GIAMMANCO, G.; TINA, G. L.; GAZZOLO, D. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 496 – 501, 2008.

GUAN, D.; LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, D.; JIANG, J. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M₁ in milk and infant milk products. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1359–64, 2011.

GÜRBAY, A.; GIRGIN, G.; SABUNCUOĞLU, S. A.; SAHIN, G.; YURDAKÖK, M.; YİĞİT, S.; GÜLSEVIN, T. Ochratoxin A: Is it present in human breast milk samples obtained mothers from Ankara, Turkey. **Toxicology Letters**, v. 189, n. 1, (S232), 2009.

GÜRBAY, A.; SABUNCUOĞLU, S. A.; GIRGIN, G. SAHIN, G.; YİĞİT, S.; YURDAKÖK, M.; TEKINALP, G. Exposure of newborns to aflatoxin M₁ and B₁ from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 314-9, 2010.

HARRIS, D. C. Princípios de cromatografia e espectrometria de massa. In: _____. **Explorando a química analítica**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

HASSAN, A. M.; SHEASHAA, H. A.; FATAH, M. F. A.; IBRAHIM, A. Z.; GABER, O. A. Does aflatoxin as an environmental mycotoxin adversely affect the renal and hepatic functions of Egyptian lactating mothers and their infants? A preliminary report. **International urology and nephrology**, v. 38, n. 2, p. 339-42, 2006a.

HASSAN, A. M.; SHEASHAA, H. A.; FATTAH, M. F. A.; IBRAHIM, A. Z.; GABER, O. A.; SOBH, M. A. Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants. **Pediatric Nephrology**, v. 21, p. 102–105, 2006b.

HENDRICKSE, R. G. Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 91, n. 7, p. 787–93, 1997.

HOLZAPFEL, C. W.; STEYN, P.S.; PURCHASE, H. S. Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂. **Tetrahedron Letters**, v.25, p.2799-2803, 1966.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Aflatoxins. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 56, p. 245–395, 1993.

_____. Some traditional herbal medicines: Some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 82, p. 1–556, 2002.

INNIS, S.M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of Pediatrics**, v. 143, p. S1-8, 2003.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JONKER, J.W.; MERINO, G.; MUSTERS, S.; VAN HERWAARDEN, E.; BOLSCHER, E.; WAGENAAR, E.; MESSMA, E.; DALE, T.C.; SCHINKEL, A.H. The breast cancer resistance protein BCRP (ABC G2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. **Nature Medicine**, v. 11, n. 127-129, 2005.

JONSYN, F. Intake of Aflatoxins and Ochratoxins by infants in Sierra Leone: possible effects on the general health of these children. **Journal of Nutrition and Environmental Medicine**, v. 9, p. 15-22, 1999.

KABAK, B. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: occurrence and safety evaluation. **Food Control**, v. 26, n. 1, p. 182-7, 2012.

KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; RIZZO, A. Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 5, p. 449-56, 2005.

KOS, G.; LOHNINGER, H.; KRŠKA, R. Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. **Vibr Spectrosc**, v. 29, p. 115–119, 2002.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment of ochratoxin A: An update. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 53–57, 1996.

LANDRIGAN, P. J.; SONAWANE, B.; MATTISON, D.; McCALLY, M.; GARG, A. Chemical Contaminants in Breast Milk and Their Impacts on Children's Health: An Overview. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 6, p. A313-A315, 2002.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in Food**: detection and control. Boca Raton: Woodhead Publishing, 2004, 471p.

MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L.; AREFHOSSEINI, S. R.; JABBARI, M. V. Determination of Aflatoxin M₁ in Breast Milk Samples in Tabriz–Iran. **Maternal and Child Health Journal**, v. 14, p. 141–145, 2010.

MAHNINE, N.; MECA, G.; ELABIDI, A.; FEKHAOUI, M.; SAOIABI, A.; FONT, G. Further data on the levels of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A₁, B, B₁), beauvericin and fusaproliferin in breakfast and infant cereals from Morocco. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 481–5, 2011.

MARÍN, S.; MATEO, E. M.; SANCHIS, V.; VALLE-ALGARRA, F. M.; RAMOS, A. J.; JIMÉNEZ, M. Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 563–8, 2011.

MASSART, F.; MEUCCI, V.; SAGGESE, G.; SOLDANI, G. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. **The Journal of Pediatrics**, v. 152, n. 5, p. 690–5, 2008.

MEUCCI, V.; PRETTI, C.; LASCHI, S.; MINUNNI, M.; INTORRE, L.; SOLDANI, G. Mycotoxins occurrence in Italian formula milks. **Toxicology Letters**, v. 180, p. S191–S192, 2008.

MEUCCI, V.; SOLDANI, G.; RAZZUOLI, E.; SAGGESE, G.; MASSART, F. Mycoestrogen pollution of Italian infant food. **The Journal of Pediatrics**, v. 159, n. 2, p. 278–83, 2011.

MCQUEEN, C. A. **Comprehensive toxicology**. 2ed. Elsevier, 2010. 7482p.

MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, É., KAWAMURA, O., HIROOKA, Y. E., ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State , Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 220–226, 2009.

MUÑOZ, K.; CAMPOS, V.; BLASZKEWICZ, M.; VEGA, M.; ALVAREZ, A.; NEIRA, J.; DEGEN, G. H. Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. **Mycotoxin Research**, v. 26, n. 2, p. 59–67, 2010.

MURILLO-ARBIZU, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; AMÉZQUETA, S. Comparison between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for the study of the occurrence of patulin in apple juice intended for infants. **Food and chemical toxicology**, v. 48, p. 2429–34, 2010.

NAVAS, S. A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 5, p. 457–62, 2005.

NETO, M. T. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. **Acta Pediatr Port**, v. 1, n. 37, p. 23-6, 2006.

NEVILLE, M. C.; ANDERSON, S. M.; MCMANAMAN, J. L.; BADGER, T.M.; BUNIK, M.; CONTRACTOR, N.; et al. Lactation and neonatal nutrition: defining and refining the critical questions. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 17, n. 2, p. 167–88, 2012.

NIELSEN, J. K. S., VIKSTRÖM, A. C., TURNER, P., KNUDSEN, L. E. Deoxynivalenol transport across the human placental barrier. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2046-52, 2011.

NNT, The Nordic Working Group on Food Toxicology and Risk Evaluation. **Health evaluation of ochratoxin A in food products**. Nordiske Seminar og Arbejdsrapporter 545. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark, 1991.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; SANTOS, M. J. S.; WANKE, B. Contaminação do leite humano ordenhado por fungos miceliais. **J Pediatr (Rio J)**, v. 78, n. 3, p. 197-201, 2002.

NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p.190-94, 2003.

OVEISI, M.R.; JANNAT, B.; SADEGHI, N.; HAJIMAHMOODI, M.; NIKZAD, A. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1216–8, 2007.

PATIN, R. V.; VÍTOLO, M. R.; VALVERDE, M. A.; CARVALHO, P. O.; PASTORE, G. M.; LOPEZ, F. A. The influence of sardine consumption on the omega-3 fatty acid content of mature human milk. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n.1, 2006.

PFIEGLER, D.; FOREST, E.; VINH, J. Mass spectrometry. In: BOISSEAU et al (eds.). **Nanoscience**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 595-638.

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

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British medical bulletin**, v. 56, n.1, p.184-92, 2000.

POLYCHRONAKI, N., WEST, R. M., TURNER, P. C., AMRA, H., ABDEL-WAHHAB, M., MYKKÄNEN, H.; EL-NEZAMI, H. A longitudinal assessment of aflatoxin M₁ excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 7, p. 1210-5, 2007.

POLYCHRONAKI, N.; TURNER, P. C.; MYKKÄNEN, H.; GONG, Y.; AMRA, H.; ABDEL-WAHHAB, M. Determinants of aflatoxin M₁ in breast milk in a selected group of Egyptian mothers. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 7, p. 700–8, 2006.

PROUILLAC, C., VIDEMANN, B., MAZALLON, M., LECOEUR, S. Induction of cells differentiation and ABC transporters expression by a myco-estrogen, zearalenone, in human choriocarcinoma cell line (BeWo). **Toxicology**, v. 263, p. 100-7, 2009.

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

RASTOGI, S. Detection of Aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. **Food Control**, v. 15, n. 4, p. 287–90, 2004.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses: an overview. **International journal of food microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 176–83, 2012.

SADEGHI, N., OVEISI, M., JANNAT, B., HAJIMAHMOODI, M., BONYANI, H., JANNAT, F. Incidence of aflatoxin M1 in human breast milk in Tehran, Iran. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 75-78, 2009.

SCUSSEL, V.M, GALVÃO, S. Contaminação de maçãs e seus derivados por agrotóxicos e micotoxinas. In: Stadnik MJ, (ed.). **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis: CCA-UFSC; 2009. p. 191-218.

SCUSSEL, V. M.; DA ROCHA, M. W.; LORINI, I.; SABINO, M.; ROSA, C. A. DA R.; CARVAJAL, M. M. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos II**. Florianópolis: Imprensa Universitária, 2008, 586 p.

SCUSSEL, V. M. ; SCAFF, R. . Fumonisin B₁ and B₂ in Corn-based Products Commercialized in the State of Santa Catarina - Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 911-919, 2004.

SHERIF, S. O.; SALAMA, E. E.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 212, n. 4, p. 347-68, 2009.

SHIER, W.T.; SHIER, A. C.; XIE, W. MIROCHA, C. J. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1435–8, 2001.

SHOUMAN, B. O.; EL MORSI, D.; SHABAAN, S.; ABDEL-HAMID, A.-H.; MEHRIM, A. Aflatoxin B1 Level in Relation to Child's Feeding and Growth. **Indian journal of pediatrics**, v. 79, n. 1, p. 56-61, 2012.

SILVA, M. H. L.; SILVA, M. T. C.; BRANDÃO, S. C. C.; GOMES, J. C.; PETERNELLI, L. A.; FRANCESCHINI, S. C. C.; Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women. **Food Chemistry**, v. 93, p. 297-303, 2005.

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

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. New Jersey: Wiley, 2010. 912 p.

SMITH, J. S.; THAKUR, R. A. Mass spectrometry. In: NIELSEN, S. S. **Food Analysis**. New York: Springer, 2010. p. 457-470.

SØRENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, v. 820, n. 2, p. 183-96, 2005.

SKAUG, M. A.; HELLAND, I.; SOLVOLL, K; SAUGSTAD, O. D. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 4, p. 321-327, 2001.

SKAUG, M. A.; STØRMER, F. C.; SAUGSTAD, O. D. Ochratoxin A: a naturally occurring mycotoxin found in human milk samples from Norway. **Acta Pædiatrica**, v. 87, p. 1275-8, 1998.

SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 5, p. 1505-23, 2007.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPIELLO, A. Na overview o matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 491-509, 2011.

TURCONI, G.; GUARCELLO, M.; LIVIERI, C.; COMIZZOLI, S.; MACCARINI, L.; CASTELLAZZI, A. M.; PIETRI, A.; PIVA, G.; ROGGI, C. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn: an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 4, p. 191-197, 2004.

TURNER, P. C.; COLLINSON, A. C.; CHEUNG, Y. B.; GONG, Y.; HALL, A. J.; PRENTICE, A. M.; WILD, C. P. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. **International Journal of Epidemiology**, v. 36, n. 5, p. 1119-25, 2007.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168-180, 2009.

ULASZEWSKA, M. M., ZUCCATO, E., CAPRI, E., IOVINE, R., COLOMBO, A., ROTELLA, G., GENEROSO, C.; GRASSI, P.; MELIS, M.; FANELLI, R.. The effect of waste combustion on the occurrence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk in Italy. **Chemosphere**, v. 82, n. 1, p. 1-8, 2011.

USP. United States Pharmacopeia Convention. US Pharmacopeia 24. **Validation of Compendial Methods**. Rockville, 1999.

VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p.147-157, 2007.

VAN HERWAARDEN, A. E.; SCHINKEL, A. H. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. **Trends in pharmacological sciences**, v.27, n. 1, p.10-6, 2006.

YUHAS, R; PRAMUK, K; LIEN, E. L. Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. **Lipids**, v. 41, n. 9, p. 851-8, 2006.

WALSH, C.T.; NEVILLE, M. C. Effects of xenobiotics in milk excretion and composition. **Rev Literat Arts of Am**, v. 5, p. 418-41, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Biomonitoring of human milk**. Geneva, World Health Organization, 2009b. Disponível

em: <<http://www.who.int/foodsafety/chem/POPtechnicalnote.pdf>>
Acesso em: 13 jan. 2013.

_____. **10 facts on breastfeeding**. Genebra, World Health Organization, 2009a. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/breastfeeding/en/>>. Acesso em 30 ago. 2011.

_____. **Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations**. Thirty-second report, WHO Technical Report Series, n.823, Geneva, 1992.

_____. **Facts for life**. 4. ed, 2010. Disponível em: www.factsforlifeglobal.org. Acesso em 04 jan 2013.

_____. **Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life**. Genebra, World Health Organization, 2002. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/9241562110.pdf>>. Acesso em: 13 fev 2012.

_____. **WHO food additives series 47**. Presented at the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO Food Nutr. Pap. 74.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogen**, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2010.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p.129-144, 2011.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. **Journal of chromatography B**, v. 666, p. 85 – 99, 1995.

ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J. B.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A. Human milk glycomiome and its impact on the infant gastrointestinal

microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, Suppl 1, p. 4653-8, 2011.

Capítulo 2

LC-MS/MS multi-mycotoxin analysis of human milk and dietary intake of Brazilian nursing mothers

LC-MS/MS multi-mycotoxin analysis of human milk and dietary intake of Brazilian nursing mothers

Abstract

The aim of this study was to investigate the occurrence of aflatoxin M₁ (AFM₁), ochratoxin A (OTA) and deoxynivalenol (DON) in banked human milk samples and evaluate the relationship between dietary intake of lactating donors with the occurrence of mycotoxins in their milk. Eighty-six nursing mothers were interviewed about their dietary habits through a Food Frequency Questionnaire (FFQ) and a sample of human milk was obtained from each participant. The occurrence of AFM₁, OTA and DON in human milk was evaluated by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The study revealed a high intake of foods susceptible to mycotoxin contamination by the participants. Habitual consumption of wheat flour and its derivatives, bovine milk and coffee was reported by 71, 50 and 43% of the participants, respectively. Although a high consumption of susceptible foods has been reported, AFM₁, OTA and DON were not detected in any sample of human milk. However, results obtained by LC-MS/MS suggest the possible occurrence of DON in four samples. The results indicate that AFM₁, OTA and DON in human milk does not appear to be a health risk for the infants of this particular region. However, the results showed that DON may be present in low concentrations in human milk.

Keywords: human milk, mycotoxins, dietary habits, food safety, LC-MS/MS.

1. Introduction

The early years of life are critical to child development, where the physiological and immune strengthening occur, alongside with important changes in motor and cognitive functions (HETHERINGTON et al., 2012). During the last decades, the World Health Organization has promoted exclusive breastfeeding until six months of a child's life as the ideal form of infant feeding during this period of life (WHO, 2001). Breastfeeding confers many benefits to the developing child, such as the immune function improvement (ODDY et al., 2011) and for the mother, such as faster return to pre-pregnancy weight and decreased risk of some types of cancer (ØSTBYE, et al., 2010), compared with infant formula feeding. Breastfeeding provides protection against childhood obesity (ARENZ & von KRIES, 2009) and can improve the ability of children's self-regulation of energy intake (HEINIG et al., 1993, LI et al., 2010). Also, breastfed babies are more likely to experience and accept new foods than formula-fed babies, due to early exposure to food flavor via breast milk (SULLIVAN & BIRCH, 1994; HAUSNER et al., 2008; HAUSNER et al., 2010).

While the benefits of breastfeeding are well established, human milk may contain trace amounts of various contaminants due to maternal exposure through food (LANDRIGAN et al., 2002; MEAD, 2008). Mycotoxins are secondary metabolites of the metabolism of some fungi, especially of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* and their occurrence in foods is very common worldwide, especially in grains, oilseeds and dairy, considered excellent substrates for fungal proliferation (CAST, 2003).

Mycotoxins are easily absorbed by the intestine and can cause acute and chronic toxicity (RAI & VARMA, 2010). The chronic effects results from moderate ingestion of mycotoxins for an extended period of time (van EGMOND, 2007). Some mycotoxins have mutagenic and carcinogenic properties, being the aflatoxins the most potent (McQUEEN, 2010). Among all mycotoxins, aflatoxins, including aflatoxin M₁ (AFM₁), and ochratoxin A (OTA) are the most toxic and widely distributed in food and were classified by IARC as a carcinogen (group 1) and a possibly carcinogen (group 2B) to humans, respectively (IARC, 2002). Deoxynivalenol (DON) has no carcinogenic properties, however, its main toxic effects include growth disorders due to anorexia and dysregulation of the immune and reproductive system (PESTKA, 2010).

Various studies on the occurrence of mycotoxins in human milk have been held to just the last two decades to monitor children's exposure, as can be observed in our previous review on mycotoxins in human milk (TONON et al., 2013). The major mycotoxins investigated are aflatoxins, especially AFM₁, and ochratoxin A. Some studies have reported contamination of human milk high enough to cause ingestion of mycotoxins above the tolerated levels established by international organizations in food safety, as the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) (TURCONI et al. 2004; MUÑOZ et al., 2010).

The aim of this study was to investigate the occurrence of aflatoxin M₁ (AFM₁), ochratoxin A (OTA) and deoxynivalenol (DON) in banked human milk samples and evaluate the relationship between dietary habits of lactating donors of the Human Milk Bank of Blumenau, Brazil, and the occurrence of mycotoxins in their milk.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

2.1.1 Subjects and Samples

During February to August 2012, a total of eighty-six lactating donors of the Human Milk Bank of Blumenau (HMBB), from Blumenau (Brazil), participated in the study through interviews of food intake and supplied a sample of breast milk. The HMBB attends lactating women from the fourteen cities located in the Itajai Medium Valley microregion, in Santa Catarina State (Brazil).

A total of 86 breast milk samples (10 - 20 mL) were obtained from the donated flasks collected by HMBB and stored into sterile plastic container. The samples were kept under freezing until the time of analysis.

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Blumenau. All participants were informed about the content of this study and when agreed to participate, an informed written consent was signed by both parties before inclusion in the study.

2.1.2 Food Frequency Questionnaire

The intake of dietary sources of AFM₁, OTA and DON by the lactating donors was determined through the application of a food frequency questionnaire (FFQ) previously validated by Ribeiro et al. (2006), developed for the Brazilian adult population, with minor modifications (APÊNDICE A). The FFQ was structured with different food groups considered most prone to contamination by AFM₁, OTA and DON, according to Galvano et al., 2008. The foods were focused in cereal products (rice, corn, pasta, breakfast cereals, breads and bakery products), meat and meat products (beef, pork, poultry and liver pâté), dairy (cow milk, cream, cheese, yogurt, butter, ice cream and chocolate), nuts (peanuts, Brazil nuts, nuts and vegetable oils) and beverages (coffee, tea, fruit juice, beer, wine and soda). The interviews were conducted by trained personnel, able to carry out dietary anamnesis in this study population.

2.1.3 Chemicals

Acetonitrile, methanol and *n*-hexane, both HPLC grade, were obtained from J. T. Baker (Xalostoc, Mexico). Ammonium formate, analytical grade, was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Ultrapure water was obtained from a purification system Milli-Q water (Millipore, Bedford, USA).

2.1.4 Mycotoxin standards

Pure standards of aflatoxin M₁ (AFM₁) powder, ochratoxin A (OTA) and deoxynivalenol (DON), both in acetonitrile solution, were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.1.5 Equipment

For the sample preparation were used a Reax_{top} model vortex, from Heidolph (Schwabach, Germany), centrifuges Z323 model, from HermLe-Labortechnik (Wehingen, Germany) and 5424 model, from Eppendorf (Hamburg, Germany), balance model XP2003S Delta Range® from Mettler-Toledo (Greifensee, Switzerland), vacuum manifold model Vac Elut SPS 24 from Agilent (Santa Clara, USA) connected to a vacuum pump with controller, model V-855 from Büchi (Flawil, Switzerland). For the evaporation of the extract was used an

evaporator comprising water bath and nitrogen flow, model Turbo Vap® LV from Biotage (Uppsala, Sweden).

The LC-MS/MS analyzes were performed on a liquid chromatography system Agilent 1290 Infinity series, from Agilent Technologies (Palo Alto, USA) coupled to a mass spectrometer QTRAP® 5500 from AB Sciex (Foster City, USA) equipped with a Turbo IonSpray® electrospray ionisation (ESI) interface. Separation of the analytes was performed using an Acquity UPLC BEH C₁₈® column (1.7 mm in particle size and dimensions of 2.1 x 100 mm), from Waters (Milford, USA). The Analyst® 1.6.1 software (AB Sciex) was used for the control of system components and to obtain and analyze data.

2.1.6 Others

Sep-Pak Plus C₁₈ cartridges (360 mg, 55-105 µm) for solid phase extraction (SPE) were purchased from Waters (Milford, USA).

2.2 Methods

2.2.1 Mycotoxin standard solution preparation

Stock standard solutions of each mycotoxin were prepared in acetonitrile. A working mix solution was prepared from each stock standard solution in 20% methanol containing the three mycotoxins, at the following concentrations: 5 ng/mL of AFM1, 100 ng/mL of OTA and 2000 ng/mL of DON. Standards tuning solutions (100 ng/mL) were prepared from the stock standard solutions in 50% methanol with ammonium formate 10 mM for optimisation of the ionisation parameters setting through infusion pump.

2.2.2 MS/MS parameters optimisation for the mycotoxins

The standards tuning solutions were injected individually directly into the MS/MS spectrometer with ESI interface, using an infusion pump (at flow rate of 10 µl/min), and the declustering potential (DP), collision energy (CE), entrance potential of the collision cell (CEP) and exit potential of the collision cell (CXP) were optimized for each compound and recorded.

MS/MS operated in positive mode ($[M+H]^+$) for the three mycotoxins. The source conditions for the analysis were as follows:

curtain gas, 15.0; ion spray voltage, 5000 V; GS1 and GS2, 45 and 50 psi, respectively; probe temperature of 600 °C. The entrance potential (EP) was set at 10V for all analytes. The MS was operated in MRM (multiple reaction monitoring). Table 2.1 shows the optimized MS/MS parameters for AFM₁, OTA and DON.

Table 2.1 Optimised MS/MS parameters for AFM₁, OTA and DON

Mycotoxin	Ionisation mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	DP (V)	Product ion (<i>m/z</i>)	CE (V)	CXP (V)
AFM ₁	ESI+	329.0 [M+H] ⁺	146	273.1 (<i>Q</i>)	29	28
				229.0 (<i>q</i>)	59	22
OTA	ESI+	404.2 [M+H] ⁺	61	238.9 (<i>Q</i>)	35	24
				358.1 (<i>q</i>)	21	38
DON	ESI+	297.1 [M+H] ⁺	66	249.1 (<i>Q</i>)	17	22
				231.1 (<i>q</i>)	19	22

AFM₁: aflatoxin M₁; OTA: ochratoxin A; DON: deoxynivalenol; *m/z*: mass to charge ratio; DP: declustering potential; *Q*: quantification transition; *q*: confirmation transition; CE: collision energy; CXP: exit potential of the collision cell

2.2.3 LC parameters' settings for the mycotoxins

The LC was connected to the MS/MS spectrometer, and the working standard mix solutions, previously prepared, were injected. The volume of injections was 5 µl. Toxins separation was carried out through a C₁₈ column at 40 ± 0.1°C. Mobile phases A and B were composed of 10 and 90% methanol, respectively, both with ammonium formate 15 mM. The flow rate was set in 180 µl/min. The gradient started with 85% of mobile phase A and over the first 8.75 minutes of run, the proportion of mobile phase A dropped to 20% and remained so for the next 2 minutes. In 12.6 minutes of running, the gradient of mobile phase B rose to 100% and was maintained until the end of the run (15 min of total run time). Prior to each injection, a stabilisation step were carried out through a gradient of 87.5% mobile phase A for 3 minutes. The dwell time was set at 150 milliseconds for all analytes. Retention time for DON, AFM₁ and OTA was 3.66; 8.00 and 10.88 minutes, respectively.

2.2.4 Analytical procedure

The extraction of AFM₁, OTA and DON were conducted according to the procedure of Aguilera-Luiz et al. (2011), developed for the detection of mycotoxins and pesticides in bovine milk by LC-MS/MS, with minor modifications.

The procedure initiated by diluting 10 mL of human milk in 10 mL of Milli-Q water in a 50 mL Falcon tube. The sample was then homogenized by vortexing and centrifuged for 10 minutes at 7000 rpm. The aqueous supernatant was then loaded on a C₁₈ cartridge previously conditioned with 5 mL methanol and 5 mL of Milli-Q water. After passing the sample, the cartridge was washed with 5 mL of Milli-Q water and 5 mL of *n*-hexane and vacuum dried for 15 seconds. The analytes were eluted with 5 mL of methanol. The eluate was evaporated in a water bath (40 °C) under gentle N₂ stream and the residue was reconstituted in 500 µl of 20% methanol, prior to LC-MS/MS analysis. Quantification was performed by matrix-matched standard calibration.

2.2.5 Method validation

The validation tests were performed in bovine fluid milk due to the scarcity and poor access to human milk for the validation tests. The following parameters were evaluated in order to verify the method reliability: matrix effect, linearity (R^2), recovery, repeatability, intermediate precision, selectivity, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ).

The matrix effect was determined using the post-column infusion method, where a solution containing the three mycotoxins of interest at a concentration of 0.025 ng/mL of AFM₁, 0.5 ng/mL of OTA and 10 ng / mL of DON was infused directly into MS, while a blank sample of bovine milk was injected into the LC.

The linearity of the method was evaluated using matrix-matched standard calibration by analyzing spiked blank samples at 5 concentrations in triplicate, covering levels from 0 to 0.05 ng/mL for AFM₁, 0 to 1.0 ng/mL for OTA and 0 to 20 ng/mL for DON. Recovery and repeatability assays were conducted in four fortification levels (AFM₁: 0.0125, 0.025, 0.0375 and 0.05 ng/mL; OTA: 0.25, 0.5, 0.75 and 1 ng and DON mL: 5, 10, 15 and 20 ng/mL) in quadruplicate. Intermediate precision was evaluated using bovine milk spiked samples at a concentration of 0.025, 0.5 and 10 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively, in three different days.

The selectivity of the method was evaluated by analyzing a blank and a spiked bovine milk sample at the levels of 0.025, 0.5 and 10 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively. Finally, the LOD and LOQ were calculated by analyzing spiked samples in the following concentrations: 0.00625 and 0.0125 ng / mL to AFM₁, 0.125, and 0.25 ng/mL for OTA 2.5 and 5 ng/mL for DON. The LOD and LOQ were determined as the lowest concentration of analytes yielding a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10 respectively.

3. Results

3.1 Maternal dietary intake

The intake of dietary sources of AFM₁, OTA and DON by the human milk donors was investigated by using a food frequency questionnaire (FFQ), composed by various food groups. Based on the results of the FFQ, the study population was grouped according to the frequency of consumption at low (zero to four times per week), moderate (between five and seven times a week) and habitual (more than seven times week) of foods regarded as potential sources of AFM₁, OTA and DON, as performed by Galvano et al., 2008. Table 2.2 presents the frequency of consumption of certain foods by the eighty-six nursing mothers who participated of the study.

Table 2.2 Frequency distribution of food intake by the studied population (*n*= 86)

Food/ Food Group	Frequency of consumption (%)		
	Low (0 – 4x/ week)	Moderate (5 – 7x/ week)	Habitual (> 7x/ week)
Rice	30 (34.8)	50 (58.1)	6 (6.97)
Maize and derivatives	82 (95.3)	3 (3.5)	1 (1.2)
Wheat flour and derivatives	5 (5.8)	19 (22.1)	62 (72.1)
Breakfast cereals	77 (89.5)	8 (9.3)	1 (1.2)
Oilseeds	74 (86.0)	10 (11.6)	2 (2.3)
Vegetable oils	9 (10.5)	67 (77.9)	10 (11.6)
Bovine meat	80 (93)	6 (6.97)	nr
Eggs and poultry	77 (89.5)	9 (10.5)	nr
Pork	86 (100)	nr	nr
Fish	85 (98.8)	1 (1.2)	nr

Cured meat	65 (75.6)	16 (18.6)	5 (5.81)
Liver pâté	84 (97.7)	2 (2.3)	nr
Bovine milk	21 (24.4)	21 (24.4)	44(51.2)
Dairy products	25 (29.0)	39 (45.3)	22 (25.6)
Coffee	27 (31.4)	21 (24.4)	38 (44.2)
Tea	48 (55.8)	19 (22.1)	19 (22.1)
Juices	50 (58.1)	24(27.9)	12 (13.9)
Beer	86 (100)	nr	nr
Wine	85 (98.8)	1 (1.11)	nr
Soda	83 (96.5)	3 (3.50)	nr

Percentages given in brackets; nr: not reported

3.2 Method validation

3.2.1 Matrix effect and linearity (R^2)

Figure 2.1 shows the chromatograms obtained in the evaluation of the matrix effect caused by bovine milk components in AFM₁, OTA and DON signals. It was observed clearly that during the retention time of AFM₁ (8.0 min) occurred the increasing of the signal intensity of the AFM₁ transitions. As a consequence of the matrix effect, it was necessary to use the matrix-matched standard calibration, which showed good linearity ($R^2 \geq 0.99$) and a RSD lower than 15% for all compounds at the 5 evaluated levels for each mycotoxin.

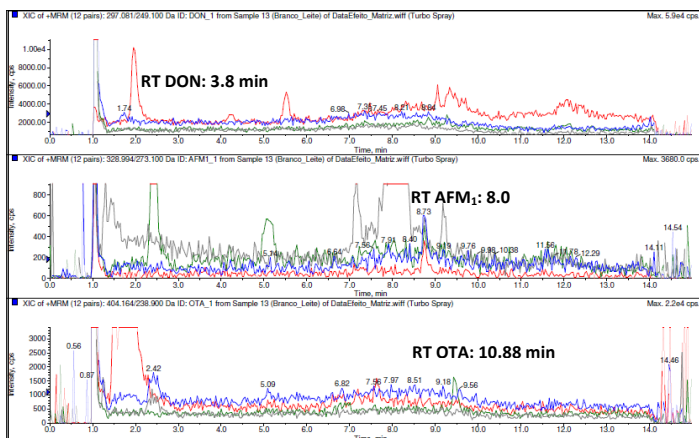


Figure 2.1 Interference of components of bovine milk in AFM₁, OTA and DON signal intensities

3.2.2 Recovery, repeatability and inter-day precision

The recovery ($n=4$) was evaluated in four levels of fortification (very low, low, medium and high) for AFM₁: 0.0125, 0.025, 0.0375 and 0.05 ng/mL, OTA: 0.25, 0.5, 0.75 and 1 ng/mL and DON: 5, 10, 15 and 20 ng/mL. The recovery of mycotoxins obtained by the method was between 104 and 121 % for AFM₁, 125 to 134 % for OTA and 100 to 112 % for DON. The method showed good repeatability with relative standard deviation (RSD) <20 % for the three compounds at all levels of fortification. Table 2.3 presents the test results of recovery, inter-day precision and repeatability of the method.

Table 2.3 Recovery, repeatability and inter-day precision for AFM₁, OTA and DON

Mycotoxin	Fortification level								Inter-day Precision ^e
	Very Low ^a		Low ^b		Medium ^c		High ^d		
	Rec ^f	RSD (%)	Rec	RSD (%)	Rec	RSD (%)	Rec	RSD (%)	
AFM ₁	121	11	104	4	108	5	104	8	28.38
OTA	133	14	134	10	125	12	129	14	20.51
DON	110	11	100	4	112	9	102	12	18.77

AFM₁: aflatoxin M₁; OTA: ochratoxin A; DON: deoxynivalenol; RSD: Relative Standard Deviation; ^a0.0125; 0.25 and 5 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively; ^b0.025; 0.5 and 10 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively;

^c0.0375; 0.75 and 15 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively; ^d0.05; 1 and 20 ng/mL for AFM₁, OTA and DON; ^efortification levels of 0.025 ng/mL for AFM₁; 0,5 ng/mL for OTA and 10 ng/mL for DON; ^frecovery (%)

The inter-day precision was evaluated in three different days at concentrations of 0.025, 0.5 and 10 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively, and in quintuplicate for each concentration. The RSD obtained for AFM₁, OTA and DON are shown in Table 2.3.

3.2.3 LOD, LOQ and selectivity

A signal to noise ratio greater than or equal to 3 and 10 was considered acceptable for the LOD and LOQ, respectively. The LOD obtained were 0.00625 ng/mL for AFM₁, 0.125 ng/mL for OTA and 2.5 ng/mL for DON and LOQ were 0.0125 ng/mL for AFM₁, 0.25 ng/mL OTA and 5 ng/mL for DON. The LOQ obtained for AFM₁ and OTA were twice lower than that established by the European Union (EU) as a maximum residue limit for these mycotoxins in foods intended for children (infant formulas and cereals) (EU, 2006). The MRL established for DON by the EU in infant foods is 200 ng/mL, and the LOQ obtained was 5 ng/mL.

The selectivity of the method was assessed by analyzing blank samples from bovine milk and bovine milk spiked samples with four fold the LOQ and standard solutions. The absence of any signal at the same retention time as the selected compounds indicated that there were not any matrix interferences that may give a false positive signal.

3.3 AFM₁, OTA and DON analysis in human milk

The validated method was used for the AFM₁, OTA and DON analysis of the 86 human milk samples provided by the participants of the study.

Internal quality control was conducted for every batch of samples to verify that the analytical system was under control. The internal quality control included a matrix-matched calibration, a reagent blank, a matrix blank and a spiked blank, which were injected together with each batch of samples in order to check the reliability of the method. For accurate quantification, calibration was performed using external matrix-matched standards.

None of the analyzed human milk samples showed contamination by AFM₁, OTA and DON up to the method LOD (0.00625; 0.125 and 2.5 ng/mL, respectively). However, four samples showed a chromatographic peak at the retention time of DON, with a signal to noise ratio greater than 3, although the detected levels were below the LOD. Nevertheless, the retention time (RT) and the ion ratio between the quantification transition (Q) and the confirmation transition (q) was accessed to check the identity of the compound. The ion ratio obtained from the suspected samples presented a RSD <25%, which makes possible the compound to be actually DON. Table 2.4 shows the RSDs obtained from the suspected peak relative to a fortified sample. Figure 2.2 shows the chromatograms of a spiked sample containing DON at 10 ng/mL and one of the suspected samples.

Table 2.4 Relative standard deviations (RSD) in the retention time and ion ratio obtained of real samples compared to a standard spiked sample

Samples ^a	Retention time (min) ^b	RSD (%) ^c	Relative peak intensity (%) ^b	Q/q ratio ^b	RSD (%) ^c
Sample 1	4.0	97.8	49.0	2.05	97.6
Sample 2	4.3	99.8	45.6	2.40	109
Sample 3	3.8	100	47.0	2.30	108
Sample 4	3.7	99.7	42.3	2.36	112

^a human milk samples possibly containing DON levels <LOD; ^b relative to the spiked sample injected in the same batch; ^c the Commission Regulation (EC) No. 657/2002 (EU, 2002) set a tolerable relative standard deviation at $\pm 2.5\%$ for the retention time and at $\pm 25\%$ for the Q/q ratio.

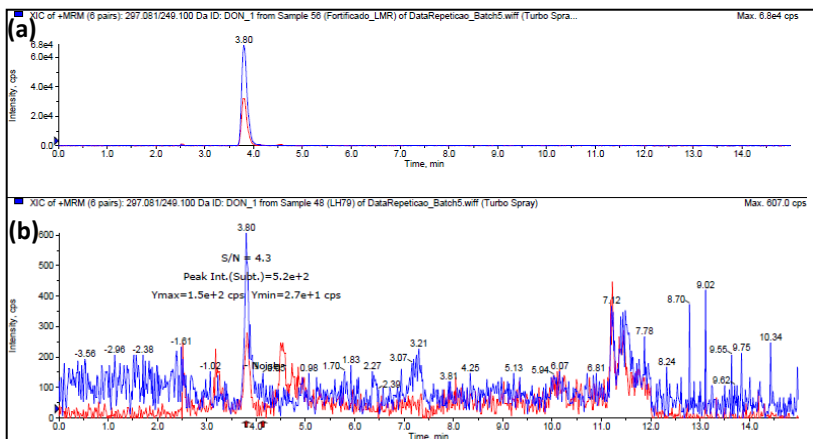


Figure 2.2 LC-MS/MS chromatograms: (a) spiked sample containing DON at 10 ng/mL and (b) suspected DON peak of a human milk sample

4. Discussion

4.1 Method validation

Considering the difficulty in multi-mycotoxin analysis of complex matrices such as milk and the low LOQs desired, the results showed acceptable terms of linearity, repeatability and recovery in compliance with the criteria fixed by Commission Regulation (EC) No. 657/2002 (EU,2002) and by RE N° 899 (BRASIL, 2003), satisfying the applicability of the method.

The extraction procedure of mycotoxins according Aguilera-Luiz et al. 2011, allowed the concentration of the analytes in twenty fold, getting LOQs below the European legislation for infant foods. Other advantages of the methodology used was the fast sample preparation and high sensitivity, which makes it applicable in routine analysis of AFM₁, OTA and DON in milk. However, a slight clogging in the C₁₈ cartridge happened sometimes while loading the supernatant, which made the procedure slower.

The use of LC-MS/MS with triple quadrupole allowed to acquire two transitions of each compound with good sensitivity, promoting reliable confirmation of the mycotoxins.

4.2 Mycotoxins in human milk and maternal dietary habits

Many studies have been conducted to investigate the presence of mycotoxins in human milk and have reported incidences ranging from zero to 100%. Turconi et al. 2004, investigated the occurrence of AFM₁ and OTA in human milk samples in Italy and found AFM₁ in only one (0.4%) of the 231 analyzed samples. On the other hand, they found OTA in 198 (85.7%) of the same 231 samples and related its presence in human milk to the habitual consumption of bread. Also in Italy, Galvano et al. 2008, reported the occurrence of AFM₁ and OTA in 4 (5%) and 61 (74%) of the 82 human milk analyzed samples, respectively. They related the presence of OTA to the consumption of cured pork meat and also to bread and bakery products. Biasucci et al. 2011, found a higher incidence of OTA in human milk in Italy, by reporting its presence in 45 (78.9%) of the 57 human milk analyzed samples. These authors found a correlation of OTA in human milk to the consumption of vegetable oils, soft drinks and also bakery products. In the studies conducted in Turkey by Gürbay et al. 2009, and Gürbay et al. 2010, OTA, aflatoxin B₁ (AFB₁) and AFM₁ were detected in 100% of the analyzed samples. In Iran, Sadeghi et al. 2009, found AFM₁ in 157 (98.1%) of the 160 human milk samples, while Mahdavi et al. 2010, reported AFM₁ in 20 (11%) of the 182 analyzed samples of human milk.

In the present study, AFM₁ and OTA were not detected up to the method LOD in any of the 86 analyzed human milk samples. Our findings are similar to those from Iran, reported by Afshar et al. 2013, which showed that a total of 136 samples of human milk, only one (0.7%) presented AFM₁ and two (1.4%) presented OTA. Our results are also similar to those reported by another study previously conducted in Brazil, by Navas et al. 2005, which reported AFM₁ occurrence in 1 (2%) and OTA in 2 (4%) of the 50 human milk samples.

The differences between the incidence of mycotoxins in human milk reported by the published studies may be caused by several factors, including the characteristics of the analytical method used, climatic and seasonal differences, as well as the quality of the food consumed by the participants. It was observed that our method presented an LOD and LOQ higher than those obtained by other authors, such as Biasucci et al. 2010, who reported an LOD and LOQ of 0.5 and 1 ng/L for AFM₁, and Galvano et al. 2008, who obtained an LOD and LOQ of 2 and 5 ng/L for OTA and 3 and 7 for AFM₁, respectively. Therefore, it is possible that a reduction in the LOD and LOQ values of our method would allow the detection of mycotoxins in the analyzed samples.

The absence of mycotoxins levels above the LOD in the analyzed samples prevented the correlation between dietary intake and mycotoxins in human milk. However, three of the volunteers whose breast milk sample showed a suspect for DON reported habitual consumption (> 7 times a week) of wheat flour and derivatives. The other one reported a moderate consumption of this food group (5 to 7 times a week). The lack of published studies investigating other mycotoxins in human milk besides AFM₁ and OTA prevents comparisons with our findings. However, this may be the first time that the presence of DON in human milk is approached.

The presence of mycotoxins in human milk is of great concern, since this is the only food consumed by infants exclusively breastfed until six months of age. Our results suggests that infants of this particular region are not exposed to the toxic effects of mycotoxins through human milk intake. However, considering the high toxicity of mycotoxins and the infant's physiological immaturity, constant monitoring is desirable, as well as extending the study to other Brazilian regions. For further research, studies addressing the occurrence of other common mycotoxins as DON, fumonisins and zearalenone in human milk are also appreciable.

Aknowledgments

The authors thank the CAPES Brazilian Agency for providing scholarship to K.M.T. and to the University of Blumenau for providing the scholarships (Artigo n°. 170) to Fernanda Piazero and Jesley Lechinowski who interviewed the mothers and collected the human milk samples. Special thanks to Mrs. Elizabeth Kuehn de Souza and Mrs. Maria Goreti Dassoler of the Human Milk Bank of Blumenau. Finally, we want to thank the mothers who volunteered in the study providing their dietary data and the human milk samples.

References

AFSHAR, P.; SHOKRZADEH, M., KALHORI, S.; BABAEI, Z.; SAEEDI SARAVI, S.S. Occurrence of ochratoxin A and aflatoxin M₁ in human breast milk in Sari, Iran. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 525–9, 2013.

AGUILERA-LUIZ, M.M.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2863–75, 2011.

ARENZ, S.; VON KRIES, R. Protective effect of breastfeeding against obesity in childhood Can a meta-analysis of observational studies help to validate the hypothesis? **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 639, p. 145–152, 2009.

BIASUCCI, G.; CALABRESE, G.; DI GIUSEPPE, R.; CARRARA, G.; COLOMBO, F.; MANDELLI, B. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. **European journal of nutrition** v. 50, n. 3, p. 211–8, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun, 2003.

CAST. **Mycotoxins**: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report no. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, p. 1-191, 2003.

EU Commission Decision 2002/657/EC of August 12th 2002, concerning the performance of analytical methods and the interpretation of the results. **Official Journal of the European Communities**, L221–L232, 2002.

EU Commission Regulation (EC) 1881/2006 of December 19th 2006, replacing Regulation (EC) 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, L364, 5–24, 2006.

GALVANO, F.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; GAGLIARDI, L.; CIOTTI, S.; LUISI, S. Maternal dietary habits and mycotoxin

occurrence in human mature milk. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 4, p. 496–501, 2008.

GÜRBAY, A.; GIRGIN, G.; SABUNCUOĞLU, S.A.; SAHIN, G.; YURDAKÖK, M.; YIĞIT, S.; GÜLSEVIN, T. Ochratoxin A: is it present in human breast milk samples obtained mothers from Ankara, Turkey. **Toxicology Letters**, v. 189, n. 1, p. S232, 2009.

GÜRBAY, A.; SABUNCUOĞLU, S.A.; GIRGIN, G.; SAHIN, G.; YIĞIT, S.; YURDAKÖK, M. Exposure of newborns to aflatoxin M₁ and B₁ from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 1, p.314–9, 2010.

HAUSNER, H.; BREDIE, W. L. P.; MØLGAARD, C.; PETERSEN, M. A.; MØLLER, P. Differential transfer of dietary flavour compounds into human breast milk. **Physiology & Behavior**, v. 95, p. 118–124, 2008.

HAUSNER, H.; NICKLAUS, S.; ISSANCHOU, S.; MØLGAARD, C.; MØLLER, P. Breastfeeding facilitates acceptance of a novel dietary flavour compound. **Clinical Nutrition**, v. 29, p. 141–148, 2010.

HEINIG, M. J.; NOMMSEN, L. A.; PEERSON, J. M.; LONNERDAL, B.; DEWEY, K. G. Intake and growth of breast-fed and formula-fed infants in relation to the timing of introduction of complementary foods. The DARLING study. **Acta Paediatrica**, v. 82, p. 999–1006, 1993.

HETHERINGTON, M.M.; CECIL, J.E.; JACKSON, D.M.; SCHWARTZ, C. Feeding infants and young children: from guidelines to practice. **Appetite**, v. 57, n. 3, p. 791–5, 2011.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Some traditional herbal medicines: some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. World Health Organization, Lyon, France, v. 82, p. 1–556, 2002.

LANDRIGAN, P.J.; SONAWANE, B.; MATTISON, D.; MCCALLY, M.; GARG, A. Chemical Contaminants in Breast Milk and Their Impacts on Children's Health: an Overview Mini-Monograph. **Environmental Health**, v. 110, n. 6, p. 313 –5, 2002.

LI, S.C.; KUO, S.C.; HSU, Y.Y.; LIN, S.J.; CHEN, P.C.; CHEN, Y.C. Effect of Breastfeeding Duration on Infant Growth Until 18 Months of Age: a National Birth Cohort Study. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 2. n. 4, p. 165–72, 2010.

MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L.; AREFHOSSEINI, S.R.; VAHED JABBARI, M. Determination of aflatoxin M₁ in breast milk samples in Tabriz-Iran. **Maternal and child health journal**, v. 14, n. 1, p.141–5, 2010.

MEAD, N. Contaminants in human milk. **Environmental Health**, v. 116, n. 10, 2008.

McQUEEN, C.A. **Comprehensive toxicology**, 2 ed. Elsevier, 2010, 7482 p.

MUÑOZ, K.; CAMPOS, V.; BLASZKEWICZ, M.; VEJA, M.; ALVAREZ, A.; NEIRA, J. Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. **Mycotoxin Research**, v. 26, n. 2, p. 59–67, 2010.

NAVAS, S.A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 5, p. 457–62, 2005.

ODDY, W. H.; ROBINSON, M.; KENDALL, G. E.; LI, J.; ZUBRICK, S. R.; STANLEY, F. J. Breastfeeding and early child development. A prospective cohort study. **Acta Paediatrica**, v. 100, p. 992–999, 2011.

ØSTBYE, T.; KRAUSE, K. M.; SWAMY, G. K.; LOVELADY, C. A. Effect of breastfeeding on weight retention from one pregnancy to the next. Results from the North Carolina WIC program. **Preventive Medicine**, v. 51, p. 368–372, 2010.

PESTKA, J.J. Deoxynivalenol : mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 663–79, 2010.

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

RIBEIRO, A.C.; SÁVIO, K.E.O.; RODRIGUES, M.L.C.F.; COSTA, T.H.M.; SCHMITZ, B.A.S. Validação de um questionário de frequência de consumo alimentar para população adulta. **Revista de Nutrição** (Campinas), v. 19, n. 5, p. 553–62, 2006.

SADEGHI, N.; OVEISI, M.; JANNAT, B.; HAJIMAHMOODI, M.; BONYANI, H.; JANNAT, F. Incidence of aflatoxin M₁ in human breast milk in Tehran, Iran. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 75–8, 2009.

SULLIVAN, S.A.; BIRCH, L.L. Infant dietary experience and acceptance of solid foods. **Pediatrics**, v. 93, p. 277, 1994.

TONON, K.M.; REITER, M.G.R.; SCUSSEL, V.M. Mycotoxins levels in human milk: a menace to infants and children health. **Current Nutrition and Food Science**, v. 55, n. 48, p. 33–42, 2013.

TURCONI, G.; GUARCELLO, M.; LIVIERI, C.; COMIZZOLI, S.; MACCARINI, L.; CASTELLAZZI, A.M. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn: an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 4, p. 191–7, 2004.

VAN EGMOND, H.P.; SCHOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. Regulations relating to mycotoxins in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 147–57, 2007.

World Health Organization (WHO). **WHO food additives series 47**. Presented at the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO Food Nutr. Pap. 74, 2001.

Capítulo 3

**Application of an LC-MS/MS method for multi-mycotoxin analysis
in infant formula and milk-based products for young children
commercialized in Brazil**

Application of an LC-MS/MS method for multi-mycotoxin analysis in infant formula and milk-based products for young children commercialized in Brazil

Abstract

An analytical method based on liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was validated and applied for the analysis of aflatoxin M₁ (AFM₁), ochratoxin A (OTA) and deoxynivalenol (DON) in infant formula and milk-based products for young children commercialized in Brazil. A total of 38 samples were evaluated, including 12 infant formula, 14 follow-on formula and 12 samples of milk-based products. AFM₁ was detected in 12 (32%) samples, and seven (18%) samples contained AFM₁ levels above the method limit of quantification in a concentration range between 0.013 to 0.067 ng/mL (0.026 ± 0.019). Two samples of milk-based products exceeded the maximum level (ML) fixed by the European Union for AFM₁ in baby foods, however, all samples were in agreement with the levels established by the Brazilian regulation. OTA and DON were not detected in any of the analyzed samples.

Keywords: mycotoxins, aflatoxin M₁, ochratoxin A, deoxynivalenol, infant formula, infant milk, baby food, LC-MS/MS.

1. Introduction

Breastfed babies are generally healthier and have better growth and development rate compared to infants fed with formula (WHO, 2010). However, less than 40% of babies are exclusively breastfed until 6 months of life in developing countries (WHO, 2009). Infant formulas and milk-based products are the main nutritional source for infant feeding in the absence of breastfeeding or to its complement (GRUMMER-STRAWN et al., 2008).

The first months of a child's life is characterized by its rapid growth and development and high energy requirement. The amount of food ingested on a body weight basis during this period is much higher compared to older children or adults (EL-TRAS et al., 2011). Besides their high dietary intake, infants are more susceptible to contaminants in foods due to their physiological immaturity and their restricted diet with food sources generally limited to breast milk or infant formula (ALVITO et al., 2010).

The presence of contaminants such as mycotoxins in foods intended for children consumption is of great concern. Mycotoxins are secondary metabolites of the metabolism of some fungi, especially of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* and have become increasingly important in the context of food safety (KABAK, 2012). Among all mycotoxins, aflatoxins, including aflatoxin M₁ (AFM₁), and ochratoxin A (OTA) are the most toxic and widely distributed in food and were classified by IARC as a carcinogen (group 1) and a possibly carcinogen (group 2B) to humans, respectively (IARC, 2002). Deoxynivalenol (DON) has no carcinogenic properties, however, its main toxic effects include growth disorders due to anorexia and dysregulation of the immune and reproductive system (PESTKA, 2010).

Considering the risks associated with mycotoxin intake by children, the European Union established a strict regulation for the presence of mycotoxins in infant foods, setting a limit of 0.025 ng/mL (reconstituted product) for AFM₁ in infant formula and follow-on formula, including infant milk and follow-on milk, and a limit of 0.5 µg/kg⁻¹ (dry product) for OTA in baby foods for infants and young children (EU, 2006). In Brazil, stricter limits are in effect since 2011, after the publication of the RDC n°07, from 18/02/2011, disposing on the maximum permissible levels for mycotoxins in foods. However, it keeps AFM₁ levels below 0.5 ng/mL for fluid milk, while for OTA and DON in cereal-based food for children the limits are 2 and 200 µg/kg⁻¹,

respectively. Limits established specifically to infant formulas are set just to aflatoxins (AFs) B₁, B₂, G₁ and G₂ (BRASIL, 2011).

Stricter regulations have generated the need to develop sensitive and specific analytical methods for the determination of mycotoxins in foods (BELTRÁN et al., 2011). Accordingly, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become the universal approach for mycotoxin analysis (CIGIĆ; PROSEN, 2009). Although several multi-mycotoxin methods are available for different food commodities, some authors have mentioned the small amount of validated methods for baby food, including infant formula (BELTRÁN et al., 2011; RUBERT et al., 2012).

The aim of this study was to validate and apply an LC-MS/MS method to verify the occurrence of AFM₁, OTA and DON in infant formula and milk-based products intended for children commercially available in Brazil. The extraction procedure was performed based on a method previously validated by Aguilera-Luiz et al. (2011), for fluid bovine milk, with minor modifications. The products compliance to the established limits by Brazilian and European regulations was also verified.

2. Experimental section

2.1 Materials

2.1.1 Samples

Samples of infant formula for babies between 0 and 6 months ($n=12$), follow-on formula for babies from 6 months to a year old ($n=14$) and powdered milk-based products for young children, from 1 to 5 years old ($n=12$), from the three most popular brands commercialized in Brazil, were obtained directly from the producer or purchased in different supermarkets and drugstores of Florianópolis (Brazil). A total of 38 products were obtained and analyzed between August 2012 and March 2013. The samples were stored sealed in its own packaging at room temperature until analysis. Previously to the extraction procedure, the samples were reconstituted according to the manufacturer's instructions in order to express mycotoxins levels in product ready to use.

2.1.2 Chemicals

Acetonitrile, methanol and *n*-hexane, both HPLC grade, were obtained from J. T. Baker (Xalostoc, Mexico). Ammonium formate, analytical grade, was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Ultrapure water was obtained from a purification system Milli-Q water (Millipore, Bedford, USA).

2.1.3 Mycotoxin standards

Pure standards of aflatoxin M₁ (AFM₁) powder, ochratoxin A (OTA) and deoxynivalenol (DON), both in acetonitrile solution, were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.1.4 Equipment

For the sample preparation were used a Reax_{top} model vortex, from Heidolph (Schwabach, Germany), centrifuges Z323 model, from HermLe-Labortechnik (Wehingen, Germany) and 5424 model, from Eppendorf (Hamburg, Germany), balance model XP2003S Delta Range® from Mettler-Toledo (Greifensee, Switzerland), vacuum manifold model Vac Elut SPS 24 from Agilent (Santa Clara, USA) connected to a vacuum pump with controller, model V-855 from Büchi (Flawil, Switzerland). For the evaporation of the extract was used an evaporator comprising water bath and nitrogen flow, model Turbo Vap® LV from Biotage (Uppsala, Sweden).

The LC-MS/MS analyzes were performed on a liquid chromatography system Agilent 1290 Infinity series, from Agilent Technologies (Palo Alto, USA) coupled to a mass spectrometer QTRAP® 5500 from AB Sciex (Foster City, USA) equipped with a Turbo IonSpray® electrospray ionisation (ESI) interface. Separation of the analytes was performed using an Acquity UPLC BEH C₁₈® column (1.7 mm in particle size and dimensions of 2.1 x 100 mm), from Waters (Milford, USA). The Analyst® 1.6.1 software (AB Sciex) was used for the control of system components and to obtain and analyze data.

2.1.5 Others

Sep-Pak Plus C₁₈ cartridges (360 mg, 55-105 µm) for solid phase extraction (SPE) were purchased from Waters (Milford, USA).

2.2 Methods

2.2.1 Mycotoxin standard solution preparation

Stock standard solutions of each mycotoxin were prepared in acetonitrile. A working mix solution was prepared from each stock standard solution in 20% methanol containing the three mycotoxins, at the following concentrations: 5 ng/mL of AFM₁, 100 ng/mL of OTA and 2000 ng/mL of DON.

Standards tuning solutions (100 ng/mL) were prepared from the stock standard solutions in 50% methanol with ammonium formate 10 mM for optimisation of the ionisation parameters setting through infusion pump.

2.2.2 MS/MS parameters optimisation for the mycotoxins

The standards tuning solutions were injected individually directly into the MS/MS spectrometer with ESI interface, using an infusion pump (at flow rate of 10 µl/min), and the declustering potential (DP), collision energy (CE), entrance potential of the collision cell (CEP) and exit potential of the collision cell (CXP) were optimized for each compound and recorded.

MS/MS operated in positive mode ($[M+H]^+$) for the three mycotoxins. The source conditions for the analysis were as follows: curtain gas, 15.0; ion spray voltage, 5000 V; GS1 and GS2, 45 and 50 psi, respectively; probe temperature of 600 °C. The entrance potential (EP) was set at 10V for all analytes. The MS was operated in MRM (multiple reaction monitoring). Table 3.1 shows the optimized MS/MS parameters for AFM₁, OTA and DON.

Table 3.1 Optimised MS/MS parameters for AFM₁, OTA and DON

Mycotoxin	Ionisation mode	Precursor ion (m/z)	DP (V)	Product ion (m/z)	CE (V)	CXP (V)
AFM ₁	ESI+	329.0 $[M+H]^+$	146	273.1 (<i>Q</i>)	29	28
				229.0 (<i>q</i>)	59	22
OTA	ESI+	404.2 $[M+H]^+$	61	238.9 (<i>Q</i>)	35	24
				358.1 (<i>q</i>)	21	38
DON	ESI+	297.1 $[M+H]^+$	66	249.1 (<i>Q</i>)	17	22
				231.1 (<i>q</i>)	19	22

AFM₁: aflatoxin M₁; OTA: ochratoxin A; DON: deoxynivalenol; *m/z*: mass to charge ratio; DP: declustering potential; *Q*: quantification transition; *q*: confirmation transition; CE: collision energy; CXP: exit potential of the collision cell

2.2.3 LC parameters' settings for the mycotoxins

The LC was connected to the MS/MS spectrometer, and the working standard mix solutions, previously prepared, were injected. The volume of injections was 5 μ l. Toxins separation was carried out through a C₁₈ column at 40 \pm 0.1°C. Mobile phases A and B were composed of 10 and 90% methanol, respectively, both with ammonium formate 15 mM. The flow rate was set in 180 μ l/min. The gradient started with 85% of mobile phase A and over the first 8.75 minutes of run, the proportion of mobile phase A dropped to 20% and remained so for the next 2 minutes. In 12.6 minutes of running, the gradient of mobile phase B rose to 100% and was maintained until the end of the run (15 min of total run time). Prior to each injection, a stabilisation step were carried out through a gradient of 87.5% mobile phase A for 3 minutes. The dwell time was set at 150 milliseconds for all analytes. Retention time for DON, AFM₁ and OTA was 3.66; 8.00 and 10.88 minutes, respectively.

2.2.4 Analytical procedure

The extraction of AFM₁, OTA and DON were conducted according to the procedure of Aguilera-Luiz, Plaza-Bolaños, Romero-González, Vidal, & Frenich (2011), developed for the detection of mycotoxins and pesticides in bovine milk by LC-MS/MS, with minor modifications.

Infant formula, follow-on formula and powdered milk-based products were reconstituted according to recommendations of the manufacturer. Then, 10 mL of reconstituted sample were diluted in 10 mL of Milli-Q water in a 50 mL Falcon tube. The sample was then homogenized by vortexing and centrifuged for 10 minutes at 7000 rpm. The aqueous supernatant was then loaded on a C₁₈ cartridge previously conditioned with 5 mL methanol and 5 mL of Milli-Q water. After passing the sample, the cartridge was washed with 5 mL of Milli-Q water and 5 mL of *n*-hexane and vacuum dried for 15 seconds. The analytes were eluted with 5 mL of methanol. The methanolic eluates were dried under gentle nitrogen stream at 40 °C and reconstituted with

500 μl of 20% methanol. Finally, 5 μl extracts were injected into the LC-MS/MS system. Quantification was performed by matrix-matched standard calibration.

2.2.5 Method validation

The validation tests were performed in infant formula reconstituted according to recommendations of the manufacturer. The following parameters were evaluated in order to verify the method reliability: matrix effect, linearity (R^2), recovery, repeatability, intermediate precision, selectivity, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ).

The matrix effect was determined using the post-column infusion method, where a standard mix solution containing the three mycotoxins at a concentration of 0.025 ng/mL of AFM₁, 0.5 ng/mL of OTA and 10 ng/mL of DON was infused directly into the MS/MS spectrometer at the same time to the injection of a blank sample of infant formula in the LC.

Linearity was evaluated using matrix-matched standard calibration by analyzing blank samples spiked at 5 concentrations in quadruplicate, covering levels from 0 to 0.05 ng/mL for AFM₁, from 0 to 1.0 ng/mL for OTA and from 0 to 20 ng/mL for DON. Recovery and repeatability tests were conducted in four fortification levels (AFM₁: 0.0125, 0.025, 0.0375 and 0.05 ng/mL, OTA: 0.25, 0.5, 0.75 and 1 ng/mL and DON: 5, 10, 15 and 20 ng/mL) in quadruplicate. The intermediate precision was evaluated using spiked infant formula samples ($n=4$) at a concentration of 0.025, 0.5 and 10 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively, on four different days.

The selectivity of the method was assessed by analyzing a blank sample and a spiked sample at levels of 0.025, 0.5 and 10 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively. Finally, the LOD and LOQ were obtained by analyzing spiked samples in the following concentrations: 0.00625 and 0.0125 ng/mL to AFM₁; 0.125 and 0.25 ng/mL for OTA and 2.5 and 5 ng/mL for DON. The LOD and LOQ were determined as the lowest concentration of analytes capable of generating a signal to noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively.

3. Results and discussion

3.1 Mycotoxins in infant formula and milk-based products

The validated method was used to analyze 12 samples of infant formula, 14 samples of follow-on formula and 12 samples of powdered milk-based products for young children, totaling 38 samples.

Only AFM₁ was detected in the analyzed samples by the proposed method. Positive results were found in 12 (32%) of the 38 analyzed samples, of which 7 showed levels above the method LOQ. Three of them corresponded to infant formula and four corresponded to powdered milk-based products for young children. Of these latter, two samples showed AFM₁ concentrations above the maximum permitted level by the European regulation. Table 3.2 lists the results obtained in this study from the analyzed samples. OTA and DON were not detected in any sample.

Internal quality control was conducted for every batch of samples to verify that the analytical system was under control. The internal quality control included a matrix-matched calibration, a reagent blank, a matrix blank and a spiked blank at the EU MRL concentration level (except for DON that was 10 ng/mL), which were injected together with each batch of samples in order to check the reliability of the method. For accurate quantification, calibration was performed using external matrix-matched standards.

AFM₁ in the positive samples was identified and confirmed by the accomplishment of both retention time and Q/q ratio (deviations lower than $\pm 2,5\%$ and $\pm 25\%$, respectively), according to EC decision (EU, 2002). Figure 3.1 shows the chromatograms of a spiked blank sample with AFM₁ at LOQ level and one of the milk-based products for young children, containing AFM₁ at 0.067 ng/mL.

Table 3.2 Occurrence of AFM₁ in the infant formula, follow-on formula and milk-based products samples

Sample type	<i>n</i>	>LOD ^a	>LOQ ^b	Concentration range (ng/mL)	Mean \pm SD
Infant formula	12	4	3	0.014 – 0.017	0.015 \pm 0.001
Follow-on formula	14	2	0	na	na
Milk-based products	12	6	4	0.013 – 0.067	0.035 \pm 0.023
Total	38	12	7	0.013 – 0.067	0.026 \pm 0.019

AFM₁: aflatoxin M₁; ^aLOD for AFM₁: 0,00625 ng/mL; ^bLOQ for AFM₁: 0,0125 ng/mL; na: not applicable

The literature describes the occurrence of AFM₁ in different products intended for infant and young child feeding, as can be observed in Table 3.3. The concentration levels of AFM₁ in infant formula and milk-based products for young children found by the present study are in agreement with those previously reported in the literature (ALVITO et al., 2010; KABAK, 2012). However, some studies conducted through ELISA methodologies presented higher AFM₁ occurrence and concentration levels, reporting above 90% of samples contaminated (RASTOGI et al., 2004; BAYDAR et al., 2007; OVEISI et al., 2007).

Beltrán et al. (2011), found AFM₁ contamination in only one of 14 infant formula samples. On the other hand, the same authors reported OTA occurrence in two of the 14 analyzed samples, although in cereal-based infant formula. OTA was also reported by Meucci et al. (2008), in 133 of 185 infant formula samples, by Kabak (2012), in 12 of 62 infant formulas and by Baydar et al. (2007), in 25 of 63 baby foods.

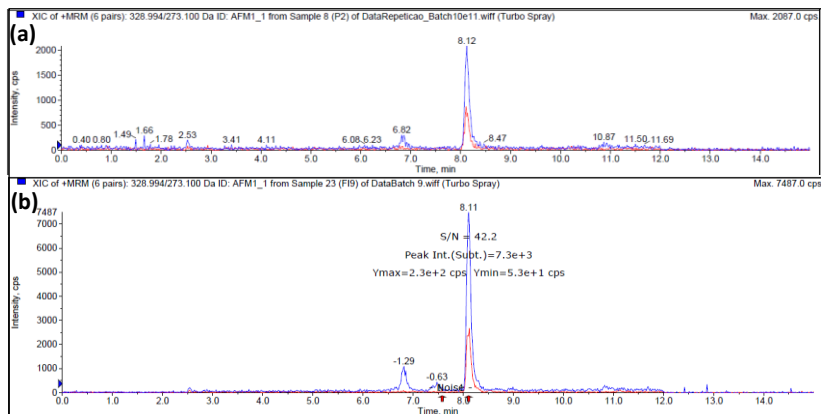


Figure 3.1 LC-MS/MS chromatograms: (a) spiked blank sample with AFM₁ at LOQ level and (b) milk-based product for young children where AFM₁ was detected at 0.067 ng/mL

Rubert et al. (2012), in their study of 21 mycotoxins in baby food, reported the occurrence of DON in 9 of 35 cereal-based baby food samples, in a concentration range of 70 to 210 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$. DON can be metabolised in the rumen of the dairy cattle, which makes the transfer in

its intact form to bovine milk negligible, which may explain its absence in our studied samples (SORENSEN; ELBAEK, 2005). However, its conjugates can be transferred to milk (PESTKA, 2007), and its occurrence in milk-based products, especially in infant formulas and baby foods, should be verified.

Table 3.3 Literature available on the presence of mycotoxins in products intended for infant and young child feeding, including the present study

Country	Mycotoxin	Positives/ total	>LOQ	Concentration range ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$)	Method	Reference
Brazil	AFM ₁	12/ 38	7 ^{a,b}	0.013 - 0.067	LC- MS/MS	Present study
	OTA	0/ 38	ND ^g	NA		
	DON	0/38	ND ^h	NA		
Egypt	AFM ₁	54/ 125 ^b	NI	0.0003 - 0.0218	ELISA	El-Tras et al., 2011
Iran	AFM ₁	128/128 ^a	NI	0.031- 0.113	ELISA	Oveisi et al., 2007
		116/ 120 ^b	NI	0.001 - 0.014		
India	AFM ₁	72/80 ^c	NI	0.003 – 0.035	ELISA	Rastogi et al., 2004
		17/ 17 ^a	NI	0.077 - 0.844		
		17/ 18 ^b	NI	0.143 - 0.77		
Turkey	AFB ₁	38/ 40 ^c	NI	0.065 - 1.012	ELISA	Baydar et al., 2007
		55/ 63	55 ^d	0.10 - 6.04		
		23/ 63	23 ^d	0.06 - 0.32		
		25/ 63	25 ^d	0.27 - 4.50		
Portugal	AFM ₁	5/ 62	5 ^{a,b}	0.016 - 0.022	LC-FD	Kabak, 2012
		12/ 62	12 ^{a,b}	0.017 - 0.184		
		7/ 27	1 ^c	0.009		
Spain	AFM ₁	10/ 27	4 ^a	0.017 - 0.041	LC- MS/MS	Beltrán et al., 2011
		16/ 27	10 ^{a,c}	0.034 - 0.212		
		1/ 14	1 ^a	0.006		
	AFM ₁	2/ 14	2 ^c	0.050	LC- MS/MS	Rubert et al., 2012 ^e
		1/ 35 ^c	ND ^f	< 0.05		
		2/ 35	2 ^c	0.35 - 0.5		
		9/ 35	9 ^c	70 – 210		

AFB₁: aflatoxin B₁; AFM₁: aflatoxin M₁; OTA: ochratoxin A; DON: deoxynivalenol, SD: standard deviation; ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; LC-FD: liquid chromatography with fluorescence detection; LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; ND: not detected up to the method LOQ; NI: not informed; NA: not applicable; ^amilk-based product for young children; ^binfant formula; ^ccereal-based baby food; ^dvalues >LOD; ^ethese authors also found the presence of nivalenol, fumonisin, aflatoxin G₂, zearalenone, beauvericin and esterigmatocistin; ^fLOQ 0.05 µg/kg⁻¹; ^gLOQ 0.25 µg/kg⁻¹; ^hLOQ 5 µg/kg⁻¹

3.2 Method validation

3.2.1 Matrix effect and linearity (R^2)

The matrix effect was evaluated by post-column infusion, in order to check whether components of infant formula were able to interfere with the signal of the three mycotoxins. Figure 3.2 shows the chromatograms obtained in the evaluation of the matrix effect caused by the components of infant formula in the signal of AFM₁, OTA and DON. The signal intensity of DON transitions varied throughout the chromatographic run, while during DON elution (at 3.66 min) there is a decrease of the signal, indicating that matrix components may interfere with the signal intensity of DON. It was clearly observed that during the AFM₁ retention time (at 8.0 min of running) an increase in the signal intensity of the AFM₁ transitions occurs. Regarding OTA, little interference was observed during its elution, at 10.88 minutes.

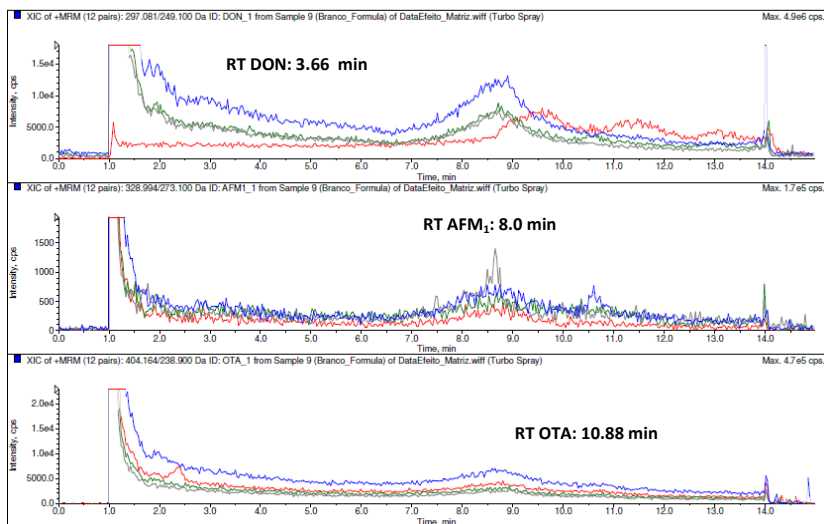


Figure 3.2 Interference of infant formula components in the signal intensities of AFM₁, OTA and DON

As a result of the matrix effect, it was necessary to use the matrix-matched standard calibration, which showed a correlation coefficient (R^2) ≥ 0.99 and relative standard deviation (RSD) lower than 15% for all compounds at the following levels: 0; 0.0125; 0.025; 0.0375 and 0.05 ng/mL for AFM₁, 0; 0.25; 0.5 and 0.75 ng/mL for OTA and 0; 5; 10; 15 and 20 ng/mL for DON, except for OTA at 1.0 ng/mL, which obtained an RSD of 15.39%.

3.2.2 Recovery, repeatability and inter-day precision

Recovery ($n=4$) was evaluated in four levels of fortification (very low, low, medium and high) as follows: (a) AFM₁: 0.0125, 0.025, 0.0375 and 0.05 ng/mL; (b) OTA: 0.25, 0.5, 0.75 and 1 ng/mL and (c) DON: 5, 10, 15 and 20 ng/mL. The recovery obtained was between 87 and 100% for AFM₁, 83 to 102% for OTA and 90 to 123% for DON. The method showed good repeatability with RSD <15% for the three compounds in all fortification levels, except for the very low level of the three mycotoxins, which showed RSD <38%. Table 3.4 shows the recovery, repeatability and inter-day precision obtained by the method.

Table 3.4 Recovery, repeatability and inter-day precision for AFM₁, OTA and DON

Mycotoxin	Fortification level								Inter-day precision ^e
	Very low ^a		Low ^b		Medium ^c		High ^d		
	Rec ^f	RSD (%)	Rec	RSD (%)	Rec	RSD (%)	Rec	RSD (%)	
AFM ₁	90	32	100	3	87	6	90	4	11.40
OTA	83	34	102	3	102	4	105	4	8.68
DON	90	37	105	10	108	11	123	11	12.58

AFM₁: aflatoxin M₁; OTA: ochratoxin A; DON: deoxynivalenol; ^a0.0125; 0.25 and 5 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively; ^b0.025; 0.5 and 10 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively; ^c0.0375; 0.75 and 15 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively; ^d0.05; 1 and 20 ng/mL for AFM₁, OTA and DON; ^efortification levels of 0.025 ng/mL for AFM₁; 0.5 ng/mL for OTA and 10 ng/mL for DON; ^frecovery (%)

The inter-day precision was tested in four different days at the concentrations of 0.025; 0.5 and 10 ng/mL for AFM₁, OTA and DON, respectively, and in quadruplicate for each concentration. The RSD obtained for the three mycotoxins was under 15%.

3.2.3 LOD, LOQ and selectivity

The signal to noise ratio greater or equal than 3 and 10 was considered acceptable for the LOD and LOQ, respectively. The LOQ obtained for AFM₁ and OTA were half the established level by the European Union (EU) as a maximum residue level (MRL) for these mycotoxins in foods for infant feeding (infant formula and follow-on formula, including infant milk and follow-on milk). Regarding DON, the MRL fixed by the EU in cereal-based infant foods is 200 ng/mL, and the LOQ obtained was 5 ng/mL. The LOD and LOQ obtained for AFM₁, OTA and DON are shown in Table 3.5.

Table 3.5 LODs and LOQs obtained in infant formula. IARC classification and MRLs for mycotoxins in baby food according to EC 1881/2006 commission regulation

Mycotoxin	IARC classification	MRL (EU) (ng/mL)	Infant formula	
			LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
AFM ₁	1	0.025	0.00625	0.0125
OTA	2B	0.5	0.125	0.25
DON	3	200	2.5	5

AFM₁: aflatoxin M₁; OTA: ochratoxin A; DON: deoxynivalenol; *EC 1881/2006 Commission regulation; Group 1 IARC: carcinogenic to humans; Group 2B IARC: possibly carcinogenic to humans; Group 3 IARC: not classifiable as to its carcinogenicity to humans; MRL: maximum residue level; EU: European Union; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

The selectivity was assessed by analyzing blank samples of infant formula and infant formula samples spiked with four times the LOQ concentrations and standard solutions. The absence of a signal in the blank sample during the retention time of each mycotoxin indicated that there was no matrix interference capable of conducting a false positive result.

These results demonstrated that the method yielded acceptable linearity, repeatability and recovery in agreement with the performance criteria fixed by the Commission Regulation (EC) No. 657/2002 (EU,2002) and by RE N° 899 (BRASIL, 2003).

4. Conclusion

The extraction procedure by Aguilera-Luiz et al. (2011), validated to the analysis of mycotoxins and pesticides in fluid milk proved to be effective when applied to the analysis of infant formula and milk-based products for young children. For the purpose of these study, some modifications were necessary, such as increasing the concentration of the extract in order to achieve detection and quantification limits as low as possible. The main difficulties of the method happened during the SPE procedure, when some samples clogged in the cartridge, making this step sometimes slowly. Infant formulas have complex formulations and its composition also vary depending on the indication of the product. It was observed that formulas containing maltodextrin

are more likely to cause clogging during the SPE. Furthermore, the operating pressure limit supported by the LC-MS/MS system was sometimes achieved, making it necessary to carry out washing steps of the column between the injection of samples. Although it was possible to observe a fluid and translucent final extract, its viscosity possibly was the cause of the pressure increase in the column.

The validated method showed satisfactory values of linearity, repeatability and recovery, considering the low MRLs established by the European legislation, which allowed to quantify very low levels of AFM₁ in infant formula and milk-based products for young children. LC-MS/MS with triple quadrupole allowed to acquire two transitions of each compound with good sensitivity, promoting reliable confirmation of AFM₁ found in the samples.

The study demonstrated the regular presence of AFM₁ at low levels in the analyzed samples of infant formula and milk-based products for young children. The absence of an MRL for AFM₁ in the Brazilian regulation dedicated specifically to infant formulas and milk-based products for young children imposed a limitation on the study, because it was not possible to decide if the levels found in the samples were tolerable or not. Two of the 12 samples containing AFM₁ had higher levels than 0.025 ng/mL, fixed by the EU as the AFM₁ MRL for infant formula, follow-on formula, infant milk and follow-on milk. These samples showed AFM₁ levels at 0.044 and 0.067 ng/mL, and should serve as an alert regarding the raw material used to produce these products. Considering the Brazilian MRL for AFM₁ in bovine fluid milk and for AFs B₁, B₂, G₁ and G₂, in infant formulas and follow-on formulas, all samples were below the established limits of 0.5 and 1.0 ng/mL, respectively.

Due to the high toxicity and carcinogenic properties of AFM₁, its presence in foods intended for infant and child feeding is a concern. Therefore, the surveillance of mycotoxins in these products should be continuous, since the quality of the raw material used in the formula production can be changed year to year depending on the climatic conditions.

Acknowledgements

Authors thank the CAPES Brazilian Agency for providing scholarship to K.M.T.

References

- AGUILERA-LUIZ, M. M.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2863 – 75, 2011.
- ALVITO, P. C.; SIZOO, E. A.; ALMEIDA, C. M. M.; EGMOND, H. P. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 1, p. 22 – 30, 2008.
- BAYDAR, T.; ERKEKOGLU, P.; SIPAHI, H.; SAHIN, G.; SAMPLES, I. Aflatoxin B₁, M₁ and Ochratoxin A Levels in infant formulae and baby foods marketed in Ankara, Turkey. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, n. 1, p. 89 – 92, 2007.
- BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; CORTÉS, M. Á.; YUSÀ, V.; HERNÁNDEZ, F. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M₁ and ochratoxin A in baby food and milk. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 737 – 44, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N°7, de 18/02/2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev, 2011.
- _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n°899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun, 2003.
- CIGIĆ, I. K., & PROSEN, H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, p. 62-115, 2009.

EL-TRAS, W. F.; EL-KADY, N. N.; TAYEL, A. A. Infants exposure to aflatoxin M₁ as a novel foodborne zoonosis. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2816-9, 2011.

EU. Commission Decision 2002/657/EC of August 12th 2002, concerning the performance of analytical methods and the interpretation of the results. **Official Journal of the European Communities**, L221–L232, 2002.

_____. Commission Regulation (EC) 1881/2006 of December 19th 2006, replacing Regulation (EC) 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, L364, 5–24, 2006.

GRUMMER-STRAWN, L. M.; SCANLON, K. S.; FEIN, S. B. Infant feeding and feeding transitions during the first year of life. **Pediatrics**, v. 122, p. S36–S42, 2008.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Some traditional herbal medicines: Some mycotoxins, naphthalene and styrene**. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization, Lyon, France, v. 82, p. 1–556, 2002.

KABAK, B. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: occurrence and safety evaluation. **Food Control**, v. 26, n. 1, p. 182 – 7, 2012.

MEUCCI, V.; PRETTI, C.; LASCHI, S.; MINUNNI, M.; INTORRE, L.; SOLDANI, G. Mycotoxins occurrence in Italian formula milks. **Toxicology Letters**, v. 180, p. S191 – S192, 2008.

OVEISI, M.R.; JANNAT, B.; SADEGHI, N.; HAJIMAHMOODI, M.; NIKZAD, A. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1216 – 8, 2007.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 663 – 79, 2010.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 283–98, 2007.

RASTOGI, S. Detection of Aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. **Food Control**, v. 15, n. 4, p. 287 – 90, 2004.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 176 – 83, 2012.

SØRENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, v. 820, n. 2, p. 183 – 96, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2010) Facts for life. (4th ed). Disponível em: <http://www.factsforlifeglobal.org/>. Acesso em: 04 jan 13.

_____. (2009). Infant and young child feeding. Model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. Disponível em:

<http://www.who.int/nutrition/publications/infantfeeding/9789241597494/en/>. Acesso em 22 mar 13.

Capítulo 4
Occurrence of filamentous fungi in human milk, infant formula and
milk-based products for young children

Occurrence of filamentous fungi in human milk, infant formula and milk-based products for young children

Abstract

This study aimed to verify the safety of foods targeted to children through microbiological testing of yeasts and molds. The occurrence of filamentous fungi was observed in 28 (28.6 %) of the 98 human milk samples obtained from the Human Milk Bank of Blumenau, in 23 (51 %) of infant formula samples ($n=45$) and 9 (60 %) of milk-based products for young children ($n=15$) obtained directly from manufacturers or purchased in the Florianopolis retail market. The analysis followed the ISO 6611:2004 methodology for the yeasts and molds total load enumeration in milk and dairy products. Filamentous fungi were isolated in 6 (6 %) samples of human milk with counts above 10^2 CFU/mL. Four (9 %) samples of infant formula and 1 (7 %) of milk-based product for young children showed counts above 10^2 CFU/mL. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* were identified in the all three types of samples. Regarding the positive samples for fungi, we identified the genera *Aspergillus* in 32, 100 and 78 % of samples of human milk, infant formula and milk-based products. *Penicillium* was identified from 39, 13 and 11 % of the human milk, infant formula and milk-based products samples positives for filamentous fungi. *Trichoderma* were identified from 25, 9 and 22 % of the human milk, infant formula and milk-based products positives samples. Despite the deterioration that can cause, filamentous fungi in human milk and infant foods can enable the production of mycotoxins, if toxigenic species are present, which are hazardous for the babies.

Keywords: fungi, food safety, human milk, infant formula.

1. Introduction

Human milk is the best food for children from birth to 6 months of age (WHO, 2009). However, when breastfeeding is not possible or desired, infant formulas are an adequate substitute to human milk (ALLES et al., 2004). Milk and milk-based products are major nutrients for children. Quality and safety aspects of infant foods are of key importance for child health, but oftentimes they do not get much attention by health care professionals whose interest tends to focus on functional benefits of early nutrition (KOLETZKO et al., 2012).

Infant foods are commonly based on cow's milk formulations and starchy gruels (WEISSTAUB; UAUY, 2012). Food products, including powdered infant formula, are not sterile but may contain viable microorganisms, including pathogens such as *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* or *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) that can cause serious infections in infants (TURCK, 2012; KOLETZKO et al., 2012). Every single infant formula ingredient must have an excellent quality and safety approach because even if an ingredient is used in very small quantities in a single product, serious consequences may arise if the product quality and safety are not taken seriously by the manufacturer (HAMRIN; HOEFT, 2012). Despite infant formula and milk powders be reasonably safe products, any failure during processing may favor the occurrence of a product with poor microbiological quality (KREY; SOUZA 2009). However, while most studies have focused on bacterial contamination of human milk and infant foods, few have focused on its fungal contamination, leaving a gap in the literature regarding this information.

Milk, both human and nonhuman, is an extremely complex biological matrix that contains thousands of nutritional components (NEVILLE; JENSEN, 1995). Therefore, it is considered an ideal substrate for fungal growth (NOVAK et al., 2002). Breast milk is neither a sterile product, and microorganisms can multiply when the milk is not handled properly. Additional exogenous contamination should be prevented. Strict hygiene and careful temperature and time control are important during the expression, collection, transport, storage, and feeding of human milk (COSSEY et al., 2011).

Filamentous fungi are extremely versatile, most species can assimilate any carbon source derived from food. Most also are indifferent with respect to nitrogen sources and can use nitrate, ammonium ions and organic nitrogen. Yeasts and molds are very

resistant to adverse conditions such as acidic pH and low water activity (a_w). Most yeasts presents minimal a_w for growth in the range of 0.88 while filamentous fungi can develop in substrates with an a_w of 0.80 (da SILVA et al., 2007).

Fungi of the genus *Aspergillus* are widely distributed in the world, but mainly occur in subtropical and tropical regions. The species of *Penicillium* are capable of developing into a wider range of temperatures than *Aspergillus* species, however, are more abundant in temperate regions (FREIRE et al., 2007).

The major toxigenic genera are *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* and the main mycotoxins produced by these three genera are aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 , G_2), ochratoxin A, fumonisin, zearalenone and trichothecenes (deoxynivalenol, nivalenol, T_2 and HT_2). Aflatoxins can be produced mainly by four *Aspergillus* species: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* and *A. pseudotamarii*. Two additional aflatoxins, M_1 and M_2 , are products of the hydroxylation of aflatoxin B_1 in the liver, are excreted in the milk of lactating animals and are often found in dairy products. Aflatoxins B_1 and M_1 are human carcinogens, classified in the group 1 (IARC, 2002). Ochratoxin A is produced mainly by *A. carbonarius* and *Penicillium verrucosum* and is considered a possible human carcinogen, classified in the 2B group by IARC (CAST, 2003; IARC, 1993).

The microbiological quality of foods intended for consumption by children, especially for infants hospitalized in Neonatal Intensive Care Units (NICUs) is a subject of interest to public health, since these children have low resistance to neonatal infections (SERAFINI et al. 2003). In addition, several species of fungi, especially the genus *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* can produce mycotoxins, secondary metabolites of their metabolism that may exert a wide variety of toxic effects (MAGAN; OLSEN, 2004).

This study aimed to evaluate the presence of fungi, especially filamentous, in foods intended for the consumption by children from birth to five years, including human milk, infant formula and milk-based products in order to contribute with information about the occurrence of these contaminants in foods intended for infants and children consumption.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Samples: (a) human milk (HM, $n=98$) were collected between February and August 2012 in the Human Milk Bank of Blumenau (HMBB), Blumenau city, SC State, southern Brazil. The samples were stored frozen until the time of analysis at the Mycotoxin and Food Contaminants Laboratory (Labmico) located in the Department of Food Science and Technology of Federal University of Santa Catarina, in Florianopolis city, Brazil. (b) infant formula (IF, $n=45$) and milk-based products (MBP, $n=15$) were obtained directly from the manufacturer and also randomly purchased from supermarkets and drugstores in Florianopolis city, SC, from August to December 2012 and stored in its own sealed packs at room temperature (± 20 °C), until analysis. Table 4.1 shows the characteristics of the collected samples.

Table 4.1 Characteristics of the food for infants and young children evaluated in the present study

Food	Sample	Type	Package	Brand	Amount	
					Product (g or mL)	<i>n</i>
<i>For infants</i>						
	Human milk	<i>in natura</i>	<i>in natura</i>	individual	20	98
	Infant formula ^a	powder	can	A, B, C	400	45
<i>For young children</i>						
	Milk-based products ^b	powder	can	D	400	15
	Total samples					158

^a bovine protein-based products for infants from birth to a year old; ^b bovine milk-based product with addition of vegetable oils for children from 1 to 5 years old

Reagents, culture media and others: peptone water, glucose, yeast extract, malt extract, agar and chloramphenicol was used to prepare the Yeast Extract Glicose Chloramphenicol Agar (YEGC) and the Malt Extract Agar (MEA) culture media.

Equipment and apparatus: autoclave (Phoenix), laminar flow (Veco), semi-analytical balance (CAB), stomacher (Marconi), incubator (Fanen), colony counter (Phoenix) and optical microscope (Olympus) were used to the analysis.

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Blumenau. All lactating donors who provided the human milk samples were informed about the content of this study and when

agreed to participate, an informed written consent was signed by both parties before inclusion in the study.

2.2 Methods

The analysis of yeasts and molds followed the ISO 6611:2004 recommendations, directed to enumeration of yeasts and molds in liquid milk, milk powder and other dairy products (ISO, 2004).

2.2.1 Isolation

Human milk: aliquots of 0.1 mL of human milk and two decimal dilutions in peptone water 0.1 % (10^{-1} and 10^{-2}) were plated in duplicate by spread plating technique, in Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YEGC) and incubated at 25 ± 1 ° C for 5 days.

Infant formula and milk-based products: portions of 25 g of each sample were diluted in 0.1% sterile peptone water and homogenized in stomacher for 2 minutes. From these solutions were prepared two decimal dilutions in peptone water 0.1 % (10^{-1} and 10^{-2}). Aliquots of 0.1 mL from each dilution were plated in duplicate by spread plating technique on Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YEGC) and incubated at 25 ± 1 ° C for 5 days.

2.2.2 Enumeration of yeasts and molds

The yeasts and molds enumeration was performed according to the ISO 7218:2007 and da Silva et al., 2007 recommendations. In summary, two plates of each sample containing from 15 to 150 colonies were selected for enumeration. The number of colonies from each plate was multiplied by the dilution factor and the final result was expressed by the mean obtained from the two plates in CFU/mL.

2.2.3 Identification of filamentous fungi genera

The filamentous fungi grown on YEGC plates were isolated in Malt Extract Agar (MEA) for the preparation of the slide cultures, according to Riddell (1950) and Weber & Pitt, (2000). The identification of the fungi genera was done microscopically according to Pitt & Hocking, (2009).

3. Results and Discussion

From the total 158 analyzed samples (HM, IF and MBP) of food targeted for children nutrition in their early days, the occurrence of filamentous fungi was observed in 28 (28.6%) of human milk samples, 23 (51 %) of infant formula and 9 (60 %) of milk-based products for young children. Table 4.2 presents the results of the enumeration of yeasts and molds in the human milk samples. Although not the focus of the study, it should be mentioned the high occurrence of yeasts in the human milk samples, that may come from the mother's skin and often cause maternal infections such as mammary candidosis, caused by *Candida* yeasts (JIMÉNEZ et al., 2008). Table 4.3 shows the occurrence of filamentous fungi isolated from the infant formula and milk-based products samples. None of these samples showed yeast growth.

Table 4.2 Enumeration of yeasts and filamentous fungi in the human milk samples ($n=98$)

Plate content	n (%) ^a	Contamination (CFU/mL)			
		<1 CFU/mL (est)	$>10^0 \leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^5$
Filamentous fungi + yeasts (%) ^b	22 (22)	na	na	na	Na
Yeasts		na	10	9	3
Filamentous fungi ^c		na	17	5	No
Only filamentous fungi (%) ^c	6 (6)	na	5	1	No
Only yeasts n (%)	41 (42)	Na	16	18	7
No fungal growth	29 (30)	29	na	na	Na

CFU: colony forming units; ^a percentages from the total 98 samples; ^b yeasts and filamentous fungi were enumerated separately; ^c estimated enumeration due to the lower number of colonies than the accuracy and repeatability range of the method (15-150 colonies); na: not applicable; no: no observed

Regarding human milk, the filamentous fungi isolated from the samples were identified as belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Paecilomyces* and *Cladosporium*, as shown in Table 4.4. Six (6 %) samples showed growth of more than one fungal genera. Clinically important fungi, such as those belonging to the genera *Microsporium*, *Trichophyton* and

Epidermophyton cited by Novak et al. 2002, to cause skin infections, were not found in human milk, indicating that the fungi observed in the samples were from environmental origin, as well from the food handled by donors (PITT; HOCKING, 2009). Figure 4.1 shows the macroscopic and microscopic aspects of isolated colonies.

Table 4.3 Occurrence of filamentous fungi in infant formula and milk-based products for young children

Sample	Brand	n	Positives for filamentous fungi (%)	Contamination range (CFU/ mL)			
				<1 CFU/mL (est)	>10 ⁰ ≤10 ²	>10 ² ≤10 ⁴	>10 ⁴ ≤10 ⁶
IF		45 ^a	23 (51)	27	14	4	no
	A	24	10 (42)	16	8	no	no
	B	13	7 (54)	9	4	no	no
	C	8	6 (75)	2	2	4	no
MBP	D	15	9 (60)	8	6	1	no

CFU: colony forming units; IF: infant formula; MBP: milk-based products; ^a total of infant formula samples; no: no observed

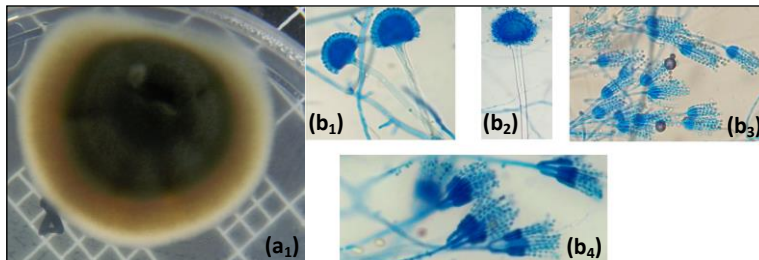


Figure 4.1 Macroscopic (a) and microscopic (b) aspects of *Aspergillus* (a₁; b₁; b₂) and *Penicillium* (b₃; b₄) genera isolated from the samples of human milk, infant formula and milk-based products for young children

There are few foods from which *Aspergillus* cannot be isolated consistently. *Aspergillus* species has been related to cause spoilage of a variety of food, such as tomatoes, grapes, cocoa, coffee beans, rice, maize, wheat and flours, processed meats, bread, peanuts and other oilseeds (PITT; HOCKING, 2009). Citrus and pome fruits are some of the preferred substrates of *Penicillium* species, but they can also grow in stored cereals, cheese, bread and fermented sausages (FILTENBORG et al., 1996). *Trichoderma* species have usually been considered to be soil

fungi, but the genus has been isolated from cassava, apples, peas, maize and nuts (PITT; HOCKING, 2009). *Alternaria* spp. and *Botrytis* spp. can cause spoilage of stone fruits, such as peaches, apricots, cherries and also of peas. *Alternaria* can damage tomatoes and eggplants and tropical fruits, like passionfruit and mangoes. *Paecilomyces* is a ubiquitous contaminant of foods and raw materials, specially raw materials containing oil, bacon, peanuts and peanut cake, margarine and cocoa beans. Although it has been isolated from cereals (LOIVEKE et al., 2004), bread and meat products. *Cladosporium* occurs mostly as a fresh fruit and vegetables pathogen. It was also isolated from cereals and frozen meat (PITT; HOCKING, 2009).

Table 4.4 presents the frequency of occurrence of each genera in the positive samples for filamentous fungi. It can be observed that human milk showed the greatest diversity of fungi genera, while the fungi isolated from infant formulas and milk-based products were limited to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*. Two samples of infant formula (4 %) showed co-occurrence of *Aspergillus* and *Trichoderma*, while the co-occurrence of *Aspergillus* and *Penicillium* was observed in 3 (6 %) samples of infant formula and in one (6 %) sample of milk-based product.

The presence of yeasts and molds in foods may indicate contamination originating from the environment or result of inadequate sanitary conditions during manipulation or processing (MISLIVEC et al., 1992). It should be mentioned that fungi spores, which are aerielly dispersed when plates are opened, make a serious source of laboratory contamination. Therefore, the occurrence of filamentous fungi in the low a_w samples such as infant formula and milk-based products (a_w 0.2), can be derived from environmental contamination during the analysis (PITT; HOCKING, 2009).

Table 4.4 Frequency distribution of the filamentous fungi genera isolated from foods for infants and young children

Genera	Human milk	Infant formula	Milk-based
	(n= 28)	(n=23)	products (n= 9)
	Positives (% ^a)	Positives (% ^a)	Positives (% ^a)
<i>Aspergillus sp</i>	9 (32.1)	23 (100)	7 (77.7)
<i>Penicillium sp</i>	11 (39.3)	3 (13)	1 (11.1)
<i>Trichoderma sp</i>	7 (25)	2 (8.7)	2 (22.2)
<i>Mucor sp</i>	2 (7.1)	no	no
<i>Alternaria sp</i>	1 (3.6)	no	no

<i>Botrytis sp</i>	1 (3.6)	no	no
<i>Paecilomyces sp</i>	1 (3.6)	no	no
<i>Cladosporium sp</i>	1 (3.6)	no	no
Other	2 (7.1)	no	no

^a percentages in brackets are referred to the total of positive samples for filamentous fungi; no: no observed

Almeida (1986), found a prevalence of filamentous fungi in 69.4 % of the human milk samples with counts reaching 10^6 CFU/mL. After employing the mammary gland hygiene with soap and water, the contamination declined to 16.7 %, with counts up to 3.0×10^2 CFU/mL. Novak et al. 2002, found the occurrence of yeasts and molds in 43 samples (5.2 %), with counts reaching 10^3 CFU/mL. The following microorganisms were identified: *Aspergillus niger* group (6.3 %), *Aspergillus sp.* (4.2 %), *Paecilomyces sp.* (12.6 %), *Penicillium sp.* (60.4 %), *Rhizopus sp.* (2.0 %), and *Syncephalastrum sp.* (14.5 %). Four samples showed the presence of more than one filamentous fungi type. Serafini et al. 2003, found contamination in 43 samples (22 %) of crude human milk, and in 37 (25.7 %) for pasteurized milk, a worrying result indicating possible environmental contamination after pasteurization or ineffectiveness processing. The presence of pathogenic fungi in pasteurized human milk suggests that this could be a source of infection to newborns during lactation and also to early exposure to mycotoxins (SERAFINI et al., 2003).

Regarding infant formula and milk-based products, the results showed that the presence of yeasts and molds in these products does not represent a public health problem. The low occurrence of fungi in these products is perhaps explained by its low water activity and moisture content, which hinders the development of fungi (BREEUWER et al., 2003). However, when contamination occurs, it is usually related to the presence of microorganisms in the processing environment, such as external parts of equipment and surroundings of the processing lines, presenting the possibility that they may get into the processing lines (CAC, 2008).

4. Conclusion

While most studies in human milk and infant foods have focused on bacteria contamination, a few of them have focused on its fungal

contamination, especially by molds, leaving a gap in the scientific literature about this subject.

In expressed human milk, the microbiological contamination may be derived from the organisms coming from the mother skin or from the material used to its collection and storage (breast pump components and milk flasks) and also from the environment where the milk is expressed and exposed. According to Novak et al. 2002, it is likely that the fungal spores present in foods handled by milk donors are the source of fungi contamination detected in human milk, as their characteristics are very similar to those of food deteriorating fungi.

If it is considered that human milk is submitted to Holder pasteurization (62.5 °C for 30 minutes) in the Human Milk Banks and the filamentous fungi sensitive to this procedure will then disappear, the problem would be over, but when it comes to the transfer of the raw product to hospitalized premature babies in NICUs, it becomes essential to comply with collection, storage and transportation conditions so that they can avoid the consequences of the presence and multiplication of such contaminants in human milk.

The presence of some microorganisms is indicative that a food have been exposed to conditions that pose an increased risk that the food may be contaminated with a pathogen or having been held under conditions that would allow pathogen proliferation.

The results showed that the presence of yeasts and molds in infant formula and special milks does not represent a public health problem. The low occurrence of fungi in these products is perhaps explained by its low water activity (± 0.2) and moisture content, which hinders the development of fungi (BREEUWER et al., 2003). However, one of the difficulties of this study was to find other data on the occurrence of yeasts and molds in infant formula and milk-based products for children and also the lack of regulated microbiological limits to yeasts and molds in these products, as well in human milk. In Brazil, according to RDC N° 12, infant formula and milk powders for children have regulation just for coliforms, coagulase positive *Staphylococci*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* sp. Breast milk from human milk banks, has regulation for Mesophilic Aerobic Bacteria, coliforms, coagulase positive *Staphylococci* and *Salmonella* sp (BRASIL, 2001).

References

ALLES, M. Current trends in the composition of infant milk formulas. **Current Paediatrics**, v. 14, n. 1, p. 51–63, 2004.

ALMEIDA, J.A.G. **Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite humano** [Dissertação de mestrado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análise microbiológica para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de setembro de 2003.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 de janeiro de 2001.

BREEUWER, P.; LARDEAU, A.; PETERZ, M.; JOOSTEN, H. M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 967 – 73, 2003.

CAST. **Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems**. Ames Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003, 217p.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC) (2008). Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children CAC/RCP 66. Disponível em: http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP_06_6e.pdf. Acesso em: 26 mar 2013.

COSSEY, V.; JEURISSEN, A.; THELISSEN, M.J.; VANHOLE, C.; SCHUERMANS, A. Expressed breast milk on a neonatal unit: a hazard analysis and critical control points approach. **American journal of infection control**, v. 39, n. 10, p. 832–8, 2011.

DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. F. de A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 2007, 295p.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 85–102, 1996.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007, 48p.

HAMRIN, P.; HOEFT, B. Quality control throughout the production process of infant food. **Annals of nutrition & metabolism**, v.60, n. 3, p. 208–10, 2012.

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

_____. **Some traditional herbal medicines**: some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization, Lyon, France, v. 82, p. 1–556, 2002.

International Organization for Standardization (ISO). ISO 7218:2007. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations**. International Organization for Standardization, 66p, 2007.

_____. ISO 6611:2004 (IDF 94: 2004) **Milk and milk products: enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds - colony-count technique at 25 degrees C**. International Organization for Standardization, 2 ed, 8p, 2004.

JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; MALDONADO, A.; MARTÍN, R.; OLIVARES, M.; XAUS, J. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious

mastitis during lactation. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4650–5, 2008.

KOLETZKO, B.; SHAMIR, R.; ASHWELL, M. Quality and safety aspects of infant nutrition. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 60, n. 3, 179–84, 2012.

KREY, T.; SOUZA, C. F. V. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite em pó integral produzido numa indústria da região do vale do taquari - RS. **Interbio**, v.3, 2009.

LOIVEKE, H.; ILUMAE, E.; LAITAMM, H. Microfungi in grain and grain feeds and their potential toxicity. **Agron Res**, v.2, p.195–205, 2004.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in Food**: detection and control. Boca Raton: Woodhead Publishing, 2004, 471p.

MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M.A. Yeasts and molds. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F., editors.

Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington (DC): American Public Health Association, p. 239-49, 1992.

NEVILLE, M.C.; JENSEN, R.G. The Physical Properties of Human and Bovine Milks. **Handbook of milk composition**. Academic Press, 1995.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; SANTOS, M. J. S.; WANKE, B. Contaminação do leite humano ordenhado por fungos miceliais. **J Pediatr (Rio J)**, v.78, p.197-201, 2002.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. New York: Springer, 2009, 519 p.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950.

SERAFINI ÁB, ANDRÉ MCDPB, RODRIGUES MA V, KIPNIS A, CARVALHO CO, CAMPOS MRH. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite Microbiological quality of human

milk from a Brazilian milk bank. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p.775–9, 2003.

TURCK, D. Safety aspects in preparation and handling of infant food. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 60, n. 3, p. 211–4, 2012.

WEBER, R.W.S.; PITT, D. Teaching techniques for mycology: Riddell's slide cultures. **Mycologist**, v. 14, n. 3, p. 118–20, 2000.

WEISSTAUB, G.; UAUY, R. Non-breast milk feeding in developing countries: challenge from microbial and chemical contaminants. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 60, n. 3, p. 215–9, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2009). **Infant and young child feeding**. Model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. Geneva, Switzerland: WHO Press.

Considerações finais

- A ausência de micotoxinas no leite humano das lactantes participantes do estudo pode ser um indicativo que os lactentes amamentados ou receptores de leite humano através do Banco de Leite Humano de Blumenau não sejam expostos à aflatoxina M₁ (AFM₁), ocratoxina A (OTA) e deoxinivalenol (DON) pela ingestão do leite humano. No entanto, as micotoxinas poderiam estar presentes em quantidades inferiores ao limite de detecção (LOD) do método, o que pode ter sido a causa da não detecção destes compostos no leite humano analisado.
- Embora tenha sido relatado o consumo habitual de alimentos propensos à contaminação por micotoxinas pelas lactantes, a ausência de AFM₁, OTA e DON nas amostras de leite humano impediu a correlação entre o consumo alimentar das lactantes e a presença de micotoxinas no leite humano. Entretanto, a ausência de micotoxinas nas amostras analisadas pode também indicar o consumo de alimentos de elevada qualidade, livres de micotoxinas, pelas lactantes.
- A hipótese da ocorrência de DON no leite humano, levantada pela observação de um pico cromatográfico característico de DON em amostras de leite humano (níveis <LOD) e, sobretudo, pela confirmação de sua identidade através de espectrometria de massas, sugere que sejam realizados novos estudos sobre este tema, utilizando métodos com LOD e LOQ mais baixos para a detecção e confirmação desta micotoxina em leite humano nos menores níveis possíveis.
- Esta foi a primeira investigação sobre a ocorrência de micotoxinas em leite humano em Santa Catarina e os resultados obtidos dão margem para futuros estudos, como a investigação da presença de demais micotoxinas de importância em alimentos, como fumonisinas e zearalenona, bem como a adoção de metodologias contemplando LODs e LOQs mais baixos.
- A detecção de AFM₁ em fórmulas infantis e produtos à base de leite para alimentação infantil, embora em baixos níveis, sugere que estes produtos podem ser uma fonte para a exposição de lactentes e crianças de até 5 anos à AFM₁. Devido à sua elevada toxicidade, a presença de AFM₁ em alimentos destinados ao

consumo infantil é uma grande preocupação. Portanto, o monitoramento desses produtos deve ser constante, pois a formulação e os ingredientes utilizados na sua produção sofrem constantes alterações, o que pode ocasionar mudanças na qualidade do produto final.

- A diversidade de composição e de ingredientes utilizados na produção de fórmulas infantis foi a causa de uma das dificuldades durante a análise de micotoxinas por LC-MS/MS. Cada produto apresentou comportamento distinto durante o preparo e concentração da amostra, sobretudo na etapa de limpeza por *Solid Phase Extraction* (SPE), onde muitas amostras entupiam o cartucho, tornando a análise lenta. O desenvolvimento de uma metodologia robusta para a extração de micotoxinas em fórmulas infantis de diferentes composições, pode relver este problema.
- A utilização de LC-MS/MS permitiu a análise de AFM₁, OTA e DON em uma única corrida cromatográfica, promovendo a confirmação dos compostos através dos fragmentos obtidos para cada micotoxina.

	Presunto													
	Salsicha													
Fígado de galinha (patê de fígado)														
Churrasco														
Leite e derivados														
Leite bovino														
Leite em pó														
Nata														
Queijo														
Iogurte														
Leite fermentado														
Manteiga														
Sorvete														
Chocolate														
Frutas														
Maçã														
Uva														
Banana														
Tomate														
Verduras e legumes														
Folhas verdes														
Repolho														
Brócolis/ couve flor														
Cenoura														
Alho/cebola														
Pimentão														
Bebidas														
Café														
Chá	Saquinho													
	A granel													
Chimarrão														
Cevada														
Suco de frutas														
Cerveja														
Vinho														
Refrigerante	Tradicional													
	Diet													
	Light													
	Zero													
OBSERVAÇÕES:														