

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO
CENTRO-OESTE**

FRANCISCO JOSÉ MENDES DOS REIS

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 e G2, e METAIS
PESADOS EM FÓRMULAS INFANTIS COMERCIALIZADAS NO ESTADO DE
MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

CAMPO GRANDE

2023

FRANCISCO JOSÉ MENDES DOS REIS

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 e G2 e METAIS
PESADOS EM FÓRMULAS INFANTIS COMERCIALIZADAS NO ESTADO
DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Valter Aragão do Nascimento

Co-orientação: Dr. Antonio Marcos Jacques Barbosa. Linha de pesquisa: Metabolismo Mineral. Área de concentração: Tecnologia em Saúde.

CAMPO GRANDE

2023

FRANCISCO JOSÉ MENDES DOS REIS

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 e G2 e METAIS
PESADOS EM FÓRMULAS INFANTIS COMERCIALIZADAS NO ESTADO
DEMATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

Banca examinadora:

Dr. Valter Aragao do Nascimento (FAMED/UFMS)

Dra. Aline Alves dos Santos Naujorks (LACEN/MS)

Dr. Bruno Spolon Marangoni (INFI/UFMS)

Dra. Danielle Bogo (Interno) (FACFAN/UFMS)

Dra. Elaine Silva de Padua Melo (FAMED/UFMS)

Dra. Karine de Cassia Freitas Gielow (FACFAN/UFMS)

Dra. Rita de Cassia Avellaneda Guimaraes ((FACFAN/UFMS))

Avaliação Final: Aprovado

Reprovado

Dedico esse trabalho aos meus pais, Romoaldo Reis e Corina Mendes,
que tanto me apoiaram e se dedicaram, pela minha vida e formação.
Aos meus irmãos Maria do Amparo e Romoaldo Mendes.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Valter Aragão do Nascimento pela recepção, orientação equilibrada, confiança em meu trabalho e pela oportunidade oferecida de aprendizado crescimento pessoal.

Ao Dr. Antonio Marcos Jacques Barbosa pela coorientação, ensinamentos prestados neste trabalho e pela valiosa oportunidade em adquirir conhecimentos em UPLC-MS/MS.

Agradeço ao Laboratório Central do Estado do Mato Grosso do Sul – LACEN/MS, em especial ao Diretor Luiz Henrique Demarchi, pela possibilidade de realizar este trabalho no Laboratório de Toxicologia, da Divisão de Bromatologia.

Às amigas sólidas que conquistei no LACEN/MS: Aline e Ruth Britts, grato pelo apoio e pela convivência tão harmoniosa e agradável.

Aos amigos do HUMAP/UFMS Claudio César da Silva, Elza Bercho, Claudia Lang, Maria Ducarmo, Mario Augusto, Rose, Arlene, Cleusa, Ademir, Cleonice, Denilson, Lurdes, Maria Madalena, Rosenir.

Pelas amigas antigas e adquiridas durante este período: Mairy, Eliza, Igor, Elaine, Henrique.

A todos os professores da UFMS que contribuíram para minha formação acadêmica.

A os funcionários da secretaria de pós-graduação Ademir e Sandro.

Em especial a minha prima- irmã Maria do Rosario pela sua força, generosidade e fé.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho, seja através de conselhos, conversas e àquelas que torcem por mim!!

A Deus, por todos os acontecimentos importantes em minha vida.

O atrativo do conhecimento seria pequeno se no caminho que a ele conduz não houvesse que vencer tanto pudor. Assim, não é a força mas a constância dos bons resultados que conduz os homens à felicidade.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

As fórmulas infantis constituem importante fonte de nutrientes para as crianças e em casos em que o aleitamento materno não é possível ou é insuficiente para garantir o devido aporte nutricional. As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que podem estar presentes em vários alimentos, inclusive nas formulas infantis, além disso, possuem em sua composição macro e microelementos essenciais para o desenvolvimento da criança, porém pode conter metais pesados que são prejudiciais à saúde. Assim como todo o alimento, as formulações infantis possuem propriedades térmicas que dependem da temperatura e interferem na qualidade e tempo de prateleira. Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo verificar a presença de aflatoxinas utilizando Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography – UHPLC* ou *UPLC*), assim como quantificar metais e metalóides através de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES), e estudar as propriedades térmicas utilizando análises termogravimétricas. Foram analisadas 87 amostras de fórmulas infantis de partida e seguimento, coletadas em 21 municípios do Estado de Mato Grosso do Sul no período de abril de 2021 a maio de 2022. De acordo com os resultados, nove (9) amostras apresentaram níveis detectáveis das aflatoxinas, sendo 5 amostras do tipo B2 e 4 amostras do tipo G2. Os seguintes elementos foram quantificados nas amostras infantis: Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V e Zn. Os valores de estimativa de ingestão diária excederam os valores das doses de referência (RfDs). Além disso, o As e Pb foram quantificados em várias amostras analisadas. Com exceção do As, alguns elementos apresentam risco não cancerígeno significativo para a saúde. Segundo os resultados termogravimétricos, o comportamento de degradação das amostras não são iguais devido as suas composições. Tais resultados apresentados neste trabalho são preocupantes e demonstram a importância do monitoramento dos órgãos regulatórios continua de aflatoxinas, metais pesados, propriedades térmicas em fórmulas infantis para a garantia da qualidade e preservação da saúde dos lactentes.

Palavras-chave: Aflatoxinas; Fórmula infantil; LC-MS/MS; metal pesado e metalóide.

ABSTRACT

Infant formulas are an important source of nutrients for children when breastfeeding is not possible or insufficient to ensure adequate nutritional support. However, mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi that may be present in various foods, including infant formulas, in addition, they have essential macro- and microelements in their composition for the child's development. Like all foods, infant formulations have thermal properties that depend on temperature and interfere with quality and shelf life. In view of the above, this work aimed to verify the presence of aflatoxins using an Ultra High Performance Liquid Chromatograph (Ultra-High Performance Liquid Chromatography - UHPLC or UPLC), as well as to quantify metals and metalloids through inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP OES), and study the thermal properties using thermogravimetric analysis. 87 samples of starting and follow-up infant formulas were analyzed, collected in 21 municipalities in the State of Mato Grosso do Sul from April 2021 to May 2022. According to the results, nine (9) samples showed detectable levels of aflatoxins, being 5 samples of type B2 and 4 samples of type G2. In addition, the following elements were quantified in infant samples: Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V and Zn. The estimated daily intake values exceeded the Reference Intake Values (RfDs). Furthermore, As and Pb were quantified in several analyzed samples. With the exception of As, some elements pose a significant non-carcinogenic health risk. According to the thermogravimetric results, the degradation behavior of the samples is not the same due to their compositions. The results presented in this work are worrying and demonstrate the importance of continuous monitoring by regulatory authorities on aflatoxins, heavy metals, thermal properties in infant formulas in order to guarantee the quality and preserve the health of infants.

Keywords: Aflatoxins; Infant formula; LC-MS/MS; heavy metal and metalloid.

SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AGPICL	Ácidos graxos de cadeia longa
ANVIS	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil
AFs	Aflatoxinas
AFM1	Aflatoxina M1
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
Al	Alumínio
As	Arsênio
Be	Berílio
B	Bismuto
Ba	Bário
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Cd	Cadmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CE	Comissão Européia
Co	Cobalto
COT	Comitê de Toxicidade de Produtos Químicos em Alimentos, Produtos de Consumo e Meio Ambiente
Cr	Cromo
CRENs	Centros de Recuperação e Educação Nutricional
Cu	Cobre
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos

DNSIYC	<i>Diet and Nutrition Survey of Infants and Young Children</i>
EUA	Estados Unidos da america
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro
g	Gramas
ICP-OES	Acrônimo do inglês para Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdneio
M	Molar
mM	Milimol
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
N ₂	Nitrogênio
Nb	Niobio
Ni	Níquel
OTA	Ocratoxina A
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pb	Chumbo

ppb	Parte por Bilhão
µg	Micrograma
Se	Selênio
seg	Segundo
rpm	Rotação por Minuto
R ²	Coefficiente de Correlação
RN	Recém nascido
RDI	Recomendações diárias de ingestão
NBCAL	Norma Brasileira para Comercialização de Alimentos para Lactentes
Sb	Antimônio
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
Te	Telurio
UL	Limite Superior Tolerável de Ingestão (Tolerable Upper Intake Level)
UV	Ultravioleta
USDA	Serviço de Inspeção de Grãos e Plantas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
V	Vanadio
WHO	<i>World Health Organization</i>
W	Tungstenio
Zr	Zirconio
Zn	Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cromatogramas no modo Full Scan com os tempos de retenção das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Condições do HRMS: Polaridade positiva, resolução 35000 FWHM, fluxo do gás principal 35u, fluxo do gás auxiliar 10u, sem fluxo para o contra gás, voltagem do spray 3,50 kV, temperatura do capilar 320°C, temperatura do gás auxiliar 350°C, e voltagem das lentes S 50V. A figura representa os cromatogramas dos padrões das AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2.....	48
Figura 2	Cromatograma obtido por Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometers (MS) para uma amostra de fórmula infantil: a) tempo de retenção de uma amostra de aflatoxina G2; b) tempo de retenção de uma amostra de aflatoxina B2.....	49
Figura 3	Autovalores (%) em função do número de componentes principais....	55
Figura 4	Gráfico de pontuação das componentes PC1 versus PC2: As, Cu, Mn Pb, Se e V.	56
Figura 5	Contribuição dos HQs dos elementos As, Cu, Fe, Mn, Pb, Se e Zn para os valores de HI, devido ao consumo de fórmula infantil por meninos e meninas.....	60
Figura 6	Curvas TG da decomposição térmica das fórmulas infantis. Os picos de decomposição de A1 a A5 são indicados em a) e de A6 a A10 em b).....	63
Figura 7	Curvas de análise de calorimetria exploratória de varredura (DSC) das amostras de fórmula infantil sob atmosfera de ar. Os picos principais de A1 a A5 são indicados em a) e de A6 a A10 em b).....	64
Figura 8	Curva de calorimetria. a) lactose cristalina e b) α -lactose amorfa.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições de digestão do leite.....	38
Tabela 2	Programa de digestão das fórmulas infantis em bloco.....	39
Tabela 3	Macro e microelementos avaliados nas fórmulas infantis.....	39
Tabela 4	Condições instrumentais e de operação do ICP-OES.....	40
Tabela 5	Teste de adição e recuperação.....	41
Tabela 6	Figuras de mérito do método de ICP-OES.....	41
Tabela 7	Peso corporal de crianças em diferentes faixas etárias.....	43
Tabela 8	Informações constantes na tabela de alimentação e dosagens recomendadas pelos fabricantes, utilizadas para o cálculo da taxa de ingestão.....	43
Tabela 9	Informação nutricional de fórmula infantil.....	44
Tabela 10	Valores de referência de toxicidade (RfD) para a via de exposição oral.....	45
Tabela 11	Número da amostra, tipos de aflatoxinas e concentração nas fórmulas infantis.....	50
Tabela 12	Aflatoxinas, limite de detecção e limites de quantificação.....	50
Tabela 13	Concentração de elementos quantificados (mg/kg) nas amostras de fórmulas infantis brasileiras.....	53
Tabela 14	Sumário obtido a partir da análise de PCA contendo as principais componentes (PC1 e PC2), autovalores e variâncias obtidos dos dados de amostras de fórmulas infantis.....	54
Tabela 15	Loadings: valores dos componentes principais PC1, PC2 e PC3.....	55
Tabela 16	Estimativa de ingestão diária (EDI) de metais pesados presentes em fórmula infantil.....	57
Tabela 17	Valores de referência para RDI, AI, UL e TDI.....	59
Tabela 18	Risco carcinogênico de As e Pb para lactentes de 0 a 6 meses, 6 a 12 meses e 1 a 3 anos.....	61
Tabela 19	Amostras com seus respectivos T_i (temperatura inicial), T_f (temperatura final) e $T_f - T_i$ (intervalo de reação).....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Fórmula infantil.....	18
2.2	Características particulares das crianças.....	20
2.3	Aflatoxinas.....	21
2.3.1	Limites máximos toleráveis de aflatoxinas.....	23
2.3.2	Pesquisa de aflatoxinas em alimentos infantis.....	24
2.4	Metais tóxicos em fórmulas infantis.....	26
2.5	Análise térmica.....	29
3.0	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Coleta de amostra.....	33
4.2	Quantificação de Aflatoxinas em fórmulas infantis.....	33
4.3	Etapa de extração de aflatoxina.....	34
4.4	Macro e microelementos nas fórmulas infantis.....	35
4.4.1	Digestão ácida da amostra para quantificação de macro e microelementos.....	35
4.4.2	Quantificação de macro e microelementos por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).....	36
4.5	Estimativa de risco não-carcinogênico (RNC).....	39
4.5.1	Estimativa de ingestão diária (EDI).....	39
4.5.2	Quociente de risco (HQ).....	42
4.5.3	Índice de perigo (HI).....	43
4.6	Estimativa de risco carcinogênico (CR).....	43
4.7	Análise térmica.....	43
4.8	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Quantificação de Aflatoxinas em fórmulas infantis.....	45
5.2	Macro e microelementos em fórmulas infantis.....	49

5.3	Avaliação de risco a metal pesado devido o consumo de fórmula infantil.....	53
5.4	Análise térmica.....	58
6	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	APÊNDICE.....	74

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório global da Organização das Nações Unidas (WHO, 2015) sobre doenças transmitidas por alimentos (DTA), várias pessoas adoecem todos os anos por consumir alimentos contaminados, e em alguns casos pode ocorrer morte como resultado da intoxicação. Além disso, neste relatório, ênfase é dada as crianças menores de 5 anos de idade, uma vez que são mais frágeis e correm um risco particularmente alto de morte causada por DTA todos os anos. De fato, quase um terço (30%) de todas as mortes por DTA ocorre em crianças menores de 5 anos, apesar de representarem apenas 9% da população global.

O relatório da WHO estima que a carga de DTA causadas por 31 agentes – bactérias, vírus, parasitas, toxinas e produtos químicos – afirma que a cada ano até 600 milhões, ou quase 1 em cada 10 pessoas no mundo, adoecem após consumir alimentos contaminados. Destes, 420.000 pessoas morrem, incluindo 125.000 crianças menores de 5 anos (WHO, 2022).

Segundo a WHO (2022), o que mais preocupa a saúde são as toxinas que ocorrem naturalmente e os poluentes ambientais. Neste cenário, embora as "Estimativas da carga global de doenças transmitidas por alimentos" da OMS sejam realizadas ao longo dos anos, são necessários mais estudos atuais e abrangente sobre o impacto de alimentos contaminados na saúde e no bem-estar.

As toxinas que ocorrem naturalmente incluem micotoxinas, biotoxinas marinhas, glicosídeos cianogênicos e toxinas que ocorrem em cogumelos venenosos. Alimentos básicos como milho ou cereais podem conter altos níveis de micotoxinas, como aflatoxina e ocratoxina, produzidas pelo mofo nos grãos. Neste caso, uma exposição prolongada pode afetar o sistema imunológico e o desenvolvimento normal ou causar câncer. Das aflatoxinas presentes em alimentos, as de grande importância e conhecidas em termos toxicológicos são as B1, B2, G1 e G2 (ASGHAR, M. A. ; AHMED, A. ; ZAHIR, E, 2017; SARTORI, A. V.; MATTOS, J. S.; MORAES, M. H, 2015; WARE *et al.*, 2017).

Os perigos químicos nos alimentos provém de fatores antropogênicos sendo portanto liberados no meio ambiente por indústrias, operações em lavouras de grande ou pequeno porte, alérgenos alimentares, resíduos de drogas e outros contaminantes incorporados nos alimentos durante o processo. De fato, a contaminação por metais pesados em alimentos ocorre principalmente pela poluição da água e do solo. Metais pesados como o chumbo, cádmio e mercúrio, assim como metaloides como As podem afetar o cérebro em

desenvolvimento de crianças, mesmo em níveis baixos, e têm sido associados ao Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) e ao autismo (NEME *et al.*, 2020). Assim como a carencia de ácidos graxos de cadeia longa (AGPCL) estão associados a algumas desordens neuropsiquiátricas, tais como esquizofrenia, depressão e TDAH. (DAVIS-BRUNO e TASSINARI, 2011).

Nos últimos anos, o plano da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA), *Closer to Zero* (FDA, 2022), foi identificar as ações para reduzir ao mínimo possível a exposição ao arsênio, chumbo, cádmio e mercúrio de alimentos consumidos por bebês e crianças pequenas. Priorizar os bebês e crianças pequenas é importante porque seus corpos e metabolismo menores os tornam mais vulneráveis aos efeitos nocivos desses contaminantes (FDA, 2021).

No Brasil, Segurança Alimentar e Nutricional é a garantia a todo cidadão do direito ao acesso regular e permanente a alimentos com qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica (BRASIL, 2019). Segundo a WHO, a segurança alimentar é uma responsabilidade compartilhada entre governos, produtores e consumidores, e tem como objetivo garantir que os alimentos que consumimos sejam seguros e saudáveis com a redução da carga de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo (WHO, 2021). Desse modo, é imprescindível a garantia da inocuidade de produtos de origem animal ou vegetal por meio do controle de resíduos, garantindo o direito universal à saúde do ser humano. O leite assim como muitos cereais constituem uma importante fonte de nutrientes para crianças e adultos. Entretanto, qualquer alimento pode conter micro-organismos como aflatoxinas, metais pesados e metalóides que podem comprometer a sua qualidade nutricional, propriedades químicas e físicas (ALVITO *et al.*, 2017; ASTOLFI *et al.*, 2021).

Em relação às propriedades químicas e físicas, as propriedades térmicas do leite têm sido estudadas nos últimos anos através do uso da calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) para a avaliação das mudanças na qualidade dos alimentos durante processamento e armazenamento, uma vez que as mesmas foram propostas com sucesso (ROOS, 2003; RAEMY, 2003). Além disso, as técnicas DSC e TGA também têm sido consideradas ferramentas poderosas para registrar as mudanças físicas que ocorrem durante a desidratação do leite por secagem, por pulverização e durante o armazenamento (ROOS, 2002; VUATAZ, 2002).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo identificar aflatoxinas em amostra de fórmula infantil para bebês e crianças pequenas na faixa de idade de 0 a 6 meses, 6 a 12 meses e de 1 a 3 anos; quantificar macro e microelementos nas fórmulas infantis;

identificar se estão dentro das recomendações diárias de ingestão (RDI) ou se acima do potencial Nível Máximo Tolerável de Ingestão (UL) e realizar os cálculos de estimativa de risco não carcinogênico e carcinogênico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fórmula infantil

O aleitamento materno é a mais importante e eficaz estratégia para a saúde da criança, reforçando vínculo, afeto e proteção, além de garantir a nutrição adequada. Constitui a maior e mais econômica intervenção para redução da morbimortalidade infantil. Além disso, permite um grandioso impacto na promoção da saúde integral da mãe e do bebê, repercutindo nos indicadores de saúde de toda a sociedade. A OMS recomenda que o aleitamento materno exclusivo (AME) ocorra até os seis meses e recomenda a prorrogação por dois anos de vida ou mais (WHO, 2003). Este alimento promove uma nutrição adequada, sendo considerado completo em nutrientes e componentes que atendem às necessidades específicas do recém-nascido, influenciando em sua habilidade de defesa às infecções, no desenvolvimento cognitivo, e ainda com implicações na saúde da mãe (SILVA; CRUZ, 2018).

A influência do *marketing* utilizado pelas indústrias sobre as práticas de alimentação infantil e suas consequências sobre o desmame precoce, a desnutrição e a mortalidade infantil tem se tornado uma preocupação da OMS e o UNICEF desde 1979, onde na Reunião Conjunta sobre “Alimentação do Lactente e Crianças Pequenas” em Genebra foi recomendada a criação de um conjunto de normas, fundamentadas em princípios éticos, para nortear a promoção comercial de substitutos do leite materno. A partir de então, o Código Internacional de Comercialização de Substitutos do Leite Materno foi desenvolvido e aprovado em 1981 pela Assembleia Mundial de Saúde (AMS) (ARAUJO *et al.*, 2006).

Em uma situação de impossibilidade de a criança receber leite materno, a fórmula infantil é indicada, por ser modificada especialmente para atender as necessidades nutricionais e as condições fisiológicas do lactente no primeiro ano de vida. No entanto, é importante considerar que os produtos industrializados destinados a lactentes não apresentam dois benefícios fundamentais, somente supridos pelo leite materno: o imunológico e o emocional (ARAUJO *et al.*, 2004). As fases iniciais da vida são sensíveis a fatores nutricionais e metabólicos, determinantes para a saúde e o bem-estar do indivíduo, acarretando consequências inclusive na vida adulta (ALVES, 2017). Atualmente, a opção recomendada para suplementação alimentar de crianças nascidas a termo saudável (recém-nascido cuja idade gestacional foi entre 37 semanas e 41 semanas e 6 dias) é a fórmula

infantil, que desempenha um papel indispensável na nutrição infantil (FIORAVANTI, 2020). A fórmula infantil é considerada um substituto do leite materno e pode ser adquirida tanto na forma líquida concentrada ou em pó, a qual tem que ser reconstituída com água antes de sua ingestão, ou na formulação líquida pronta para o consumo (ZINA, 2009).

Entre os motivos que levam à complementação alimentar precoce, isto é, antes dos seis primeiros meses, estão os fatores econômicos, culturais, baixa idade materna e uso de tabaco se destacam entre eles. Nesse contexto, as diferentes situações, nas quais há impossibilidade de se realizar o aleitamento materno, indica-se uso de fórmulas lácteas infantis, que possui composição nutricional adaptada à velocidade de crescimento da criança. Todavia, o leite de vaca em sua forma integral é contraindicado até os 12 meses de vida, em razão ao seu alto potencial alergênico e o excessivo conteúdo proteico. A ingestão de proteínas acima do recomendado pode trazer prejuízos à criança, dado que o excesso desse nutriente causa elevação da carga renal e hepática de soluto, onde sua metabolização é realizada pelos rins e fígado e sendo excretada na urina e fezes (BASTOS *et al.*, 2020). Assim como, o alto teor de gordura (3,25%) contido no leite integral poderá contribuir para o risco de obesidade infantil (VANDERHOUT *et al.*, 2020).

A vigilância contínua de monitoramentos é importante para manter as regras sanitárias essenciais, desta forma buscando garantir que os substitutos da amamentação e do leite materno sejam comercializados dentro de princípios éticos (JUNQUEIRA *et al.*, 2019). Em 1992, foi aprovada a Norma Brasileira para Comercialização de Alimentos para Lactentes (NBCAL), que regulamenta a comercialização desses alimentos. Em 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a resolução da diretoria colegiada (RDC)nº 727 de 1º de julho de 2022, que normatiza a promoção, comercialização e rotulagem dos alimentos para lactentes e crianças de primeira infância. Legislações que visam à proteção e ao incentivo à amamentação representam avanço significativo para a saúde deste público. Contudo, sabe-se que o contingente de fiscais da Vigilância Sanitária é pequeno para a realização da fiscalização de todos esses produtos (SILVA; DIAS; FERREIRA, 2008).

A RDC 360/03, norma da ANVISA sobre rotulagem, foi publicada em 23 de dezembro de 2003, com atualização 27 de março de 2020, mantém a informação nutricional obrigatória em todos os alimentos e bebidas embalados. Dessa maneira, as empresas teriam até 31 de julho de 2006 para se adequar às novas regras. Sendo assim, os fabricantes desses

produtos deveriam se atentar a determinadas condições para rotular sua produção de forma adequada (ANVISA, 2020).

Além da questão de rotulagem em produtos comercializados que envolvem as fórmulas infantis, existem os contaminantes como as aflatoxinas B1 e B2, produzidas por animais e geralmente excretadas no leite e urina de gado e de outras espécies de mamíferos que consumiram alimento ou ração contaminada por essas aflatoxinas (IQBAL, S.; ASI, M.R.; MALIK, N, 2017; KUMAR *et al.*, 2017).

2.2 Características particulares das crianças

Recém nascidos (RN) e crianças pequenas são considerados a população mais suscetível à aflatoxina devido às suas diferentes capacidades para eliminar a aflatoxina por processos bioquímicos. Muitos fatores nutricionais também tendem a ter influência na toxicidade das aflatoxinas, por exemplo, a exposição à aflatoxina provavelmente atrasará a recuperação em crianças da desnutrição protéica (BLANKSON; MILL-ROBERTSON, 2015; OUESLATI *et al.*, 2018).

Em virtude de sua imaturidade imunológica, o RN se torna mais vulnerável a infecções, sendo imprescindível a proteção conferida pelo aleitamento materno. Essa fragilidade torna-os ainda mais expostos a possíveis contaminações em fórmulas, que por ser fonte exclusiva de nutrição nos primeiros seis meses, é consumida em elevada quantidade, criando a possibilidade de que uma pequena quantidade de microorganismos (MO) cause

alguma patologia (MELLO; ROSA, 2018).

O desenvolvimento da desnutrição infantil geralmente coincide com a introdução de alimentos complementares durante o desmame. Entretanto, esses alimentos complementares também podem estar contaminados por agentes microbiológicos (bactérias e fungos) e toxinas ambientais (toxinas bacterianas, toxinas fungais, como micotoxinas, metais e seus complexos e produtos químicos orgânicos) (ACHAGLINKAME; OPOKU; AMAGLOH, 2017). Portanto, a ingestão de alimentos contaminados representa uma importante via de exposição a riscos químicos, em particular, para as crianças. Os lactentes e as crianças pequenas são mais susceptíveis às toxinas do que os adultos devido ao menor peso corporal, maior taxa metabólica, menor capacidade de desintoxicação do que os

adultos e devido ao desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos, tal como, o sistema nervoso central (ALVITO *et al.*, 2010, WHO, 2007).

A aflatoxina, dependendo do nível de exposição, além de contribuir para o baixo peso ao nascer e comprometimento do crescimento, alterar a imunidade e provocar retardo mental em crianças, induz mudanças no fator da proteína de crescimento semelhante à insulina e na inibição da biodisponibilidade mineral. Segundo uma pesquisa americana, existem fortes associações entre a exposição à aflatoxina e reduções significativas do crescimento em crianças conforme avaliação da altura e peso para idade (GROOPMAN *et al.*, 2014).

2.3 Aflatoxinas

Aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários carcinogênicos (STASIEWICZ *et al.*, 2017), produzidos principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (ARROYO-MANZANARES *et al.*, 2015; RAMA *et al.*, 2015) em alimentos como amendoim, grãos de milho, cereais e alimentos para animais (WACOO *et al.*, 2014). Foram descobertas em 1960, após a morte de perus na Europa, causada pela alimentação com torta de amendoim contaminada por *A. flavus* (RAMOS; BRASIL; GERALDINE, 2008). Além disso, as aflatoxinas foram estruturalmente identificadas no início da década de 1960 e nos últimos 40 anos, a toxicologia destes compostos tem sido amplamente estudadas (WILD; TURNER, 2002). Conforme estudos, as aflatoxinas representam um grupo de aproximadamente 20 metabólitos, embora normalmente somente as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (PINTO VIEIRA *et al.*, 2007) sejam encontradas como contaminantes diretos em alimentos (DU *et al.*, 2017). Os tipos mais importantes de aflatoxinas ocorrem naturalmente em produtos agrícolas são aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2) (WU *et al.*, 2016). Portanto, tais aflatoxinas constituem-se as mais conhecidas e estudadas do ponto de vista toxicológico (GONÇALEZ *et al.*, 2004).

As aflatoxinas tornam-se uma preocupação em termos de saúde humana, pois a exposição prolongada a esses compostos tóxicos pode ser relacionados a uma ampla gama de efeitos adversos para a saúde, como a dilatação dos vasos sanguíneos periféricos, hipotensão, urticária, redução da imunidade, e promoção de alguns tipos de câncer, especialmente carcinomahepatocelular (SHAHBAZI; NIKOUSEFAT; KARAMI, 2017). O

A. flavus produz apenas aflatoxina B1 e B2, enquanto as *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, que são classificadas como cancerígenas do grupo 1 (NIDHIANA *et al.*, 2017). Além disso, segundo classificação da Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer, as aflatoxinas que apresenta o maior potencial cancerígeno para o fígado em mamíferos é a aflatoxina B1 (AFB1), sendo portanto consideradas como cancerígena do Grupo 1 (PLEADIN *et al.*, 2015, NIAN *et al.*, 2018).

A aflatoxina M1 (AFM1) é o metabólito hidroxilado de AFB1, e pode ser encontrado especialmente no leite e outros produtos lácteos quando os animais lactantes são alimentados com ração contaminada. As aflatoxinas ligam-se covalentemente ao DNA podendo causar mutações nos genes supressores tumorais (por exemplo no gene P53) ou proto-oncogenes, originando assim um hepatocarcinoma (CRISTO *et al.*, 2015).

A presença de AFM1 em leite e produtos lácteos comercialmente disponibilizados e a elevada ingestão destes produtos pela população humana pode ter implicações negativas para a saúde dos consumidores, especialmente para lactentes e crianças (GOLGE, 2014). De fato, conforme estudos realizados no Zimbábue, a redução de cerca de 40% da expectativa de vida está relacionada à presença de micotoxinas nos alimentos consumidos pela população (MURASHIKI *et al.*, 2017).

A AFB1 é rapidamente absorvida no trato digestivo e principalmente metabolizado por seres vivos, convertendo-o em AFM1, que por sua vez é excretado no leite bovino (RAMA *et al.*, 2016). A AFM1 é muito estável em relação ao processamento normal do leite e métodos como a pasteurização e o aquecimento de temperaturas ultra-altas ou outros procedimentos da indústria de laticínios, e se presente no leite cru, a molécula AFM1 não pode ser inativada e pode persistir no produto final, destinado ao consumo humano (ROMA *et al.*, 2017; DIMITRIESKA-STOJKOVIC *et al.*, 2013). Portanto, devido à sua elevada estabilidade a vários tipos de tratamentos térmicos, tais como tratamento de pasteurização e ultra-alta temperatura (UHT), a presença de AFM1 em leite e produtos lácteos é uma séria preocupação (IQBAL; ASI; MALIK, 2017).

A ingestão de AFB1 está associada a uma alta incidência de cânceres de fígado, mama, próstata e gastrointestinal em humanos; a desnutrição protéico-energética em crianças; bem como ligado à progressão da infecção pelo HIV, especialmente em países de baixa renda (SINEQUE; MACUAMULE; DOS ANJOS, 2017). A ocorrência de várias micotoxinas potencializam seus efeitos de danos à saúde (BOLECHOVÁ *et al.*, 2015). Até a presente data, 18 AFS foram identificadas, incluindo a AFB1, do grupo tóxico (ZHENG *et*

al., 2017; ANFOSSI *et al.*, 2015) mais importante, o qual é muitas vezes encontrado na alimentação animal (ZHENG *et al.*, 2017). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), 25% das culturas alimentares mundiais podem ser afetadas por micotoxinas a cada ano (HUONG *et al.*, 2016).

Desde 1985, a Agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) restringiu a quantidade de micotoxinas permitida em produtos alimentares. O Serviço de Inspeção de Grãos e Plantas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), implantou um laboratório de serviços para Inspeção de micotoxinas em grãos. Além disso, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceram muitas toxinas presentes em produtos agrícolas (KUMAR *et al.*, 2017).

O maior problema decorre da ação crônica das aflatoxinas no homem, pois além da alteração do crescimento em jovens e crianças, ocasionam distúrbios neurológicos, imunológicos e o aparecimento de câncer hepático (DO AMARAL *et al.*, 2006). O milho é um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos. As micotoxinas passíveis de serem encontradas em milho são produzidas principalmente por espécies dos gêneros *Fusarium* (fumonisinas e zearalenona), *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxina) e *Penicillium* (ocratoxina) (OLIVEIRA, 2016). A exposição dos humanos as aflatoxinas carcinogênicas são elevadas e a exposição crônica a aflatoxinas atingiu 4,5 bilhões de pessoas (MOORE *et al.*, 2017). No entanto, a intensidade das doenças depende do mecanismo de ação para cada tipo de AF, a extensão da exposição, idade e estado nutricional (ASGHAR *et al.*, 2017).

A estimativa da exposição é um dos elementos de avaliação de risco e leva em consideração a ocorrência e concentrações de micotoxinas na dieta, os padrões consumo, bem como o valor de consumo correlacionado com os alimentos contendo micotoxinas. Com valores estimados da exposição dietética as avaliações poderiam ser determinadas para diminuir os riscos em humanos (HESHMATI *et al.*, 2017).

2.3.1 Limites máximos toleráveis de aflatoxinas

Devido à sua toxicidade e ao seu efeito especialmente para as crianças, a Comissão Européia (CE) definiu o nível máximo permitido para AFM1 em 0,05 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ e 0,025 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ em leite e fórmula infantil, respectivamente (SHUIB *et al.*, 2017). O *International*

Agency for Research on Câncer (IARC) classificou as aflatoxinas como uma substância natural que reconhecidamente podem causar câncer (GLORIA *et al.*, 2006).

Segundo levantamentos, existem mais de 500 milhões de pessoas, principalmente na África subsaariana, bem como em partes da América Latina e a Ásia que estão expostas à aflatoxina B1 em concentrações que aumentam substancialmente a mortalidade e morbidade. Exposições entre 20 e 120 µg/kg de peso corporal por dia resulta em aflatoxicosis aguda quando consumida durante um período de 1-3 semanas. Os sintomas incluem vômitos e dor abdominal, resultando na morte, especialmente em crianças (MCMILLANA *et al.*, 2018).

Em decorrência dos efeitos tóxicos e cancerígenos da aflatoxina em alimentos contaminados, o departamento de agricultura dos EUA (USDA) e *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceram o limite de tolerância de 20 ppb em alimentos. Países da União Europeia (UE) permitem concentração de ppb muito menor de aflatoxinas. Neste caso, é visível que os níveis aceitos de toxinas são variáveis para cada alimento em diferentes países (SARMAL *et al.*, 2017).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 88, de 2021, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabeleceu o limite máximo tolerado (LMT) de aflatoxina B1, B2, G1 e G2, em fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância, de 1µg/kg no alimento tal como ofertado ao consumidor (ANVISA, 2021).

Embora exista normativa quanto a qualidade de alimentos como fórmulas infantis, uma vigilância adequada e verificações frequentes são fundamentais para garantir padrões de qualidade e segurança para matérias-primas destinadas ao consumo direto ou aos processos industriais. Como um resultado, as autoridades públicas e as agências reguladoras estão levando produtores, fabricantes e pesquisadores a prestar séria atenção para os processos de produção alimentar e desenvolvendo políticas abrangentes de qualidade e sistemas de gestão para melhorar a segurança alimentar e tentar aumentar a informação do consumidor para recuperar a confiança dos consumidores nos alimentos. Para atender aos requisitos regulamentares, industriais, profissionais de controle oficial de alimentos e os pesquisadores no campo devem enfrentar cada vez mais a evolução contínua dos aspectos regulamentares na UE e em nível nacional (CHELI *et al.*, 2014).

2.3.2 Pesquisa de aflatoxinas em alimentos infantis

Nos últimos anos, estudos abordaram a presença de aflatoxinas em alimentos destinados ao público infantil, como resultados, em alguns países foi constatado a presença de micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxina A e fumonisinas em 248 fórmulas infantis produzidas pelos Centros de Recuperação e Educação Nutricional (CRENs) e vendidas nos mercados de Burkina Faso (WERE *et al.*, 2017).

Oveisi e colaboradores determinaram a ocorrência natural e os níveis de AFM1 em amostras de leite líquido pasteurizado, fórmula infantil e alimentos de desmame à base de leite consumidos em Teerã, Irã. Os resultados foram obtidos através testes ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), os quais indicaram que de total um total de 328 amostras pesquisadas, 96,3% correspondeu a presença de AFM1. Em geral, a quantidade de AFM1 em 100 (78%) amostras de leite líquido e 24 (33%) de alimentos à base de leite foi superior ao limite máximo de tolerado pela legislação Europeia, mas em todas as amostras de fórmula infantil foi inferior Comunidades Europeias e Codex Alimentarius prescreveu um limite de 50 ng/kg para AFM1 no leite e 25 ng/kg em produtos lácteos infantis (OVEISI, 2007).

Nasir e colaboradores (2021) investigaram a exposição de crianças com idade de 3 a 5 anos a aflatoxinas pertencentes de diferentes classes socioeconômicas da cidade de Multan, no Paquistão, no qual utilizaram biomarcadores urinários para aflatoxinas através do método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Além disso, foram realizadas medidas antropométricas, hemograma completo e testes de função hepática dos mesmos grupos de crianças. Os resultados demonstraram que 11% das amostras de urina foram positivas para aflatoxinas. A presença de aflatoxinas nas amostras de urina e o mau estado de saúde das crianças legitimaram a necessidade de vigilância da contaminação por aflatoxinas dos alimentos para recém-nascidos e o desenvolvimento de intervenções centradas principalmente na sensibilização para as questões particularmente relacionadas com a segurança alimentar (NASIR *et al.*, 2021).

Na China, um estudo considerando 820 alimentos infantis à base de cereais comercializados e utilizando o método de cromatografia líquida de ultra performance e detecção com espectrometria de massa (UPLC-MS/MS), detectou 12 micotoxinas, incluindo desoxinivalenol (DON), ácido tenuazônico (TeA), enniatina A (ENA), zearalenona (ZEN), enniatina B1 (ENB1), alternariol (AOH), enniatina B (ENB), alternariol nonometil éter

(AME), enniatina A1 (ENA1), fumonisina B1 (FB1), ocratoxina A (OTA) e fumonisina B2 (FB2). Uma ou mais micotoxinas foram encontradas em 73,7% de todas as amostras, 71,2% em alimentos infantis industrializados (cereais infantis, bolachas infantis e macarrão infantil) e 82,3% em cereais comuns (farinha de trigo, arroz e milho) para consumo infantil. Alimentos infantis à base de trigo estavam contaminados com mais variedades de micotoxinas do que os alimentos infantis à base de arroz. No geral, a exposição dietética de DON, ZEN, FB1, FB2, OTA e TeA por ingestão de alimentos infantis à base de cereais foi considerada aceitável (quociente de risco <1). No entanto, a exposição dietética estimada de AME e AOH ultrapassou o limite de preocupação toxicológica de 0,0025 µg/kg peso corporal/dia, o que confirmou a necessidade de mais estudos para avaliar os riscos potenciais à saúde dos lactentes (JI *et al.*, 2022).

Em países como a Nigéria, um estudo avaliou os riscos micotoxicológicos do consumo de alimentos complementares por bebês e crianças pequenas. Vinte e oito principais micotoxinas derivadas, e outros 109 metabólitos microbianos, incluindo cloranfenicol (um metabólito bacteriano), foram quantificados em 137 amostras de alimentos por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). Aflatoxinas e fumonisinas apareceram simultaneamente em 42% das amostras de alimentos à base de cereais e nozes, em concentrações médias para alimentos infantis processados superiores aos limites da UE de 0,1 e 200 µg/kg em 300 e seis vezes, respectivamente. Além disso, amostras de leite continham principalmente vericina, cloranfenicol e zearalenona. Os tricotecenos, toxinas T-2 e HT-2, foram quantificados apenas em fórmula infantil e em níveis três vezes acima do nível recomendado pela UE de 15 µg/kg em alimentos para bebês. Por outro lado, a exposição crônica a estimativa para aflatoxina carcinogênica foi alta, causando baixa margem de exposição (MOE). Exposições a outras micotoxinas excederam os valores de referência estabelecidos em várias vezes ou revelaram MOEs baixas, apontando para riscos de saúde importantes nesta população altamente vulnerável. As misturas de micotoxinas observadas podem aumentar ainda mais riscos de resultados adversos à saúde da exposição, o que deixa claro a necessidade urgente de intervenções regulatórias (OJURI *et al.*, 2018).

Em outro estudo, cinquenta produtos à base de cereais destinados a bebês e crianças foram adquiridos no varejo na região da Grande Acra em Accra Metrópole, distrito de Gana no período de junho a setembro de 2013, nos quais incluíam arroz, milho, trigo, aveia, milho à base de leguminosas e grãos mistos. Foi utilizado o procedimento de extração

envolvendo mistura solvente de acetonitrila-água seguida de etapa de limpeza da coluna de imunoafinidade e HPLC com detecção de fluorescência e derivatização pós-coluna (sistema de células Kobra). Das amostras de alimentos processados à base de cereais testadas, 72% estavam contaminadas com todos os quatro tipos de aflatoxina, ou seja, aflatoxina B1, B2, G1 e G2. No geral, os valores médios de aflatoxina foram registrados nas amostras de grãos à base de arroz, à base de milho, à base de trigo, à base de milho, à base de leguminosas e grãos mistos. Os resultados mostraram que 96% dos alimentos processados destinados a lactentes continham níveis de AFB1 superiores aos limites permitidos da União Europeia, enquanto 52% dos alimentos à base de cereais excederam o limite máximo para AFB1 e para aflatoxinas totais (BLANKSON; MILL-ROBERTSON, 2015).

Uma vez que os leites sintéticos provem de outros produtos, principalmente aqueles naturais, o mesmo pode ser contaminado por micotoxinas e até mesmo por medicamentos veterinários. De fato, um estudo constatou a presença de micotoxinas e resíduos de medicamentos veterinários em várias fórmulas infantis, além de 337 contaminantes, incluindo pesticidas. O método foi validado de acordo com os regulamentos europeus e aplicado na análise de 54 amostras de fórmulas infantis. A zearalenona foi encontrada em 55,5% das amostras e α -zearalenol em 16,6% das amostras. Mais de 49 agrotóxicos, 11 resíduos de medicamentos veterinários e 5 micotoxinas foram provisoriamente identificadas via análise retrospectivas baseadas em uma biblioteca de espectros de massas. Esses resultados destacaram a necessidade de uma avaliação cuidadosa de contaminantes em fórmulas infantis, considerando que se destinam a uma parte vulnerável da população (IZZO *et al.*, 2022).

Um estudo brasileiro avaliou o risco à saúde da população infantil pela ocorrência de AFM1 em leite UHT, leite em pó e fórmulas infantis. Neste caso, a determinação de AFM1 foi realizada em 60 amostras e a avaliação da exposição à micotoxina foi realizada através da determinação da ingestão diária estimada (IDE), enquanto a caracterização de risco foi avaliada com o cálculo do risco. Segundo autores, os valores obtido devido a exposição para AFM1 foram considerados abaixo da margem de segurança. Porém, esses resultados apontam para um potencial risco à saúde da população infantil brasileira exposta à AFM1 em produtos lácteos (CONTEÇOTTO *et al.*, 2021). Pesquisa realizada pelo país vizinho ao Brasil, o Paraguai, no qual Arrúa e colaboradores em uma área metropolitana de Asunción (Paraguai) encontram que 100 % das amostras de fórmulas para leite foram positivas para AFM1. Já as fórmulas na forma em pó para crianças de 0 a 6 meses e para

crianças de 6 a 12 meses apresentaram 9,75% e 2% de resultados positivos, respectivamente, para a presença de AFM1 (ARRUA *et al.*, 2021).

2.4 Metais tóxicos em fórmulas infantis

Os metais e outros elementos podem estar presentes nos alimentos naturalmente ou como resultado de atividades humanas, como práticas agrícolas e processos industriais. Alguns desses elementos são nutrientes essenciais que precisamos obter de nossa dieta, enquanto outros podem ser prejudiciais à saúde. Os alimentos infantis (fórmulas, alimentos para desmame, bebidas, etc.) são comercializados para consumo por um grupo particularmente sensível da população e muitos novos produtos e fórmulas aparecem frequentemente nas prateleiras. Assim, a concentração de metais e outros elementos em alimentos infantis devem ser monitorada através de pesquisas para garantir a segurança daqueles que os consomem (EFESA, 2023).

Desde 2006 que alguns estudos têm sido realizados monitorando a concentração de elementos químicos nas fórmulas infantis (FOOD STANDARDS AGENCY, 2006). Na época, o Comitê de Toxicidade de Produtos Químicos em Alimentos, Produtos de Consumo e Meio Ambiente (COT) concluiu que os níveis encontrados não preocupavam a saúde de crianças. No entanto, a combinação de um mercado em rápida mudança e uma população-alvo sensível significa que há necessidade de atualizar as informações existentes sobre a composição desses produtos.

Em estudos realizados no Reino Unido em 2014, envolvendo uma parcela representativa do mercado de fórmulas infantis e alimentos para desmame (247 amostras) adquiridas em diferentes locais e varejistas, assim como 50 alimentos que não são especificamente fabricados ou destinados a lactentes, mas são frequentemente consumidos por lactentes (os chamados “alimentos não específicos para lactentes”), como pão e banana, também foram analisados quanto aos mesmos elementos na pesquisa. Os alimentos selecionados pela Agência de Normas Alimentares foram baseados naqueles que fazem a maior contribuição para a dieta infantil, conforme registrado na Pesquisa de Dieta e Nutrição de Lactentes e Crianças Pequenas (*Diet and Nutrition Survey of Infants and Young Children*, DNSIYC), juntamente com os primeiros alimentos recomendados pelo Departamento de Saúde, considerando os alimentos para a faixa de 8-9 meses e 12 meses. De acordo com os resultados da pesquisa, todas as amostras analisadas continham Alumínio (Al), Antimônio (Sb), Arsenio (As) total, As inorgânico (nas amostras que continham ≥ 10

$\mu\text{g}/\text{kg}$ de arsênio total), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Iodo (I), Ferro (Fe), Chumbo (Pb), Manganês (Mn), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Selenio (Se), Estanho (Sn) e Zinco (Zn) (BRERETON, 2014).

Um estudo realizado em 2014, Sipahi e colaboradores, mostrou através de técnicas analíticas que existe a presença de elementos como Al, Pb e Ca em 63 fórmulas infantis. Além disso, os níveis desses metais nas amostras do estudo foram comparados com os limites aceitáveis de metais pesados tóxicos e as doses diárias recomendadas (RDAs) de oligoelementos essenciais. De acordo com os resultados, os níveis de metais tóxicos quantificados nas fórmulas estavam dentro dos limites aceitáveis, com exceção dos níveis de Al em 8 das 63 amostras. Em 16 amostras, os níveis de Mn excederam $600 \mu\text{g}/\text{dia}$, e o teor de Cr em 7 amostras foi superior a $5,5 \mu\text{g}/\text{dia}$, sendo esses valores os níveis de ingestão adequados para lactentes. Os níveis de cobalto (Co) em 10 fórmulas foram superiores ao RDA. Portanto, segundo estes achados, existem indícios que indicam que os níveis de metais nestas fórmulas infantis são mais elevados do que os encontrados no leite materno, o qual deve ser o preferido para a alimentação infantil. Baseado em tais resultados, os autores enfatizam que uma vez que os bebês são potencialmente mais suscetíveis a metais, os alimentos infantis devem ser monitorados regularmente e verificados quanto à contaminação por metais tóxicos, bem como para os níveis de oligoelementos essenciais (SIPAHI *et al.*, 2014).

Estudos realizados na Turquia utilizando Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) revelaram que algumas marcas de fórmulas infantis contêm metais pesados como o Pb, Cd, As e Hg em 36 amostras, assim como o cálculo do índice de perigo também foi realizado. Neste trabalho, os dados de consumo de fórmula infantil de 268 bebês foram considerados na faixa etária de 0 a 24 meses e considerando o método de recordatório alimentar de 24 horas. Além disso, calculou-se a ingestão diária estimada (EDI), o quociente de risco-alvo (THQ) e o índice de risco (HI). Segundo resultados, os níveis médios de Pb, Cd, As, e Hg da fórmula infantil foram determinados em 0,025, 0,002, 0,021 e 0,0001 mg/kg, respectivamente. As exposições médias de As, Cd, Hg e Pb para todas as faixas etárias foram calculadas como 0,29, 0,03, 0,001 e 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/dia, respectivamente. De acordo com os valores de HI, os resultados indicam a possibilidade de possíveis problemas de saúde para bebês na faixa etária de 0 a 6 meses (BAŞARAN, 2022).

Embora alguns estudos como destacamos anteriormente quantifiquem elementos como o arsênio outros não o fazem, o motivo muitas vezes devido a metodologia, ou a baixa concentração deste elemento na amostra. Em um estudo realizado por pesquisadores italianos, foram analisados 40 elementos em fórmulas infantis em pó autorizadas e comercializadas na Itália, além disso uma estimativa devido a ingestão de alguns metais pesados tóxicos pelos lactentes foi realizada para avaliar possíveis riscos à saúde. Dentre os elementos, podemos destacar a quantificação da Be, B, Al, Zr, Nb, Sb, Te, W, V, Cr e As os quais estavam abaixo do limite de detecção em mais de 30% das amostras. Os níveis dos outros elementos mostraram-se muito variáveis. Os resultados foram semelhantes aos relatados por outros estudos da União Europeia (UE), mas diferentes daqueles recuperados fora da UE. Essas diferenças devem ser eliminadas para garantir o direito à saúde em todo o mundo. As concentrações de Cd, Mn, Ni, Pb e Zn nas fórmulas infantis estudadas estiveram sempre abaixo dos limites considerados. No entanto, é importante verificar se há elementos potencialmente tóxicos nas fórmulas infantis para proteger a saúde dessa população sensível (ASTOLFI *et al.*, 2021).

Diante deste exposto, estudos envolvendo a quantificação de Al, As, Cd, Sn, Hg, Pb e U em fórmulas infantis brasileiras são uma preocupação. Segundo estudo realizado por Almeida *et al.*, (2022a), a presença de Al, As, Cd, Sn, Hg, Pb e U em fórmulas infantis comercializadas no Brasil, e baseado nos cálculos de quociente de risco (*target hazard quotients*, THQ) e Risco de Câncer Alvo (TCR) para avaliar o risco potencial de toxicidade para crianças que consomem, o conteúdo de arsênio nas fórmulas infantis mostrou um THQ > 1, indicando possíveis riscos à saúde de recém-nascidos ou crianças. Riscos carcinogênicos mínimos foram observados para os elementos considerados carcinogênicos, assim como as interações metabólicas e nutricionais também foram discutidas. Portanto, os autores deixam claro que existe a necessidade de melhorar a vigilância da fórmula infantil em relação à contaminação por elementos potencialmente tóxicos e carcinogênicos (ALMEIDA *et al.*, 2022a). Além disso, em outro estudo realizado por Almeida *et al.*, (2022b), foi quantificado a presença de elementos como Ca, Mn, Mg, Na, K, P, Fe, Zn, Cu, Cr, Mo, Se, I e Co.

De acordo com Domínguez e colaboradores, 2017, considerando fórmulas infantis para crianças de 6 a 12 meses quantificaram 9 minerais (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Cr, B, Ba, Ni, L, V, Sr, Mo, Mn, Al, Cd e Pb) em um total de 30 amostras de fórmulas infantis de 15 marcas diferentes por espectroscopia óptica de emissão atômica com plasma

acoplado indutivamente (ICP-OES). De acordo com os resultados, elementos como o Ca foi majoritário com concentração média de 4544 mg/kg de peso úmido. Quanto aos oligoelementos, destaca-se o Fe (55,9 mg/kg). A concentração média encontrada para Pb (0,07 mg/kg) supera o limite máximo estabelecido na legislação europeia. As fórmulas analisadas cobrem as necessidades diárias de quase todos os elementos essenciais. A ingestão de Pb a partir do consumo recomendado pelo fabricante significa que o Pb contribui com 233% da Ingestão Diária Tolerável (TDI). As fórmulas infantis atendem às necessidades nutricionais das crianças, embora a concentração de Pb possa representar um risco à saúde infantil (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2017).

O excesso de metais pesados em alimentos pode causar danos à saúde, além disso, a presença de vários metais em alimentos pode influenciar em sua estabilidade e qualidade, assim como a presença de ácidos graxos saturados e insaturados podem também interferir na estabilidade térmica. (ANVISA, 2010; TAVARES, 2010; FARIA *et al.*, 2002) Diante do exposto, se faz necessários estudos que realizem tais pesquisas para termos conhecimento do papel de cada composto na saúde e qualidade de alimentos.

Embora existam trabalhos em diversos países que quantificaram metais pesados e metaloides em fórmulas infantis, ainda são escassos estudos envolvendo outras faixas de idade como de 1 a 3 anos, e principalmente estudos que associem a composição mineral destas fórmulas com a decomposição térmica e composição de ácidos graxos.

2.5 Análise térmica

As propriedades ou adulterações de fármacos, produtos químicos, biomateriais e principalmente alimentos podem ser estudadas utilizando técnicas como a análise térmica. De certa forma, podemos conceituar a análise térmica como um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma amostra, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura estabelecidos pelo operador, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica (ar sintético ou nitrogênio), também é submetida a uma programação controlada (MATOS; FELSNER, 1998). Estas técnicas permitem obter informações com respeito à variação de massa, assim como a estabilidade térmica que na química de alimento podemos relacionar com o tempo de prateleira; água livre; água ligada; pureza, ponto de fusão, ponto de ebulição, calores de transição, calores específicos, diagramas de fase, cinética da reação, estudos de catalisadores, transições vítreas, entre outras (ANDRADE JR, 2015).

Em uma pesquisa utilizando a análise térmica para estudar o comportamento térmico de diversas fórmulas infantis (leite em pó para bebês) em decorrência da decomposição, assim como análises dos componentes que se formariam, e principalmente os processos químicos que ocorrem em decorrência da perda de massa, os gráficos termogravimétricos (TG) podem fornecer tais informações com grande precisão. Além disso, tais resultados podem ser correlacionados com os efeitos térmicos nas curvas DTA (Análise Térmica Diferencial). Neste contexto, o estudo da decomposição térmica de proteínas, caseína, lactose e ácidos graxos podem ser estudados, onde correlações podem ser realizadas, ou seja, envolvendo a massa residual resultante como produto final da decomposição térmica controlada com os resíduos obtidos por calcinação na determinação de cinzas. Assim, a análise térmica dos sortidos de leite em pó tem potencial de mostrar as diferenças entre o teor de água que evaporou na primeira etapa da análise térmica, a quantidade de lactose, proteína e ácidos graxos (DIPPONG *et al.*, 2015).

Vale lembrar que as fórmulas enriquecidas em ácido docosahexaenóico (*docosahexaenoic acid*, DHA) são extremamente propensas à oxidação, o que representa o risco de expor o lactente a produtos nocivos de degradação. Não apenas os Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs) presentes têm um alto grau de insaturação (VENKATARAMAN *et al.*, 2004), mas a adição de pró-oxidantes como o ferro para atender aos requisitos nutricionais (COMMISSION DELEGATED REGULATION, 2015) também representa um desafio para a estabilidade do produto final. Os hidroperóxidos são os primeiros produtos de oxidação e são muito reativos, decompondo-se rapidamente em aldeídos, cetonas e outros voláteis. Vale lembrar que esses produtos secundários da oxidação lipídica são responsáveis pela rancidez e sabores indesejáveis (CLARKE *et al.*, 2020). Por outro lado, os sabores oxidados são perceptíveis no leite armazenado em baixos níveis de oxidação (valor de peróxido <1 meq.O₂/kg de óleo). Os atributos “peixe” e “metálico” são correlacionados com concentrações aumentadas de hexanal e heptanal e demonstraram ser particularmente evidentes na fórmula de leite infantil enriquecida com LC-PUFA (CESA *et al.*, 2015). Além disso, vários produtos da oxidação lipídica (como radicais livres, espécies reativas de oxigênio e aldeídos) podem exercer efeitos prejudiciais em processos biológicos vitais, potencialmente levando a lesões teciduais e aumentando o risco de doenças degenerativas (DAOUD *et al.*, 2020).

Como citamos anteriormente, as fórmulas infantis são produtos à base de leite, adaptados à composição do leite humano. Portanto, para garantir a segurança

microbiológica e longa vida útil, as fórmulas infantis geralmente passam por tratamento térmico rígido. Como consequência da composição especial e do regime de aquecimento, as fórmulas infantis são

mais propensas a reações de degradação induzidas termicamente do que os produtos lácteos comuns. As reações de degradação observadas durante o processamento do leite compreendem a lactosilação produzindo o produto de Amadori (lactosil-lisina), a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e produtos de degradação de açúcar sem proteína, bem como oxidação de proteínas ou lipídios.

Como observamos anteriormente, vários métodos foram desenvolvidos para estimar o impacto do calor aplicado durante a fabricação de fórmulas infantis, incluindo métodos indiretos, como análise de fluorescência, bem como a análise de produtos de reação definidos (BRANDÃO, DOS ANJOS, BELL, 2017). A maioria dos estudos confirma um maior grau de danos nas fórmulas infantis em comparação com os produtos lácteos comuns (BRANDÃO, DOS ANJOS, BELL, 2017). As diferenças entre vários tipos de fórmulas infantis, como fórmulas líquidas, em pó ou hipoalergênicas, dependem dos marcadores e marcas analisados. Uma porção considerável de produtos de degradação de proteínas em fórmulas infantis pode ser evitada quando os parâmetros do processo e a qualidade dos ingredientes são cuidadosamente controlados (VENKATARAMAN *et al.*, 2004; COMMISSION DELEGATED REGULATION, 2015; CLARKE *et al.*, 2020;). Nos últimos anos, novas fórmulas estão surgindo, dentro deste contexto, as consequências nutricionais dos produtos de degradação térmica em fórmulas infantis são amplamente desconhecidas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, metais pesados e comportamento térmico de fórmulas infantis comercializadas no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

3.2 Específicos

- Quantificar as aflatoxinas encontradas nas fórmulas infantis utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa;
- Indicar os teores das aflatoxinas em amostras de fórmulas infantis;
- Quantificar Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V e Zn nas fórmulas infantis utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado;
- Realizar a estimativa de risco de ingestão diária e risco carcinogênico;
- Comparar os resultados da estimativa de risco com os valores estabelecidos para RfD, RDI, UL e TDI;
- Avaliar o comportamento térmico das fórmulas infantis por meio de métodos de análise térmica.
- Implantar método multirresíduos para o monitoramento das aflatoxinas no Laboratório Central de Mato Grosso do Sul.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostra

Um total de 87 amostras de fórmula infantil foram coletadas em estabelecimentos comerciais do Mato Grosso do Sul (supermercados e farmácias) no período de abril de 2021 a maio de 2022 pela Vigilância Sanitária do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. As amostras coletadas foram embaladas e transportadas para o Laboratório Central (Lacen/MS). As amostras de fórmulas infantis foram coletadas de acordo com o regulamento nº 401/2006 (Comissão Européia), que estabelece métodos de amostragem e análise para o controle oficial dos níveis de micotoxinas em alimentos.

Para a realização deste estudo, foram utilizados os produtos designados como fórmula infantil de segmento para lactente e criança de primeira infância (0 a 6 meses), fórmula infantil de segmento para lactente e criança de primeira infância (6 a 12 meses), fórmula infantil de segmento para criança de primeira infância (1 a 3 anos), de diferentes marcas.

O total de 87 amostras foram utilizadas para a quantificação e monitoramento de aflatoxinas. Essas mesmas amostras foram classificadas por marca e faixa etária, por meio da realização de pool de amostras de mesma marca e mesma faixa etária, formando assim um novo grupo amostral denominados de A1 a A10. Essas amostras (A1-A10) foram utilizadas para a realização da quantificação de macro e microelementos por ICP OES e análise térmica.

4.2 Quantificação de aflatoxinas em fórmulas infantis

As soluções padrões foram preparadas diluindo 0,005 g dos materiais de referência em acetonitrila grau HPLC a uma concentração de 500 µg/mL. Soluções estoque (SE) das aflatoxinas B1 (99,3% de pureza), B2 (99,3% de pureza), G1 (98% de pureza) e G2 (99,2% de pureza) (Supelco - Sigma-Aldrich) foram preparadas individualmente em diferentes concentrações. Em seguida, preparou-se uma solução estoque na concentração de 10 µg/mL em acetonitrila. As concentrações das soluções estoque foram determinadas por espectroscopia UV/Vis (UV-2600i, Shimadzu) usando o *AOAC International Standard* (2005). Posteriormente, foram realizadas diluições das soluções padronizadas para obtenção de uma concentração intermediária de 200 ng/mL.

Todas as soluções estoque foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alíquotas dessas soluções (200 ng/mL) foram diluídas e completadas para 20 ng/mL. Portanto, diluições dessas soluções foram usadas para preparar as curvas de calibração para cada aflatoxina. A determinação de aflatoxinas em fórmulas infantis foi realizada pelo método analítico multiresíduo que emprega o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) para extração de micotoxinas. O procedimento foi realizado de acordo com as etapas de extração de Quechers utilizadas por Sartori *et al.* (2015), com modificações.

A aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1 e aflatoxina G2 foram determinadas usando Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha, modelo Ultimate 3000) e *Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometers* (MS) (Thermo-Fisher, Estados Unidos). O UltiMate 3000 opera em taxas de fluxo de 20 mL/min a 10 mL/min e possui uma fonte de ionização por eletropulverização aquecida (HESI) operando no modo positivo. A pressão máxima foi de 1000 bar com vazões de até 8 mL/min; Ajustes foram realizados conforme o fabricante quanto a utilização das bombas binárias, quaternárias e de duplo gradiente, e taxa de aquisição de sinal de 200 Hz. Como os UltiMate 3000 XRS são sistemas UHPLC-MS quaternários projetados para otimizar o desempenho de pequenas colunas de partículas por serem capazes de trabalhar com pressões de até 1250 bar, uma coluna C18 foi utilizada no processo de separação cromatográfica de aflatoxinas (150 mm x 4,6 mm x 80 Å) e tamanho de partícula 5 μm (11% de carbono). A temperatura da coluna foi mantida a 35°C durante toda a corrida cromatográfica. A fase móvel utilizada foi composta por uma solução aquosa de formato de amônio 5 mM/1% de ácido acético (fase A) e metanol (fase B). O gradiente de eluição começou com 25% da fase móvel B, aumentando para 100% em 4 min e mantido em 100% por 1,5 min. O sistema foi reequilibrado por 2 min em 25% da fase móvel B. A vazão foi mantida em $0,3\text{ mL min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 100 μL usando o loop no “modo complete”.

4.3 Etapa de extração de aflatoxina

Pesou-se 1,5 g de fórmula infantil em um tubo de centrifugação de 50 mL, foi adicionado 15 mL de água ultrapura e o tubo foi agitado por 30s. A seguir, 10 mL de hexano e 15 mL de acetonitrila (1% ácido acético, v/v) foi adicionado, e foi novamente agitado por 30s. Uma mistura de 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de cloreto de sódio foi adicionado, e o tubo foi imediatamente agitado vigorosamente utilizando um vortéx por 1

minuto e centrifugado a 3000 rpm por 7 minutos. A camada superior hexânica foi removida. Todo o procedimento foi executado conforme etapas de extração Quechers utilizado por SARTORI *et al.*(2015), com modificações.

Como etapa final, uma alíquota de 5 mL da fase acetonitrila foi evaporado até secura em evaporador a 50 °C sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de água acidificada (ácido fórmico 0,5%, v/v) e mantido em banho de ultrassom por 2min. A seguir, a solução foi filtrada diretamente em vial, utilizando filtro de polietileno com grau de filtração de 0,22 micras, para posterior injeção no cromatógrafo.

4.4 Macro e microelementos nas fórmulas infantis

4.4.1 Digestão ácida da amostra para quantificação de macro e microelementos

Uma massa de 300 mg de cada amostra de leite, foi pesada diretamente em tubo de borosilicato de 25 mm e adicionado 2 mL de ácido nítrico (Merck - Darmstadt, Alemanha) a 65%, 1 mL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck - Darmstadt, Alemanha) e 1 mL de H₂O ultrapura (Tabela 1). Os tubos foram homogeneizados em agitador do tipo vortex (Biomixer QL-901), tampados com um funil de borosilicato de 50 mm (dedo frio) e inseridos em um blocodigestor (Tecnal). As condições de tempo e temperatura estão demonstradas na Tabela 2. A digestão foi realizada em triplicata para as amostras de leite, branco e para o teste de adição e recuperação (spike). Após a digestão, as amostras foram transferidas para um tubo de polietileno e reconstituídas para um volume final de 10 mL com água ultrapura.

Tabela 1. Condições de digestão do leite.

Reagente	Massa / Volume
Amostra	0,3 g
HNO₃	2 mL
H₂O₂	1 mL
H₂O	1 mL

Tabela 2. Programa de digestão das fórmulas infantis em bloco.

Estágio	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	80	30
2	100	30
3	150	60
4	200	30

4.4.2 Quantificação de macro e microelementos por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

A quantificação dos macro e microelementos nas amostras de leite foram realizadas através da espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado - ICP OES (modelo iCAP 6300, Thermo Scientific), utilizando uma visão axial para Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V e Zn e radial para Mg, utilizando gás argônio com 99.999% de pureza.

Os elementos avaliados neste estudo e seus respectivos comprimentos de onda utilizados estão descritos abaixo na Tabela 3. As condições de operação do ICP-OES estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 3. Macro e microelementos avaliados nas fórmulas infantis.

Elementos	Comprimento de onda (nm)
Al	167,079
As	189,042
Ba	455,403
Cd	228,802
Co	228,616
Cr	283,563
Cu	324,754

Fe	259,940
Mg	279,553
Mn	257,610
Mo	202,030
Ni	221,647
Pb	220,353
Se	196,090
V	309,311
Zn	213,856

Tabela 4 . Condições instrumentais e de operação do ICP OES.

Parâmetros	Configuração
Potência da rádio frequência	1150 W
Fluxo do plasma	12 L min ⁻¹
Taxa de fluxo da amostra	0,30 L min ⁻¹
Fluxo auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Nebulizador	20 psi
Integração	15 (s)
Estabilização	20 (s)
Número de repetições	3

A curva de calibração externa foi construída com cinco concentrações diferentes de cada um dos elementos: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/L. A curva foi preparada a partir da diluição de uma solução padrão estoque (SpecSol, Quimlab) contendo 100 mg/L de cada elemento.

A exatidão do método de quantificação de minerais por ICP-OES, foi validado por teste de adição e recuperação, no qual 0,5 mg/Kg de cada um dos elementos analisados foi adicionado à uma amostra e a recuperação calculada após a quantificação (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de adição e recuperação.

Elementos	Recuperação (%)
Al	94
As	90
Ba	92
Cd	91
Co	84
Cr	86
Cu	90
Fe	92
Mg	99
Mn	85
Mo	94
Ni	84
Pb	88
Se	89
V	90
Zn	89

Os limites de detecção, quantificação e coeficiente de correlação obtidos são listados na tabela 6. Com relação à validação, o limite de detecção (LOD) foi calculado considerando três vezes o desvio padrão do branco e dividido pela inclinação da curva analítica, além disso, o limite de quantificação (LOQ) foi obtido considerando dez equações de calibração externa e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Figuras de mérito do método de ICP OES.

Elementos	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	(R^2)
Al	0,0075	0,0249	0,9970
As	0,0055	0,0184	0,9996
Ba	0,0023	0,0077	0,9997

Cd	0,0006	0,0019	0,9990
Co	0,0009	0,0029	0,9996
Cr	0,0034	0,0113	0,9994
Cu	0,0056	0,0187	0,9995
Fe	0,0109	0,0364	0,9997
Mg	0,0010	0,0034	0,9995
Mn	0,0008	0,0025	0,9997
Mo	0,0011	0,0037	0,9996
Ni	0,0010	0,0033	0,9996
Pb	0,0045	0,0151	0,9991
Se	0,0033	0,0108	0,9997
V	0,0029	0,0095	0,9997
Zn	0,0031	0,0102	0,9996

LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação e R² - coeficiente de correlação.

4.5 Estimativa de risco não carcinogénico (RNC)

4.5.1 Estimativa de ingestão diária (EDI)

A estimativa de ingestão diária (EDI) de metais pesados nas fórmulas infantis expressa em mg/kg/peso corporal/dia, foi calculada para a exposição via ingestão oral, considerando o peso médio de meninos e meninas nas faixas etárias de 0-6 meses, 6-12 meses e 1-3 anos (Tabela 7). Assumimos que o leite era fornecido exclusivamente por fórmulas infantis. A EDI foi calculada de acordo com a Eq. 1.

$$EDI = \frac{C \times ID}{Pc} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:

C = concentração máxima do metal pesado na fórmula infantil (mg/kg);

ID = ingestão diária (kg/dia). Estipulada com base nas informações constantes no rótulo das fórmulas infantis e apresentada na Tabela 8 (capacidade de massa de uma colher, multiplicado pelo número de colheres necessárias para o preparo de 1 mamadeira,

multiplicado pelo número máximo de mamadeiras recomendadas por dia pelo fabricante para cada faixa etária);

Pc = peso corporal (kg) .

Tabela 7. Peso corporal de crianças em diferentes faixas etárias.

Faixa etária	Meninos	Meninas
	<u>Peso médio (kg)</u>	<u>Peso médio (kg)</u>
6 meses	7,9	7,3
1 ano	9,6	8,9
3 anos	14,61	14,42

Fonte: OMS, 2023.

Tabela 8. Informações constantes na tabela de alimentação e dosagens recomendadas pelos fabricantes, utilizadas para o cálculo da taxa de ingestão.

Amostra	Faixa etária	Massa correspondente a 1 colher (kg)	Número de medidas rasas	Número de mamadeiras por dia
A1	0-6	0,00436	7	5
A2	0-6	0,00450	7	5
A3	0-6	0,00443	7	5
A4	0-6	0,00460	7	4
A5	6-12	0,00490	7	4
A6	6-12	0,00470	7	5
A7	6-12	0,00470	7	5
A8	1-3	0,00490	7	4
A9	1-3	0,00470	7	3
A10	1-3	0,00460	7	3

Fonte: Rótulos das embalagens das fórmulas infantis.

Na Tabela 9, é apresentado um exemplo de rótulo com as informações nutricionais de fórmulas infantis utilizadas na pesquisa. O produto foi a fórmula infantil para lactentes (para crianças de 0 a 6 meses).

Tabela 9 – Informação nutricional de fórmula infantil.

	Por 100 g de pó	Por 100 mL de fórmula reconstituída
Valor energético	472K cal	67 K cal
Carboidratos	58 g	8,3 g
Lactose	44 g	6,2 g
Proteínas	11 g	1,5 g
Gorduras totais	22 g	3,1g
Gorduras saturadas	8,0 g	1,1 g
Gorduras trans	0 g	0 g
Ácido linoleico	3,1 g	0,4 g
Ácido α -linolênico	380 mg	54 mg
Fibra alimentar	2,9 g	0,4 g
Fruto-oligossacarídeos (FOS)	0,29 g	0,04 g
Galacto-oligossacarídeos	2,6 g	0,4 g
Sódio	240 mg	34 mg
Cálcio	550 mg	78 mg
Ferro	7,8 mg	1,1 mg
Potássio	625 mg	89 mg
Cloreto	320 mg	45 mg
Fósforo	310 mg	44 mg
Magnésio	60 mg	8,5 μ g
Manganês	60 μ g	8,5 μ g
Iodo	150 μ g	21 μ g
Cobre	360 μ g	21 μ g
Selênio	11 μ g	1,6 μ g
Zinco	5,6 mg	0,80 mg
Vitamina A	570 μ g RE	81 μ g RE
Vitamina D	11 μ g	1,5 μ g
Vitamina E	11 mg α TE	1,5 mg α TE
Vitamina K	45 μ g	6,4 μ g
Vitamina C	75 μ g	11 mg
Vitamina B1	1,0 μ g	0,14 mg
Vitamina B2	1,2 mg	0,17 mg
Niacina	5,0 mg	0,71 mg
Vitamina B6	0,58 mg	0,08 mg

Vitamina B12	1,5 µg	0,21 µg
Ácido fólico	130 µg	18 µg
Ácido Pantotênico	6,4 mg	0,91 mg
Biotina	24 µg	3,4 mg
Colina	80 mg	11 mg
Inositol	35 mg	5,0 mg

Fonte: Rótulo da embalagem fórmula infantil para crianças de 0 a 6 meses.

4.5.2 Quociente de risco (HQ)

O HQ corresponde ao risco de saúde não cancerígeno representado pela exposição a um determinado metal pesado e pode ser definido como a razão de exposição ao metal pesado e a dose de referência de não carcinogenicidade do metal (RfD), que é o nível mais alto no qual não são esperados efeitos adversos à saúde. Para interpretação, considera-se: $HQ < 1$, não são esperados efeitos adversos à saúde; $HQ > 1$, existe a possibilidade de efeitos não cancerígenos à saúde. O HQ foi calculado de acordo com a Eq. 2, estabelecida pela USEPA (2001).

$$HQ = \frac{EDI}{RfD} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

EDI = é a estimativa de ingestão diária de metais pesados (mg/kg/dia) obtido na Eq. 1;

RfD = dose de referência (mg/kg/dia) (Tabela 9).

Tabela 10. Valores de referência de toxicidade (RfD) para a via de exposição oral.

Elemento	RfD (mg/kg/dia)	Referência
As	3×10^{-4}	USEPA (2022)
Cu	0,04	USEPA (2022)
Fe	0,7	USEPA (2022)
Mn	0,24	USEPA (2022)
Pb	$3,5 \times 10^{-3}$	De Miguel <i>et al.</i> (2007)
Se	5×10^{-3}	USEPA (2022)

Zn

0,3

USEPA (2022)

4.5.3 Índice de perigo (HI)

O índice de perigo (HI), é definido como a soma dos HQs dos elementos avaliados (adimensional). Mesmo que os HQs individuais para os elementos sejam inferiores à unidade individualmente, o efeito cumulativo do consumo pode resultar em efeitos adversos à saúde. Assim considera-se que se o HI for >1, existe o potencial de efeitos adversos não cancerígenos para a saúde (USEPA, 2001). O cálculo de HI foi realizado de acordo com a Eq. 3.

$$HI = (HQ_{As} + HQ_{Cu} + HQ_{Fe} + HQ_{Mn} + HQ_{Pb} + HQ_{Se} + HQ_{Zn}) \quad \text{Eq. (3)}$$

4.6 Estimativa de risco carcinogênico (CR)

O risco carcinogênico (CR) é usado para avaliar o risco potencial associado à exposição a agentes cancerígenos durante todo o período de exposição ao longo da vida. Os valores estabelecidos para SF de As é 1,5 (mg/kg/dia) e de Pb é de 0,0085 (mg/kg/dia). Os demais elementos avaliados neste estudo (Cu, Fe, Mn, Se e Zn), não possuem valor de SF definidos. O valor do risco cancerígeno aceitável varia de 10^{-6} a 10^{-4} , sendo valores com concentrações maiores que 10^{-4} é considerado inaceitável, pois indica risco significativo de desenvolvimento

de câncer e abaixo de 10^{-6} representa um risco insignificante para a saúde (USEPA, 1989).

O valor de CR é obtido a partir da Eq. 4.

$$CR = EDI \times SF \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde:

EDI = dose de ingestão diária crônica de metais pesados (mg/kg/dia) obtido na Equação

1; SF = fator de inclinação oral carcinogênico (mg/kg/dia).

4.7 Análise térmica

Aproximadamente 10 mg de cada amostra de fórmula infantil foram aquecidos de 25 a 750 °C sob fluxo de ar sintético (50 ml/min), taxa de aquecimento de 10 °C/min. As curvas de Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas utilizando equipamentos TGA Q-50 (TA Instruments, NewCastle, DE, EUA) e equipamentos DSC-Q20, acoplados a um sistema de refrigeração RCS90 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). A análise termogravimétrica e as curvas de calorimetria exploratória diferencial foram obtidas simultaneamente em um analisador térmico STA 449 F3 Jupiter, Netzsch, Selb Alemanha. Além disso, os gráficos foram obtidos usando o *Universal Analysis Software*.

4.8 Análise estatística

Diferenças significativas nas concentrações entre as fórmulas foram acessadas utilizando análise de variância (ANOVA). Um estudo de análise de componente principal (PCA) foi realizado. Todo o estudo foi realizado utilizando o Software Origin 9.2. Todo o procedimento estatístico foi realizado conforme manual de instruções do software.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação de Aflatoxinas em fórmulas infantis

A Figura 1 mostra os cromatogramas padrões obtidos a partir das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 nos tempos de retenção de 5,37 min, 5,27 min, 5,16 min e 5,04 min, respectivamente. Além disso, na Figura 2, apresentamos o cromatograma das fórmulas infantis de duas aflatoxinas quantificadas. Foram quantificados dois tipos de aflatoxinas com base nos padrões. Na Figura 2, temos como informação que as energias de colisão (CE) foi de 15, 25, 35 e 50 eV. Condições do HRMS: Polaridade positiva, resolução 35000 FWHM, fluxo do gás principal 35u, fluxo do gás auxiliar 10 u, sem fluxo para o contra gás, voltagem do spray 3,50 kV, temperatura do capilar 320°C, temperatura do gás auxiliar 350 °C, e voltagem das lentes S 50V. Outros cromatogramas para as amostras estudadas estão disponíveis no Apêndice.

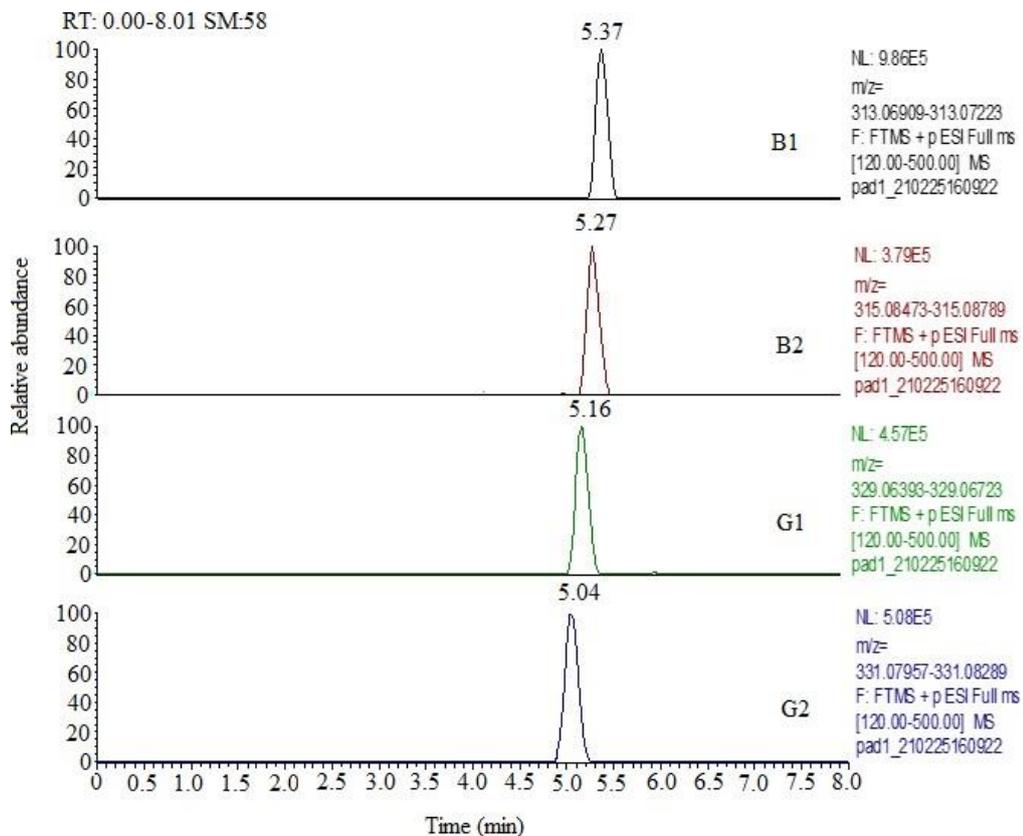


Figura 1. Cromatogramas no modo Full Scan com os tempos de retenção das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Condições do HRMS: Polaridade positiva, resolução 35000 FWHM, fluxo

do gás principal 35u, fluxo do gás auxiliar 10 u, sem fluxo para o contra gás, voltagem do spray 3,50 kV, temperatura do capilar 320 °C, temperatura do gás auxiliar 350 °C, e voltagem das lentes S 50V. A figura representa os cromatogramas dos padrões das AFB1,AB2,AFG1 e AFG2.

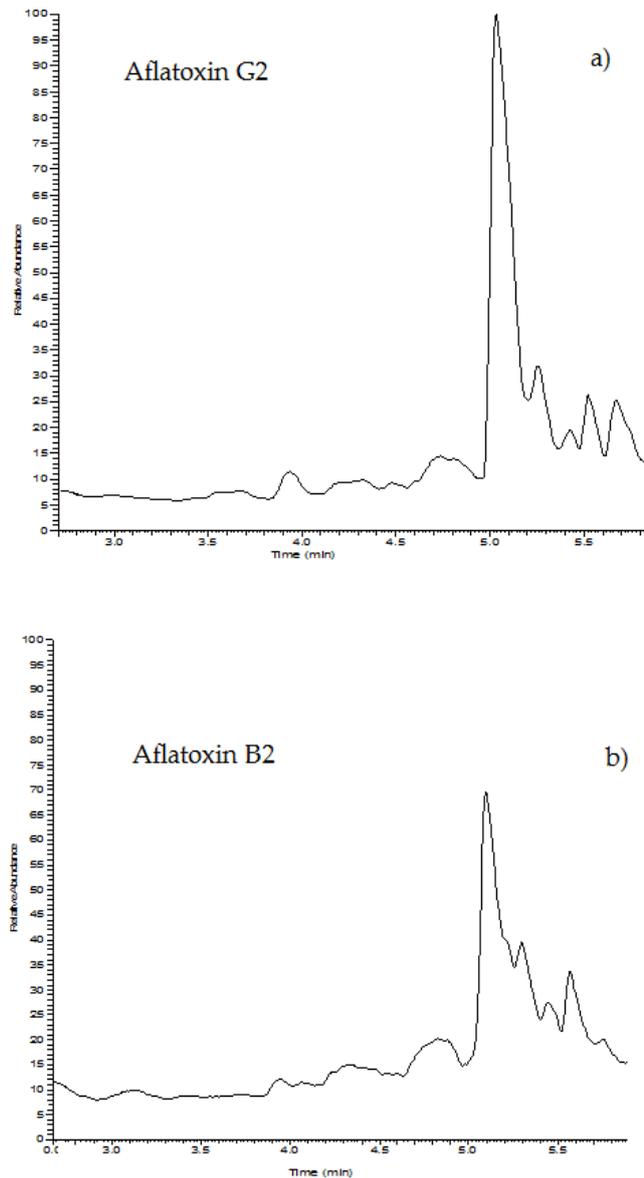


Figura 2. Cromatograma obtido por Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometers (MS) para uma amostra de fórmula infantil: a) tempo de retenção de uma amostra de aflatoxina G2; b) tempo de retenção de uma amostra de aflatoxina B2.

Vale destacar que a área de um pico na Figura 2 é proporcional à concentração da substância. Neste caso, o software de gerenciamento de dados de cromatografia (Xcalibur, Thermo) calculou a concentração da amostra por integração. O número de amostras, bem como os tipos de aflatoxinas e sua concentração são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Número da amostra, tipos de aflatoxinas e concentração nas fórmulas infantis.

Amostra	Aflatoxina	Concentração (µg/kg)
15	G2	0,050
33	B2	0,030
54	G2	0,025
56	B2	0,200
57	G2	0,020
73	G2	0,020
74	B2	0,150
75	B2	0,070
86	B2	0,200

Na Tabela 12 apresentamos os resultados obtidos para os parâmetros limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) utilizando-se a metodologia usada nesse trabalho para a determinação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Tabela 12. Aflatoxinas, limite de detecção e limites de quantificação

Aflatoxina	Limite de Detecção	Limite de Quantificação
B1	0,08 ng/mL	0,25 ng/mL
B2	0,09 ng/mL	0,30 ng/mL
G1	0,17 ng/mL	0,53 ng/mL
G2	0,01 ng/mL	0,06 ng/mL

Baseados então nestes limites anteriormente estabelecidos foram detectadas as aflatoxinas B2 e G2 em 09 (10,3%) das 87 amostras examinadas. Os valores de AFB2 foram determinados como mínimo de 0,03 µg/kg, máximo de 0,07 µg/kg e média de 0,0184±0,10 µg/kg. Já para a aflatoxina AFG2 foram determinados como mínimo de 0,02

$\mu\text{g}/\text{kg}$, máximo de $0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$ e média de $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{kg}$. Como resultado das análises, foi determinado que não haviam amostras excedendo o Limite Máximo Tolerado estabelecido para fórmulas infantis de $1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$. Todas as amostras nas quais foram detectadas as aflatoxinas B2 e G2 são designadas como fórmula infantil de segmento para lactente e criança de primeira infância (0 a 6 meses). Nas fórmulas infantis de segmento para lactente e criança de primeira infância (6 a 12 meses), fórmula infantil de segmento para criança de primeira infância (1 a 3 anos), não foram detectadas a presença das aflatoxinas.

Há um número limitado de estudos recentes na literatura cujo objetivo tenha sido investigar o nível de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 em fórmulas infantis de diferentes marcas. Destacamos aqui o estudo que investigou a presença das aflatoxinas M1, M2, G1, G2, B1 e B2 e ocratoxina A em 123 fórmulas infantis da região metropolitana do Rio de Janeiro. Um método usando QuEChERS e a espectrometria de massas em tandem de cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC-MS/MS) foram validados para aplicação na análise destas amostras. A ocratoxina A e as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 não foram detectadas nas amostras analisadas. Aflatoxina M1 foi detectada em 18 (14,6%) das amostras analisadas e quantificadas em oito (6,5%), em níveis de concentração variando de $0,016$ a $0,057 \mu\text{g}/\text{kg}$ e uma média concentração de $0,031 \mu\text{g}/\text{kg}$. As concentrações de aflatoxina M1 encontradas em três das amostras analisadas ($0,040$, $0,044$ e $0,057 \mu\text{g}/\text{kg}$) excede o limite estabelecido pelos regulamentos da União Européia ($0,025 \mu\text{g}/\text{kg}$). A ingestão diária estimada (EDI) de aflatoxina M1 para lactentes até 12 meses variou de $0,39$ a $1,53 \text{ ng}/\text{kg}$ dia de peso corporal (SARTORI *et al.*, 2023).

Em outro estudo realizado no Chile, a ocorrência de aflatoxina M1 (AFM1) no leite em pó ou fluido e a exposição à aflatoxina do consumo de leite no Chile em diferentes faixas etárias. Para a pesquisa, foram coletados um total de 50 lotes dos leites mais consumidos: 24 fórmulas infantis e 26 embalagens de leite em pó ou fluido. Os níveis de AFM1 foram analisados por ELISA usando um kit comercial (RIDASCREEN, faixa de detecção de 5 a 80 ng/L). A ocorrência de AFM1 no leite foi de 42% (21/50), das quais 14 amostras puderam ser quantificadas, com nível médio de $7,5 (\pm 1,7) \text{ ng}/\text{L}$. A ocorrência de AFM1 nas fórmulas infantis foi de 63%, contra 23% no leite. Embora as concentrações de AFM1 encontradas no leite estivessem dentro dos limites regulatórios chilenos, a AFM1 foi considerada um problema de saúde pública em crianças entre 0 e 13 anos de idade, sendo os lactentes particularmente vulneráveis (FOERSTER; MONSOLVE; RÍOS-GAJARDO, 2023).

Destacamos também este cujo objetivo foi determinar a presença da aflatoxina M1 (AFM1) em amostras de fórmulas infantis na Turquia e avaliar o risco de exposição de bebês à contaminação de alimentos por aflatoxinas. Um total de 72 amostras de fórmulas infantis (prematuro, hipoalergênico, 0-6, 6-9, 9-12 e 12-36 meses) foram analisados para a presença de AFM1 usando o método *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). 49% das amostras (35 amostras) estavam contaminadas com AFM1 e o grupo mais altamente contaminado com AFM1 foi o das fórmulas infantis de 12-36 (8 amostras) meses. Além disso, este estudo teve como objetivo avaliar os níveis de AFM1 especialmente acima dos padrões internacionais (Comissão Européia) (0,025 µg/kg) e locais (*Türkiye Food Codex Regulation*) (0,025 µg/kg) e os riscos de câncer associados à ingestão de fórmula infantil. Cinco amostras de fórmula infantil apresentaram concentração de AFM1 acima da concentração máxima permitida de acordo com os padrões. As avaliações de risco de AFM1 para bebês variaram entre 0,002-0,035 ng/kg de peso corporal/dia e >100.000-5263,15, respectivamente, para Ingestão Diária Estimada (EDI) e Margem de Exposição (MOE). O grupo de maior risco foi determinado nas amostras de 9-12 meses. Os resultados do estudo indicaram um alto risco de exposição de bebês, que estão em estágio inicial de desenvolvimento e vulneráveis a contaminantes tóxicos (DEMIR; AĞAOĞLU,2023).

5.2 Macro e microelementos em fórmulas infantis

Os resultados da quantificação de macro e microelementos do grupo amostral A1-A10 das fórmulas infantis que representam as marcas e as faixas etárias avaliadas são apresentados na Tabela 13. Podemos observar que apenas na A6 foi quantificado o elemento Al, enquanto Ba, foi quantificado apenas nas A6 e A9. Os elementos Cd, Co, Cr e Ni apresentaram concentração inferior ao limite de detecção (0,0006 ppm; 0,0009 ppm; 0,003 ppm; 0,0010 ppm) em todas as amostras de fórmula infantil analisadas.

A concentração dos elementos em A1 decresce na seguinte ordem: Mg > Fe > Zn > Cu > Se > As > V > Mn. Por outro em A2: Mg > Fe > Zn > Cu > Se > As > Mn > Pb > V, para A3, A4 e A5, temos Mg > Fe > Zn > Cu > Se > As > Mn > V > Pb. Para A6: Mg > Fe > Zn > Cu > Al > Se > V > Mn > Pb. A ordem da concentração em A7 foi de Mg > Fe > Zn > Cu > Se > As > V > Pb > Mo e A8: Mg > Fe > Zn > Cu > Se > As > Pb > V > Mo. Em adição para A9, temos a seguinte ordem decrescente: Mg > Fe > Mn > Cu > Se > As > Ba > V > Pb e finalmente, para A10: Mg > Fe > Cu > Mn > Se > As > V > Pb > Mo.

Tabela 13. Concentração de elementos quantificados (mg/kg) nas amostras de fórmulas infantis brasileiras.

Amostras	Elementos								
	Al	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	
A 1	<LD	0,7619±0,0542	<LD	<LD	<LD	<LD	3,1912±0,1284	42,8241±0,9205	
A 2	<LD	0,5583±0,0691	<LD	<LD	<LD	<LD	2,2331±0,0510	33,3556±0,5109	
A 3	<LD	0,8385±0,0341	<LD	<LD	<LD	<LD	3,0611±0,0725	35,9940±0,2886	
A 4	<LD	0,8457±0,0460	<LD	<LD	<LD	<LD	2,6897±0,0729	39,3049±0,4568	
A 5	<LD	0,8534±0,0638	<LD	<LD	<LD	<LD	2,6944±0,0338	58,0848±0,5283	
A 6	1,3578 ±0,1030	0,9497±0,0734	<LD	<LD	<LD	<LD	2,8968±0,0609	52,8722±0,2481	
A 7	<LD	0,9528±0,0977	<LD	<LD	<LD	<LD	2,9071±0,0663	52,1815±0,3669	
A 8	<LD	1,1503±0,0954	<LD	<LD	<LD	<LD	2,7083±0,0636	64,4759±0,9266	
A 9	<LD	1,3101±0,0433	1,0478±0,0297	<LD	<LD	<LD	3,2508±0,0727	72,5833±1,0187	
A 10	<LD	1,1880±0,0565	0,4421±0,0262	<LD	<LD	<LD	2,7530±0,1001	55,8850±1,6265	
	Mg	Mn	Mo	Ni	Pb	Se	V	Zn	
A 1	333,9200±9,6509	0,3548±0,0140	<LD	<LD	<LD	0,9004±0,1261	0,4026±0,0408	37,9339±0,5665	
A 2	355,4417±2,8870	0,3193±0,0109	<LD	<LD	0,1437±0,1276	0,6862±0,1061	0,1192±0,0203	29,0980±0,4753	
A 3	433,0074±8,7727	0,2824±0,0085	<LD	<LD	0,2141±0,0675	1,0451±0,0524	0,4165±0,0210	36,0587±0,0897	
A 4	281,0268±4,4845	0,3569±0,0089	<LD	<LD	0,0847±0,0506	0,9536±0,0922	0,0888±0,0236	27,1423±0,0981	
A 5	220,2207±1,4152	<LD	0,0108±0,0113	<LD	0,1118±0,0849	0,9330±0,0625	0,0149±0,0095	36,7941±0,3511	
A 6	468,1305±3,2037	0,2786±0,0095	<LD	<LD	0,1785±0,0957	0,9733±0,0900	0,4854±0,0314	33,4097±0,1785	
A 7	424,8040±6,2271	<LD	0,0188±0,0241	<LD	0,2402±0,1478	1,0166±0,1245	0,4497±0,0235	36,1019±0,7126	
A 8	249,5743±3,8036	<LD	0,0724±0,0306	<LD	0,2270±0,1387	1,1849±0,1421	0,0966±0,0252	47,6392±0,2695	
A 9	450,5910±11,1598	4,5055±0,0704	0,0247±0,0191	<LD	0,2588±0,0958	1,3678±0,0773	0,6727±0,0307	42,5326±0,3046	
A 10	337,9849±7,6793	1,5535±0,0576	0,0990±0,0235	<LD	0,2586±0,0973	1,2611±0,1034	0,2940±0,0339	38,1208±0,9929	

LD = abaixo do limite de detecção

As concentrações de elementos As, Cu, Fe, Mg, Pb, Se, V e Zn para as amostras de fórmulas infantis não apresentam distribuição normal. Para o referido teste, a hipótese nula considerada foi H0: A amostra foi retirada de uma população com distribuição normal. Por outro lado, o p(normal) fornecido foi menor que 0,05, portanto, a distribuição normal foi rejeitada. Para tanto, um teste não paramétrico foi utilizado, assim, o teste de Kruskal-Wallis revelou que não há diferença entre as medianas da amostra. Porém, análise de componentes principais foram utilizadas para averiguar quais elementos tem maior destaque em relação a todas as amostras estudadas.

As análises de componentes principais mostram que a componente PC1 explica a variância em 92,99% e PC2 4,1987%, ou seja, os autovalores na Tabela 14 fornecem uma medida da variância contabilizada pelos autovetores (componentes) correspondentes. As porcentagens de variação contabilizadas por esses componentes são também apresentadas na Tabela 14. Vale lembrar que quando a maior parte da variação for explicada pelo primeiro ou dois primeiros componentes (Figura 3), obtivemos sucesso na aplicação do método.

Tabela 14. Análise de PCA contendo as principais componentes (PC1 e PC2) de fórmulas infantis.

Componente Principal	Autovalor	Variância (%)
PC1	2,00813	92,99
PC2	0,090675	4,1987
PC3	0,0454226	2,1034
PC4	0,0133708	0,61916
PC5	0,0016028	0,074221
PC6	0,0003098	0,014346

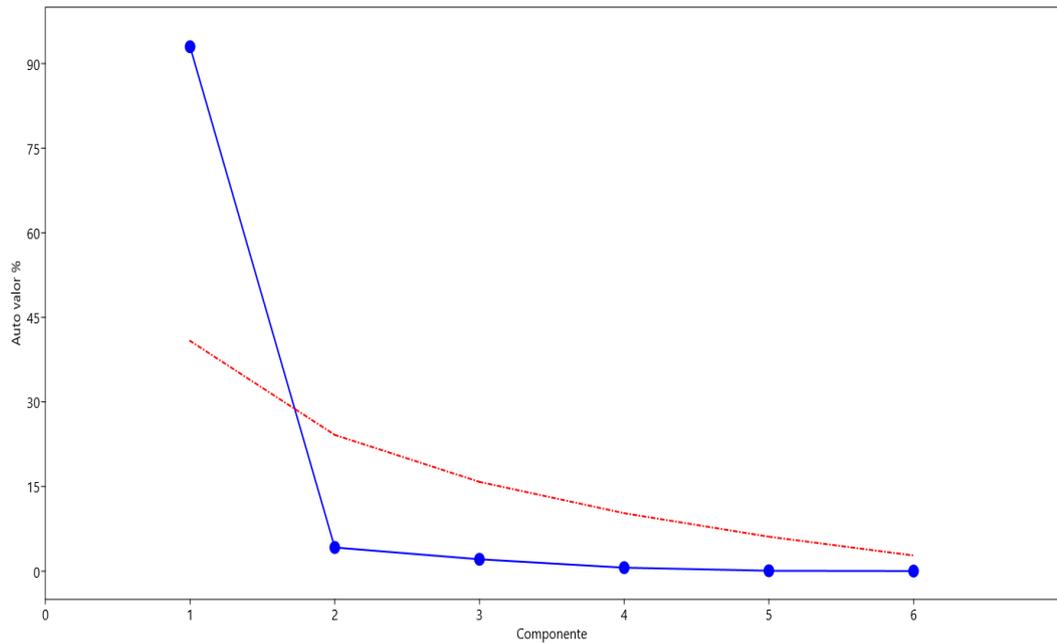


Figura 3. Autovalores (%) em função do número de componentes principais.

Podemos observar na Tabela 15 que na componente PC1 estão associados aos elementos com maiores valores como As, Cu e Mn, e em relação a componente PC2, os elementos As, Cu, Se e V. Ou seja em todas as amostras das fórmulas, tais elementos como As e Cu são os mais significativos.

Tabela 15. Carregamentos (*Loadings*): Valores dos componentes principais PC1, PC2 e PC3.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6
As	0,10496	0,22508	0,70102	0,068079	-0,58197	0,32181
Cu	0,10109	0,82828	-0,21525	-0,42508	0,15608	0,22878
Mn	0,97961	-0,1739	-0,085618	-0,047447	0,01179	0,019981
Pb	0,025565	0,013399	0,23389	0,45403	0,65328	0,55816
Se	0,0977239	0,23022	0,55841	-0,032603	0,39773	-0,68298
V	0,094952	0,4241	-0,29729	0,77796	-0,22767	-0,25631

A Figura 4 revela as relações entre as variáveis no espaço dos dois primeiros componentes. Onde podemos ver que A9 e A10 têm cargas positivas para o PCA1. Porém, para o

Mn tem valores negativos para A10 conforme explícito na Figura 4 para o PCA2. Ou seja, a maior concentração de As, Cu, Se, Mn e V associadas ao PC1 pertencem a A9.

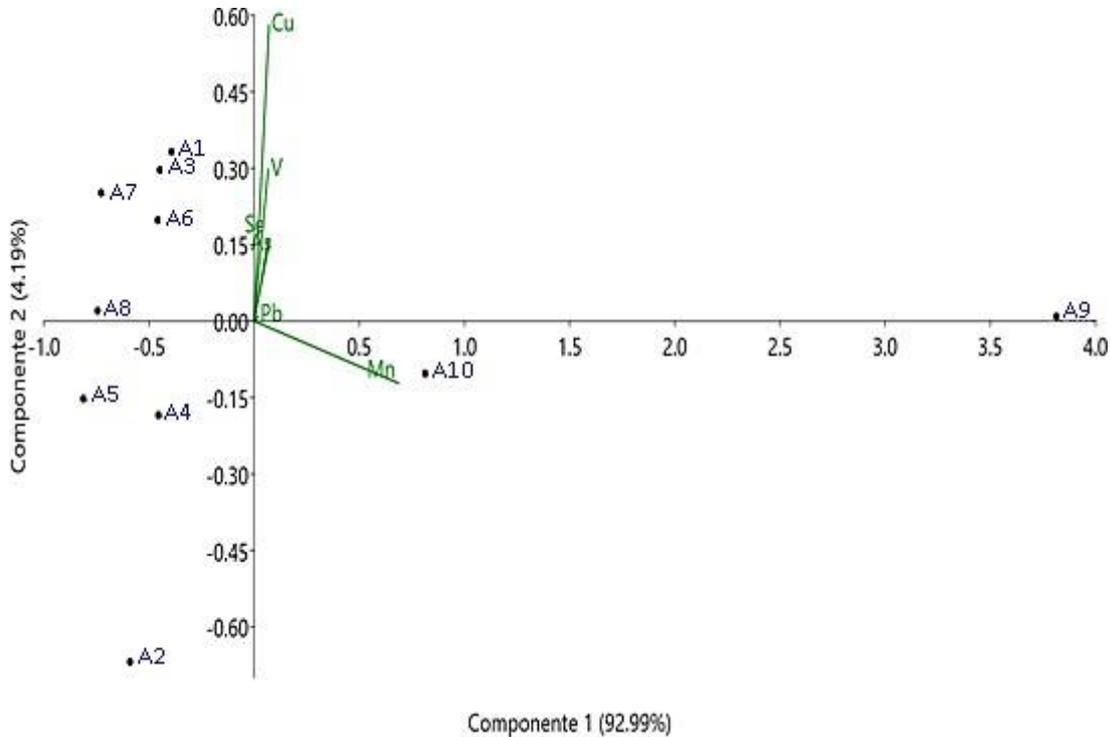


Figura 4. Gráfico de pontuação das componentes PC1 versus PC2: As, Cu, Mn Pb, Se e V.

5.3 Avaliação de risco a metal pesado devido o consumo de fórmula infantil

Os resultados da EDI calculados para os lactentes por meio da Eq. (1), considerando a ingestão de As, Cu, Fe, Mn, Pb, Se, V e Zn presentes nas fórmulas infantis, são apresentados na Tabela 16. Os valores de EDI não foram calculados para Al, Ba e Mo pois pelo menos 50% das amostras apresentaram concentração menores que o LD para esses elementos. Assim como Cd, Co, Cr e Ni que apresentaram 100% das amostras com concentração menores que o LD. Para os elementos como Mg e V não possuem valores estabelecidos para RfD. Os valores totais de EDI para as diferentes faixas de idade de lactente e criança de primeira infância diminuíram na seguinte ordem: Fe > Zn > Cu > Se > As > Mn > Pb.

Os valores de EDI dos elementos foram maiores do que os RfDs correspondentes de As (3×10^{-4} mg/Kg/dia), Cu (0,04 mg/Kg/dia), Fe (0,7 mg/Kg/dia), Mn (0,24 mg/Kg/dia), Pb ($3,5 \times 10^{-3}$ mg/Kg/dia), Se (5×10^{-3} mg/Kg/dia) e Zn (0,3 mg/Kg/dia) para a maioria das amostras, tanto para

meninos como para meninas, com exceção de Cu para a amostra A8, A9 e A10, Mn para todas as amostras, Pb para as amostras A4, A5, A8, A9 e A10 e Zn para as amostras A9 e A10, o que indica que pode ser suficiente para provocar efeitos tóxicos à saúde para meninos e meninas na faixa etária de 0-6 meses, 6-12 meses e de 1-3 anos de idade. No entanto, de acordo com Su *et al.* (2020) é essencial garantir a qualidade e a segurança das fórmulas infantis, pois representam a principal ou a única fonte de nutrientes para lactentes quando a amamentação com o leite materno não é possível ou é insuficiente para garantir o devido aporte nutricional e a presença de elementos potencialmente tóxicos nas fórmulas infantis podem representar um importante fator de risco para os bebês, pois os elementos tóxicos são absorvidos e acumulados em tecidos moles e posteriormente nos ossos (OKPASHI, 2022; BASARAN, 2022). Nesse sentido é fundamental determinar a ingestão alimentar desses metais e compará-la com os valores de referência permitidos estabelecidos por agências reguladoras.

Tabela 16. Estimativa de ingestão diária (EDI) de metais pesados presentes em fórmula infantil.

Amostra	Gênero	EDI (mg/Kg peso corporal/dia)							
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Se	V	Zn
A1	Menino	0,016	0,064	0,845	0,007	ND	0,020	0,009	0,744
	Menina	0,017	0,069	0,914	0,008	ND	0,021	0,009	0,805
A2	Menino	0,013	0,046	0,675	0,007	0,005	0,016	0,003	0,590
	Menina	0,014	0,049	0,731	0,007	0,006	0,017	0,003	0,638
A3	Menino	0,017	0,062	0,712	0,006	0,006	0,022	0,009	0,709
	Menina	0,019	0,067	0,771	0,006	0,006	0,023	0,009	0,768
A4	Menino	0,015	0,045	0,648	0,006	0,002	0,017	0,002	0,444
	Menina	0,016	0,049	0,702	0,006	0,002	0,018	0,002	0,481
A5	Menino	0,013	0,039	0,838	ND	0,003	0,014	ND	0,531
	Menina	0,014	0,042	0,904	ND	0,003	0,015	ND	0,573
A6	Menino	0,018	0,051	0,910	0,005	0,005	0,018	0,009	0,576
	Menina	0,019	0,055	0,982	0,005	0,005	0,020	0,010	0,621
A7	Menino	0,018	0,051	0,900	ND	0,007	0,020	0,008	0,631
	Menina	0,019	0,055	0,971	ND	0,007	0,021	0,009	0,680
A8	Menino	0,012	0,026	0,614	ND	0,003	0,012	0,001	0,450
	Menina	0,012	0,026	0,622	ND	0,003	0,013	0,001	0,456
A9	Menino	0,007	0,020	0,359	0,002	0,002	0,007	0,003	0,227
	Menina	0,007	0,020	0,364	0,002	0,002	0,007	0,004	0,230
A10	Menino	0,008	0,019	0,380	0,011	0,002	0,009	0,002	0,259
	Menina	0,008	0,019	0,385	0,011	0,002	0,009	0,002	0,262

ND – Não determinado em decorrência da concentração do elemento estar abaixo do limite de detecção (LD).

Na Tabela 17 são apresentados os valores de referência estabelecidos para RDI, AI, UL e TDI, os quais são utilizados para a comparação com os valores de EDI. Conforme a Tabela 17, constata-se a presença de elementos como As e Pb os quais não são recomendadas para ingestão diária, por se tratar de elementos tóxicos e que causam sérios danos à saúde humana em qualquer concentração, principalmente de crianças que são mais vulneráveis devido seu menor tamanho corporal e ao desenvolvimento dos órgãos, incluindo o desenvolvimento do sistema nervoso (ETICHA *et al.*, 2018; MISIC *et al.*, 2022), além disso, não existe valor de UL estabelecido para esses elementos. A estimativa de ingestão diária (EDI) de Cu (toda a faixa etária), e Mn (faixa etária de 0-6 meses), Fe (faixa etária de 0-6 meses) presentes nas fórmulas infantis são menores que os valores estabelecidos pela RDI/AI. Por outro lado, os valores de EDI para Fe (faixa etaria 1-3 anos), Mn (faixa etária 7-12 meses e 1-3 anos), são maiores que os valores de RDA/AI. Entretanto, apenas o EDI para Se na amostra 8 é próximo ao valores de RDA/AI para a faixa etaria de 0-6 meses, porém, os EDIs para as amostras A1-A7 são menores que os valores de RDI/AI para a faixa de 1-3 anos. Os valores de EDI encontrados para meninos e meninas são menores que o TDI para As, Cu e Pb respectivamente, estabelecido por BAARS (2001). Porém, os valores de EDI para Zn são menores que aqueles apresentados para RDI na Tabela 16. Achados semelhantes foram encontrados por Eticha *et al.* (2018) ao avaliar fórmulas infantis que se destinam ao consumo de bebês de seis meses a um ano oriundas da Etiópia. Em relação a comparação dos resultados obtidos na Tabela 16 com os valores de ingestão máxima toleráveis (Tabela 17), observa-se que todos os valores de EDI para Fe, Pb e Se estão abaixo dos valores de UL. Para o Cu e o Mn é considerado como UL (Tabela 17) a quantidade normalmente recebida do leite materno para lactentes de 0 a 6 meses e como a quantidade recebida do leite materno e dos alimentos para a faixa etária de 6 a 12 meses (NHMRC, 2017). No entanto, não existe ressalva referente aos lactentes que não obtêm seus nutrientes a partir do leite materno e fazem uso exclusivamente de fórmula infantil. Para os lactentes de 1 a 3 anos, o Cu apresenta EDI menor que a UL (1 mg/dia) e Mn não possui valor definido para essa faixa etária.

Tabela 17. Valores de referência para RDI, AI, UL e TDI.

Faixa etária	Parâmetro	As	Cu	Fe	Mn	Pb	Se	Zn	Referência
0-6 meses	RDI/AI* (mg/dia)	NE	0,2*	0,2*	0,003*	NE	0,012*	2*	NHMRC, 2017
	UL (mg/dia)	NE	BM	20	BM	NE	0,045	4	NHMRC, 2017
7-12 meses	RDI/AI* (mg/dia)	NE	0,22*	11	0,6*	NE	0,015*	3	NHMRC, 2017
	UL (mg/dia)	NE	B/F	20	B/F	NE	0,06	5	NHMRC, 2017
1-3 anos	RDI/AI* (mg/dia)	NE	0,7*	9	2	NE	0,025*	3	NHMRC, 2017
	UL (mg/dia)	NE	1	20	NP	NE	0,09	7	NHMRC, 2017
criança e adulto	TDI (mg/Kg de peso corporal/dia)	1	140	NE	NE	3,6	NE	500	BAARS <i>et al.</i> , 2001

RDI - Ingestão dietética recomendada; AI* - Ingestão adequada; As recomendações para lactentes baseiam-se em quantidades no leite materno; TDI - Ingestão diária tolerável; UL - Limite tolerável de ingestão; NP - Não é possível definir - pode haver evidência insuficiente ou nenhum nível claro de efeitos adversos; BM - Quantidade normalmente recebida do leite materno; B/F - Quantidade no leite materno e nos alimentos; MPL - Limite máximo permitido; NE - Não estabelecido.

Os valores referentes as contribuições dos quociente de risco (HQs) obtidos pelas Eq. (2) para o índice de perigo (HI) Eq. (3) são apresentados na Figura 5. Os resultados demonstram que a exposição de lactentes de diferentes faixas etárias, aos metais pesados Cu, Fe, Se e Zn presentes na maioria das fórmulas infantis avaliadas, representa risco não cancerígeno significativo para a saúde, pois tanto HQ como HI foram maiores que um.

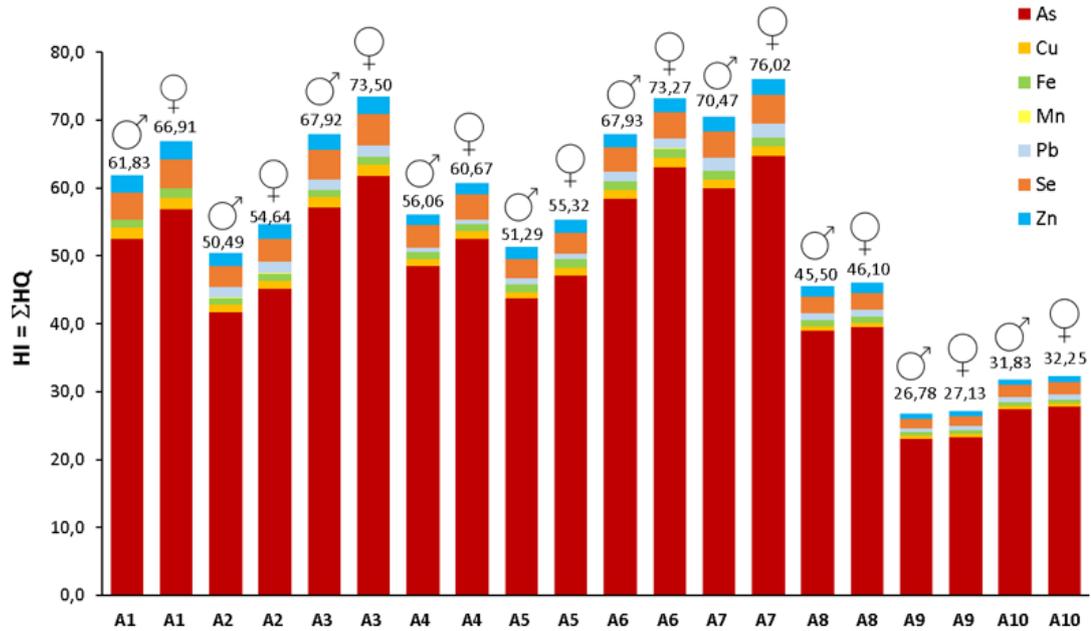


Figura 5. Contribuição dos HQs dos elementos As, Cu, Fe, Mn, Pb, Se e Zn para os valores de HI, devido ao consumo de fórmula infantil por meninos e meninas.

Entre as fórmulas infantis, podemos destacar que apenas as amostras A9 e A10 desenvolvidas para lactentes de 1 a 3 anos apresentaram $HQ < 1$ para 5 dos 7 elementos analisados (Cu, Fe, Mn, Pb e Zn). Além disso, todas as fórmulas infantis em que o Mn foi detectado, apresentaram $HQ < 1$. O valor de HI foi maior para as meninas do que para os meninos, em todas as fórmulas analisadas e esse fato se deve ao menor peso corporal de meninas.

O Pb apresentou $HQ > 1$ em 70% das amostras analisadas e As em 100%, tanto para meninos quanto para meninas, indicando que pode haver impactos adversos à saúde dos bebês que consomem as fórmulas infantis regularmente, devido ao potencial tóxico de As que dependendo da dose ingerida, pode induzir toxicidade aguda ou crônica e o Pb que devido sua elevada toxicidade pode afetar os hormônios sexuais, esgotar as enzimas antioxidantes, induzir escassez de minerais e até mesmo causar a morte em casos extremos (OKPASHI, 2022).

Os valores de HQ de As e Pb encontrados nesse estudo foram superiores ao relatado na China para crianças de 1 e 3 anos (SU *et al.*, 2020) e na Turquia para crianças de 0 a 6 meses e 7 a 12 meses (BASARAN, 2022). O HQ de Pb foi superior também aos resultados de outro estudo realizado no Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2022a) em que o HQ variou entre 0,0846 a 0,2138 para fórmulas infantis da fase 1 (0-6 meses) e 0,0461 a 0,1003 para

fórmulas da fase 2 (7-12 meses). Assim como o HQ de As que variou de 0,07714 a 2,0472 (fase 1) e 0,4957 a 1,8267 (ALMEIDA *et al.*, 2022a).

Okpashi, (2022) destaca que a alta quantidade de As encontrada em amostras de leite enlatado quando comparado com o limite permitido de As em produtos comestíveis, pode ser atribuída a contaminação do alimento dos animais produtores do leite, além do uso de conservantes e contaminação do ambiente onde os leites são armazenados. Destaque deve ser dado ao elevado valor de HQ encontrado para As que variou entre 23,03 e 64,72 e representou o elemento com maior contribuição para o valor calculado de HI, seguido de Se, Zn, Pb, Fe, Cu e Mn. Assim, um $HI > 1$ sugere que os usuários desses produtos lácteos, provavelmente venham a ter impactos adversos não cancerígenos significativos na saúde ao longo da vida. Esse fato ressalta a importância do monitoramento do teor de metais pesados em fórmulas infantis, para garantir que seu índice de perigo permaneça abaixo de um (OKPASHI, 2022).

O risco carcinogênico (CR) previsto ao longo da vida de crianças, calculados com base na exposição oral a metais pesados devido ao consumo de fórmulas infantis, são apresentados na Tabela 18. Os valores determinados neste estudo para a exposição a As, foram superiores a $1,00 \times 10^{-4}$, com variação de $1,04 \times 10^{-2}$ na fórmula A9 e $2,91 \times 10^{-2}$ para A7. Já o Pb apresentou valores de CR dentro do intervalo mínimo aceitável de $1,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4}$, que representa a chance de desenvolvimento de câncer de 1 em 1.000.000 e 1 em 10.000, respectivamente (OKPASHI, 2022). Mesmo em baixas concentrações de exposição, os metais pesados podem bioacumular em órgãos vitais e persistir na idade adulta (ETICHA *et al.*, 2018).

Tabela 18. Risco carcinogênico de As e Pb para lactentes de 0 a 6 meses, 6 a 12 meses e 1 a 3 anos.

Amostra	Gênero	CR	
		As	Pb
A1	menino	$2,36 \times 10^{-2}$	ND
	menina	$2,56 \times 10^{-2}$	ND
A2	menino	$1,88 \times 10^{-2}$	$4,6 \times 10^{-5}$
	menina	$2,03 \times 10^{-2}$	$4,98 \times 10^{-5}$
A3	menino	$2,57 \times 10^{-2}$	$4,7 \times 10^{-5}$
	menina	$2,78 \times 10^{-2}$	$5,08 \times 10^{-5}$

A4	menino	$2,18 \times 10^{-2}$	$1,88 \times 10^{-5}$
	menina	$2,36 \times 10^{-2}$	$2,03 \times 10^{-5}$
A5	menino	$1,97 \times 10^{-2}$	$2,39 \times 10^{-5}$
	menina	$2,12 \times 10^{-2}$	$2,58 \times 10^{-5}$
A6	menino	$1,75 \times 10^{-2}$	$2,92 \times 10^{-5}$
	menina	$1,78 \times 10^{-2}$	$2,96 \times 10^{-5}$
A7	menino	$2,70 \times 10^{-2}$	$5,65 \times 10^{-5}$
	menina	$2,91 \times 10^{-2}$	$6,1 \times 10^{-5}$
A8	menino	$2,63 \times 10^{-2}$	$3,99 \times 10^{-5}$
	menina	$2,84 \times 10^{-2}$	$4,31 \times 10^{-5}$
A9	menino	$1,04 \times 10^{-2}$	$1,57 \times 10^{-5}$
	menina	$1,05 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-5}$
A10	menino	$1,23 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-5}$
	menina	$1,25 \times 10^{-2}$	$2,03 \times 10^{-5}$

ND – Não determinado em decorrência da concentração do elemento estar abaixo do limite de detecção (LD).

5.4 Análise térmica

A técnica de calorimetria de fluxo de calor foi utilizada para estudar o comportamento térmico de diferentes leites em pó acima de 30 °C. Na Figura 6, é apresentado o comportamento da lactose nas fórmulas infantis usando termogravimetria (TG) e na Figura 7, a análise de calorimetria exploratória de varredura (DSC). De acordo com as curvas calorimétricas obtidas, sugere-se que essas reações correspondem a cristalização da lactose amorfa, Reação de Maillard entre proteínas do leite e lactose, oxidação da gordura do leite e decomposição da lactose. Na Figura 6 também está incluso a presença de gorduras totais e saturadas, carboidratos e proteínas.

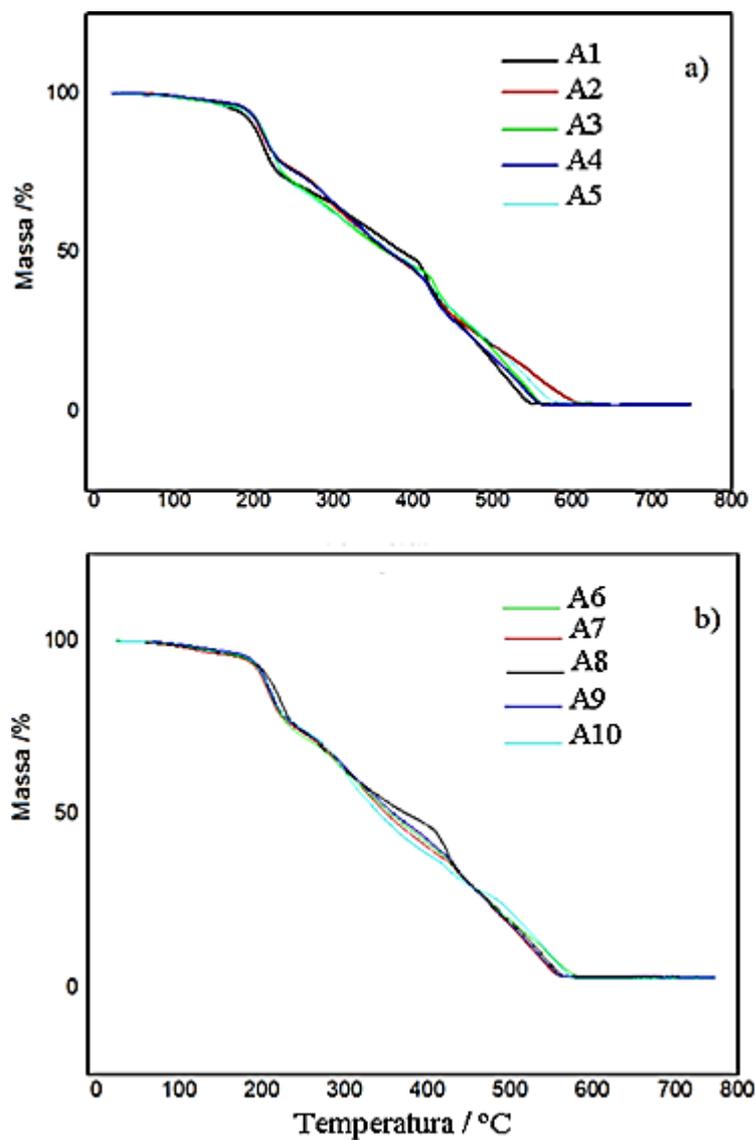


Figura 6. Curvas TG da decomposição térmica das fórmulas infantis. Os picos de decomposição de A1 a A5 são indicados em a) e de A6 a A10 em b).

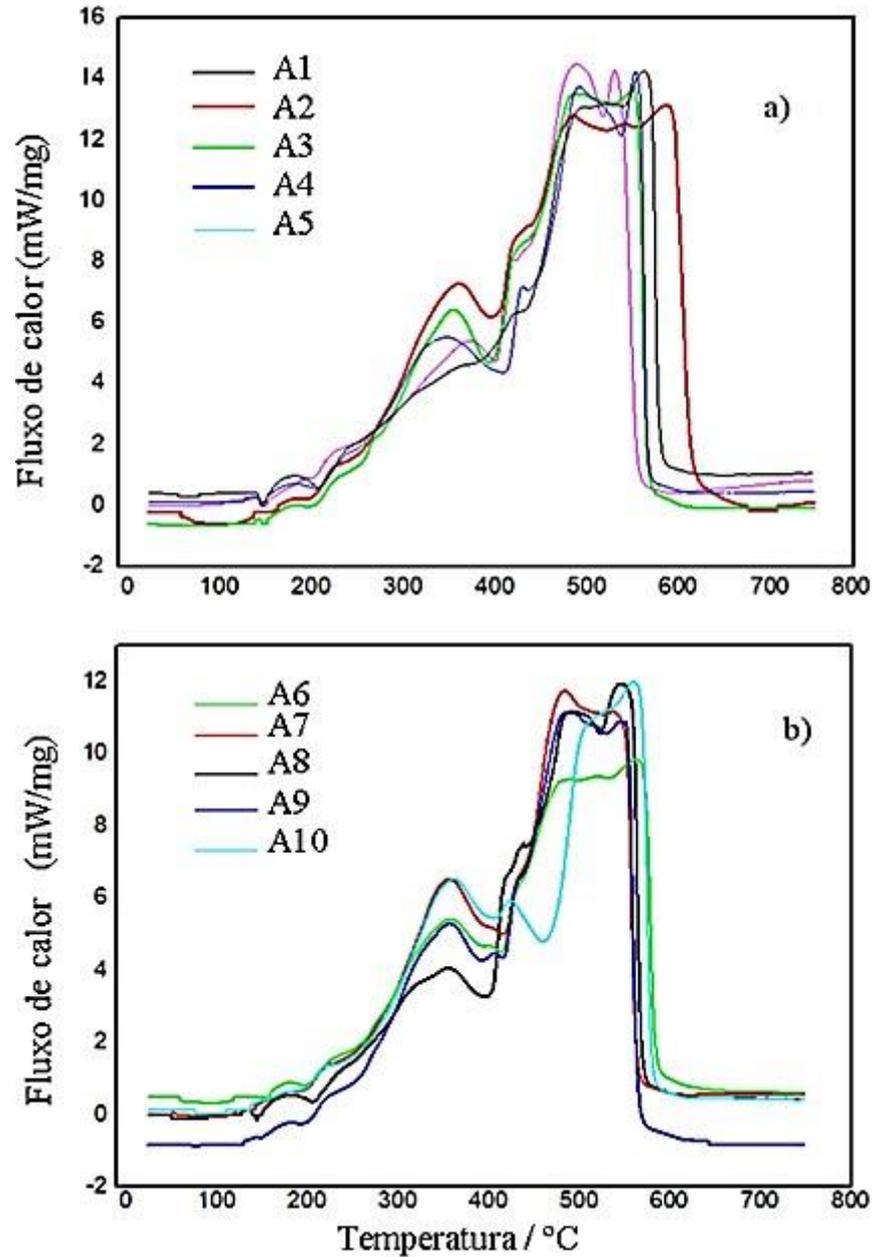


Figura 7. Curvas de análise de calorimetria exploratória de varredura (DSC) das amostras de fórmula infantil sob atmosfera de ar. Os picos principais de A1 a A5 são indicados em a) e de A6 a A10 em b).

A α -lactose é um dos principais constituintes da fórmula infantil e é altamente higroscópica. Neste sentido, quando o leite em pó for armazenado em um recipiente aberto, ele ficará empelotado devido à absorção de umidade. Ou seja, a lactose presente no leite em pó também pode cristalizar devido ao aumento do teor de água. Isso pode levar a alterações no aroma e no sabor dos produtos que contêm leite em pó. De acordo com Raemy (1983), em

seus estudos envolvendo fórmulas infantis, o processo de cristalização da lactose cristalina em fórmulas de leites, envolve acristalização da β -lactose que inicia-se a partir do intervalo de temperatura de 225 °C a 300 °C, no caso da α -lactose inicia no intervalo de 215 °C até 300°C e α -lactose•H₂O (lactose mono- hidratada) a 150 °C, ou seja, em todos os casos considerando uma atmosfera de oxigênio e taxa de aquecimento de 1°C/min (Figura 8). Em relação a α -lactose amorfa, o pico exotérmico que aparece em temperaturas em torno de 70 a 120°C é devido à cristalização da lactose amorfa em β -lactose anidra (Figura 8). Portanto, o primeiro pico exotérmico presente em cada curva calorimétrica da Figura 8b pode, portanto de acordo com os autores e nossos resultados ser atribuído principalmente à cristalização da lactose. Portanto, os resultados obtidos para as fórmulas infantis de nosso estudo (Figura 6) para um intervalo de temperatura de 35 °C - 150 °C, corroboram com aqueles publicados por Raemy (1983), evidenciando que se trata da presença da lactose, que por sua vez está presente na concentração de 41 mg/100g até 60 mg/100 g nas respectivas fórmulas (Tabela 9).

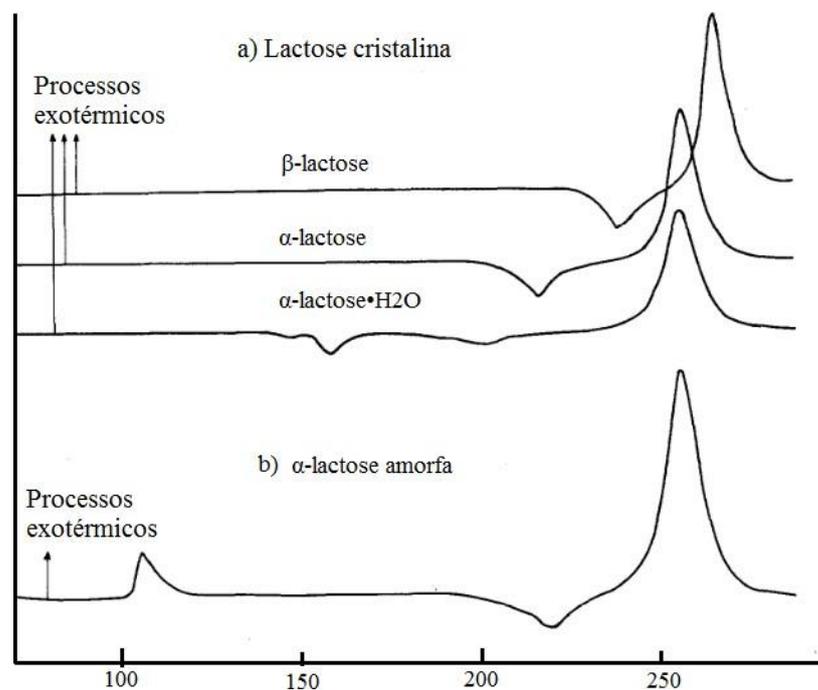


Figura 8. Curva de calorimetria. a) lactose cristalina e b) α -lactose amorfa. Fonte: Adaptada de Raemy (1983).

De acordo com estudos experimentais realizados anteriormente, as curvas calorimétricas mudam dependendo se a lactose está nas formas alpha ou beta (amorfa ou cristalina), inclusive a atmosfera é um dos fatores importante (RAEMY 1983). O segundo pico na Figura 7 é plano e largo, certamente não pode ser atribuído a apenas um efeito, ou seja, estudos tem demonstrado que efeitos a oxidação de lipídios estão associados com um fenômeno exotérmico no intervalo de temperatura de 100 °C a 170 °C, entretanto, para melhor compreensão, o correto seria o experimento proposto ser realizado em uma atmosfera de argônio e não oxigênio (RAEMY, 1983).

Durante o aquecimento, além da presença de gorduras, carboidratos, proteínas, gorduras, ácidos e antioxidantes, vários produtos estão presente ou podem se formar. Esses produtos são inibidores de reações de oxidação e, portanto, neutralizam a degradação oxidativas dos lipídios. Além disso, catalisadores pró-oxidantes que aceleram a reação de oxidação também podem estar presentes e interferir nas reações lipídicas (WACOO *et al.*, 2014). Além disso, as curvas termogravimétricas (TGs) ilustram o perfil termo analítico da decomposição do leite em pó (Figura 6). Ou seja, as primeiras perdas também podem ser atribuídas a perdas de água e outros constituintes como as proteínas, carboidratos, lipídios e microelementos. Estes resultados estão de acordo com os publicados por Macedo *et al.* (1997) que também estudou a decomposição térmica do leite em pó, ou seja, a curva TG da amostra de leite em pó estudada evidenciou um processo de decomposição térmica complexo, envolvendo várias etapas que iniciam à temperatura ambiente e finalizam próximo a 600 °C. De acordo com Macedo *et al.* (1997), o produto final, termicamente estável a 600 °C corresponde às cinzas da amostra de leite em pó. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 19, no qual consta os respectivos tempos de decomposição e suas temperaturas estáveis.

Tabela 19. Amostras com seus respectivos Ti (temperatura inicial), Tf (temperatura final) e Tf – Ti (intervalo de reação).

Amostra	Ti - onset Temperatura inicial (°C)	Tf - endset Temperatura final (°C)	Tf - Ti Intervalo de reação (°C)
A1	150,00	546,443	396,443
A2	125,00	606,918	481,918
A3	150,00	559,275	409,275
A4	120,00	558,661	438,661
A5	155,00	576,203	421,203
A6	150,00	576,089	426,089

A7	125,00	557,775	432,775
A8	150,00	565,678	415,678
A9	150,00	557,775	407,775
A10	100,00	569,937	469,937

Apesar da estabilidade de armazenamento e a qualidade da fórmula infantil serem significativamente afetadas pelo estado físico da lactose, devemos lembrar que a lactose existe frequentemente como um vidro amorfo (KARMAS; BUERA; KAREL, 1992; VUATAZ, 1988) que é estável a temperaturas abaixo de sua temperatura de transição vítrea (TG) (ROOS; KAREL, 1990; ROOS; KAREL, 1991). Neste estado vítreo, a lactose é higroscópica e pode adsorver água, o que resulta em plastificação e diminuição do TG, (ROOS; KAREL, 1990). O armazenamento da lactose amorfa a uma temperatura acima de TG aumenta a mobilidade molecular e diminui a viscosidade, causando viscosidade, aglomeração e cristalização (SLADE; LEVINE, 1991; ROOS; KAREL, 1990). A lactose cristaliza em temperaturas acima de TG e no estado de borracha a taxa aumenta à medida que a diferença de temperatura entre a temperatura ambiente e a TG aumenta. Diferença de temperatura excessiva entre a temperatura ambiente e a TG também pode facilitar o escurecimento não enzimático e a oxidação lipídica (SALTMARCH; VAGNINI-FERMI; LABUZA, 1981; ROOS; KAREL, 1990). Os resultados publicados por Jouppila e Roos (1994) no qual estudou a transição vítrea e cristalização do leite em pó utilizando TG e DSC corroboram com os nossos resultados, ou seja, na Figura 7b, podemos observar nas curvas de TG que as temperaturas de transição vítreas da lactose se iniciam a partir de 100 °C. Entretanto, mesmo um ligeiro aumento no teor de água no leite em pó com lactose hidrolisada pode diminuir a TG abaixo da temperatura normal de armazenamento de leite em pó que é de 101 °C. Segundo Jouppila e Roos (1994), a temperatura de transição vítrea (TG) do leite em pó foi próxima à da lactose amorfa. Ou seja, na faixa de fusão de gordura, a TG de leite em pó não pôde ser determinada para produtos contendo gordura. Neste sentido, melhores estudos devem ser realizados para informar a composição de ácidos graxos.

6. CONCLUSÃO

A pesquisa demonstrou claramente a presença regular de baixos níveis de micotoxinas em formulas infantis. Considerando o potencial impacto negativo na saúde da presença das toxinas analisadas, os alimentos para bebês devem ser controlados para contribuir para uma avaliação mais ampla da exposição dos efeitos à saúde associados à presença de micotoxinas em alimentos fornecidos a bebês e crianças.

O método analítico multiresidual foi validado para três diferentes apresentações de alimentos infantis (em pó), obtendo acurácia e precisão satisfatórias para as concentrações do analito/matriz estudadas, corroborando a aplicabilidade do método e considerando os níveis máximos permitidos de micotoxinas estabelecidos pela ANVISA para esses alimentos.

A pesquisa atual atinge a sensibilidade necessárias para AFB na análise de alimentos para bebês, de acordo com os níveis de concentração muito baixos exigidos pela ANVISA. Contribuindo para a implantação no LACEN/MS de um método multiresíduo para análise de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) em fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância; assim como disponibilizar os dados para órgãos federais, estaduais e municipais para subsidiar a fiscalização e implementação com limites máximos tolerados.

Diante do exposto, é importante haver um monitoramento contínuo da qualidade dos alimentos derivados do leite em períodos sazonais, para avaliar as condições da produção, armazenamento, transporte até o consumo final garantindo a segurança alimentar. Tal monitoramento pode ser realizado através de projetos interinstitucionais, com ganhos para as instituições participantes, professores e estudantes.

É importante ressaltar que não foram encontrados relatos de monitoramento de fórmulas infantis em nosso estado e essa classe ainda não está incluída nos programas de monitoramento em leite implementados pela ANVISA e pelo MAPA. Portanto, este trabalho apresenta dados inéditos no Brasil sobre a ocorrência de aflatoxinas neste produto de origem animal, o que torna presente trabalho inédito no âmbito nacional.

Em relação a quantificação de metal pesado, as fórmulas infantis apresentaram concentrações variadas de As, Cu, Fe, Mg, Pb, Se, V e Zn e a estimativa de ingestão diárias desses elementos excederam os valores das RfDs. Os valores de EDI para Fe na faixa etária 1-3 anos, assim como para Mn na faixa etária 7-12 meses e 1-3 anos, são maiores que

os valores de RDA/AI. O As foi quantificado em 90% das todas as amostras analisadas, porém para o Pb não existe valor de UL estabelecido. Os resultados demonstram ainda que a exposição dos lactentes de diferentes faixas etárias, aos metais pesados presentes na maioria das fórmulas infantis avaliadas, representa risco não cancerígeno significativo para a saúde e o As oferece risco carcinogênico, podendo acarretar impactos nocivos à saúde ao longo da vida. Tais fatos são preocupantes e ressaltam a importância do monitoramento constante do teor de metais pesados em fórmulas infantis para a garantia da qualidade e preservação da saúde dos lactentes que fazem uso das fórmulas regularmente.

A técnica de calorimetria de fluxo de calor foi utilizada para estudar o comportamento térmico de diferentes formulas infantis (leites em pó) acima de 30 °C. As curvas calorimétricas, dessas reações correspondem a: cristalização da lactose amorfa, Reação de Maillard entre proteínas do leite e lactose, oxidação da gordura do leite e decomposição da lactose. Sua importância relativa é discutida. Além disso, a análise térmica diferencial foi utilizada para estudar a ignição e combustão espontânea de leite em pó, sob grande excesso de oxigênio. Assim, o papel da decomposição de gorduras, carboidratos e proteínas é sublinhado, com alguns valores de temperatura de autoignição foram fornecidos.

REFERÊNCIAS

ACHAGLINKAME, M. A.; OPOKU, N.; AMAGLOH, F. K. Aflatoxin contamination in cereals and legumes to reconsider usage as complementary food ingredients for Ghanaian infants: A review. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 10, p. 1-7, 2017.

ALMEIDA C. C, BAIÃO, D. S, RODRIGUES P. A, et al. Macrominerals and trace minerals in commercial infant formulas marketed in Brazil: compliance with established minimum and maximum requirements, label statements, and estimated daily intake. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 857698, 2022a. doi: 10.3389/fnut.2022.857698.

ALMEIDA, C. C.; BAIÃO, D. S.; RODRIGUES, P. A.; et al. Toxic metals and metalloids in infant formulas marketed in Brazil, and child health risks according to the target hazard quotients and target cancer risk. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, p. 11178, 2022b. <https://doi.org/10.3390/ijerph191811178>.

ALVES, J. Q. N. Nutritional profile and dietary intake of children allergic to cow's milk protein accompanied by a children's hospital, in Brasilia, Brazil. **Comunicação em CiênciasSaúde**, v. 28, n. 3, p. 402-412, 2017.

ALVITO, P. C., SIZOO, E. A., ALMEIDA, C. M., et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 1, p. 22-30. 2010. DOI 10.1007/s12161-008-9064-x.

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; et al. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200016>.

ANDRADE JR, D.M. Estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de comprimidos simples de maleato de enalapril 20mg. Dissertação. Instituto de Tecnologia em Fármacos - Faramanguinhos, Rio de Janeiro 2015.

ANFOSSI, L; DI NARDO, F.; GIOVANNOLI, C.; et al. Enzyme immunoassay for monitoring aflatoxins in eggs. **Food Control**, v. 57, p. 115-121, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.013>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 429, DE 08 DE OUTUBRO DE 2020 Dispõe sobre Rotulagem Nutricional dos Alimentos Embalados. Disponível: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-429-de-8-de-outubro-de-2020-282070599>. Acesso: 03 de março de 2023.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 52, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2010 Dispõe sobre corantes em embalagens e equipamentos plásticos destinados a estar em contato com alimentos. Disponível:

file:///C:/Users/User/Downloads/resolucao-rdc-no-52-de-26-de-novembro-de-2010%20(1).pdf. Acesso: 12 de fevereiro de 2023.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 88, de 26 de março de 2021. Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: <https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-anvisa/>. Acesso em: 20 de janeiro de 2022.

ARAUJO, M. F. M.; DEL FIACO, A.; PIMENTEL, L. S.; et al. Costos and savings for the Family as the result of breast feeding. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, n.2, p. 135-141, 2004.

ARAUJO, M. F. M.; REA, M. F.; PINHEIRO, K. A.; et al. Advance in the Brazilian norm for commercialization of infant foods. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 513-520, 2006.

ARROYO-MANZANARES, N; HUERTAS, J. F.; GARCIA-CAMPANA, A. M.; et al. Aflatoxins in animal feeds: A straightforward and cost-effective analytical method. **Food Control**, v. 54, p. 74-78, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.027>.

ARRUA, A. A.; ARRÚA, P. D.; MOURA-MENDES, J.; et al. Presence of aflatoxin M1 in infant milk formulas marketed in the metropolitan area of Asunción, Paraguay. *Pediatría Asunción*, v. 48; n. 1. 2021.

ASGHAR, M. A. ; AHMED, A. ; ZAHIR, E. ; et al. Incidence of aflatoxins contamination in dry fruits and edible nuts collected from Pakistan. **Food Control**, v. 78, p. 169-75, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.058>.

ASTOLFI, M. L.; MAROTTA, D.; CAMMALLERI, V.; et al. Determination of 40 elements in powdered infant formulas and related risk assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 18, p. 5073, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105073>.

BAARS, A., THEELEN, R., JANSSEN, P., et al. Re-evaluation of human toxicological maximum permissible risk levels. RIVM Report 711701 025. 2001.

BAŞARAN, B. An assessment of heavy metal level in infant formula on the market in Turkey and the hazard index. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 105, p. 104258, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104258>.

BASTOS, C. O.; SALIM, T. R.; CARMO, A. L. O.; et al. Deficiência do aleitamento materno exclusivo como contribuinte para a obesidade infantil. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 17, p. e5757, 2020. <https://doi.org/10.25248/reac.e5757.2020>.

BLANKSON, G. K.; MILL-ROBERTSON, F. C. Aflatoxin contamination and exposure in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in greater Accra, Ghana. **Food Control**, v. 64, p. 212-217, 2015.

BOLECHOVÁ, M.; BENESOVÁ, K.; BELÁKOVÁ, S.; et al. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. **Food Control**, v. 47, p. 108-113, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.045>.

BRANDAO, M. P, DE CARVALHO DOS ANJOS, BELL, M. J. V. Time resolved fluorescence of milk powders – A pilot study. **International Dairy Journal**, 64, 31–6. doi:10.1016/j.idairyj.2016.09.004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Promoção da Saúde. Guia alimentar para crianças brasileiras menores de 2 anos / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Primária à Saúde, Departamento de Promoção da Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2019. 265 p. : Il. ISBN 978-85-334-2737-2

BRERETON, N. Survey of metals in commercial infant foods, infant formula and non-infant specific foods. Report for the UK Food Standards Agency (FS102048). The Food and Environment Research Agency Sand Hutton York, YO41 1LZ, UK, 2014.

CESA, S.; CASADEI, M. A.; CERRETO, F. Infant milk formulas: Effect of storage conditions on the stability of powdered products towards autoxidation. **Foods**, v. 4, p. 487-500, 2015. doi:10.3390/foods4030487.

CHELI, F.; BATTAGLIA, D.; GALLO, R.; et al. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 37, p. 315-325, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.059>.

CLARKE, H. J.; O’SULLIVAN, M. G.; KERRY, J. P.; et al. Correlating volatile lipid oxidation compounds with consumer sensory data in dairy based powders during storage. **Antioxidants**, v. 9, p. 338, 2020. doi: 10.3390/antiox9040338.

Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) e Comitê Conjunto de Especialistas FAO/OMS em Aditivos Alimentares, "Resumo das Avaliações", 2002, http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1260.htm.

Commission Delegated Regulation (EU). 2016/127 of 25 September 2015 supplementing Regulation (EU) No 609/2013 of the European Parliament and of the Council as regards the specific compositional and information requirements for infant formula and follow-on formula and as regards requirements on information relating to infant and young child feeding. **Official Journal of the European Union**, 2015.

CONTEÇOTTO, A. C. T.; PANTE, G. C.; CASTRO, J. C.; et al. Occurrence, exposures evaluation and risk assessment in child population for aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 148, 111913, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111913>.

CRISTO, D. ; NIEHUES, J. R. ; ADAM, C. T. ; et al. Exposição a aflatoxinas: fator de risco para câncer de fígado. **Vitalle, Revista de Ciências da Saúde**, v. 27, p. 13-20, 2015.

DAOUD, S.; BOU-MAROUN, E.; WASCHATKO, G. et al. Detection of lipid oxidation in infant formulas: Application of infrared spectroscopy to complex food systems. **Foods**, v. 9, n.10, p. 1432, 2020.

DAVIS-BRUNO K.; TASSINARI M.S. Essential fatty acid supplementation of DHA and ARA and effects on neurodevelopment across animal species: A review of the literature. **Birth Defects Research** (part B), p. 240-250, 2011.

DEMIR, T; AĞAOĞLU, S. Exposure Assessment of Aflatoxin M1 Through Ingestion of Infant Formula in Türkiye. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 396-402, 2023.

DIMITRIESKA-STOJKOVIC´, E.; STOJANOVSKA-DIMZOSKA, B.; ILIEVSKA, G.; et al. Assessment of aflatoxin contamination in raw milk and feed in Macedonia during 2013. **Foodcontrol**, 59, 201-206, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.019>.

DIPPONG, T.; GATI, B.; MIHALI, C.; et al. Comparative study of thermal decomposition of several assortment of infant formula. **Scientific Bulletin Series D: Mining, Mineral Processing, Non-Ferrous Metallurgy, Geology & Environmental Engineering**, v. 29, n. 2, p. 45-52, 2015.

DOMÍNGUEZ, A.; PAZ, S.; RUBIO, C.; et al. Essential and Toxic Metals in Infant Formula from the European Community. **Open Access Journal of Toxicology**, v. 2, n. 2.

DU, X.; SCHRUNK, D. E.; SHAO, D.; et al. Intra-laboratory development and evaluation of a quantitative method for measurement of aflatoxins B1, M1 and Q1 in animal urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 41, p. 698-707, 2017. doi: 10.1093/jat/bkxo59.

ETICHA, T.; AFRASA, M.; KAHSAY, G. et al. "Exposição Infantil a Metais através do Consumo de Alimentação de Fórmulas em Mekelle, Etiópia". **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2018, p. 5, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2985698>.

EFSA (European Food Safety Authority). Metals as contaminants in food. Disponível: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/metals-contaminants-food>. Acesso: 11 de fevereiro de 2023.

FARIA, E. A., LELES, M. I. G., IONASHIRO, M., ZUPPA, T. O., ANTONIOSI FILHO, N. R. Thermal stability of vegetal oils and fats by TG/DTG and DTA. **Eclética Química**, v.27, p. , 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702002000100010>.

FDA. Closer to Zero: Action Plan for Baby Foods. 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/metals-and-your-food/closer-zero-action-plan-baby-foods>. Acesso em: 06 dez 2022.

FDA. Letter to Industry on Chemical Hazards, including Toxic Elements, in Food and Update on FDA Efforts to Increase the Safety of Foods for Babies and Young Children. 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-letter-industry-chemical-hazards-including-toxic-elements-food-and-update-fda-efforts-increase>. Acesso em: 06 dez. 2022.

FIORAVANTI, M. I. A. Minerais em fórmula infantil e leite: estudo do teor total e da bioacessibilidade. Dissertação de Mestrado, Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2020.

FOOD STANDARDS AGENCY. FSIS 17/06 Survey of metals in weaning foods and formulae for infants. FSIS 17/06, 2006.

GLORIA, E. M.; ROMERO, A. C.; CARVALHO, A. P. P.; et al. Perfil da contaminação com aflatoxina entre embalagens de produtos de amendoim. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 660-665, 2006.

GOLGE, O. A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Adana province of Turkey. **Food Control**, v. 45, p. 150-155, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.039>.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; MANGINELLI, S.; et al. Intoxicação de vacas leiteiras por farelo de algodão naturalmente contaminado com aflatoxinas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 171-174, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000100026>.

GROOPMAN, J. D.; EGNER, P. A.; SCHULZE, K. J.; et al. Aflatoxin exposure during the first 1000 days of life in rural South Asia assessed by aflatoxin B₁-lysine albumin biomarkers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 184-189, 2014. doi: 10.1016/j.fct.2014.09.016.

HESHMATI, A.; ZOHREVAND, T.; KHANEGHAH, A. M.; et al. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 202-208, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.046>.

HUONG, B. T. M.; TUYEN, L. D.; DO, T. T.; et al. Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. **Food Control**, v. 70, p. 191-200, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.052>.

Instituto de Medicina. Consumo dietético de referência. O Guia Essencial para Requisitos de Nutrientes. Washington, DC: Instituto de Medicina (2006). Disponível em:

https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic_uploads/DRIEssentialGuideNutReq.pdf. Acesso em 12 dezembro de 2022.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; MALIK, N. The seasonal variation of aflatoxin M₁ in milk and dairy products and assessment of dietary intake in Punjab, Pakistan. **Food Control**, v. 79, p. 292-296, 2017.

IZZO, L.; NARVÁEZ, A.; CASTALDO, L.; et al. Multiclass and multi-residue screening of mycotoxins, pharmacologically active substances, and pesticides in infant milk formula through ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-

resolution mass spectrometry analysis. **Journal of Dairy Science**, v.105, n. 4, p. 2948-2962, 2022. doi:10.3168/jds.2021-21123.

JI, X.; XIAO, Y.; WANG, W.; et al. Mycotoxins in cereal-based infant foods marketed in China: Occurrence and risk assessment. **Food Control**, v. 138, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108998>.

JOUPPILA, K.; ROOS, Y. H. Glass Transitions and Crystallization in Milk Powders. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2907-2915, 1994.

JUNQUEIRA, G. P.; ALVES, M. S.; FREITA, J. A.; et al. Análise e comparação da composição nutricional de fórmulas infantis. **Revista Conhecendo Online: Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 5, n. 1, p. 2359-5256, 2019.

KARMAS, R.; M. P. BUERA, KAREL, M.. Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 873, 1992.

KUMAR, P.; MAHATO, D. K.; KAMLE, M.; et al. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2170, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>.

MCMILLANA, A.; RENAUD, J. B.; BURGESS, K. M.; et al. Aflatoxin exposure in Nigerian children with severe acute malnutrition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 356-362, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.030>.

MELLO, B. G.; ROSA, T. R. O. Microbiological assessment of infant formulas sold in Joinville/SC. **Nutrição Brasil**, v. 17, n. 3, p. 148-153, 2018.

doi: <https://doi.org/10.33233/nb.v17i3.665>.

DE MIGUEL, E.; et al. Risk-based evaluation of the exposure of children to trace elements in playgrounds in Madrid (Spain). **Chemosphere**, v. 66, p. 2007, p. 505-513, 2007. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.05.065.

MISIC, I. D. R.; TOSIC, S. B.; PAVLOVIC, A. N. et al. Trace element content in commercial complementary food formulated for infants and toddlers: Health risk assessment. **Food Chemistry**, v. 378, p. 132113, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132113>.

MOORE, G. G.; OLARTE, R. A.; HORN, B. W.; et al. Global population structure and adaptive evolution of aflatoxin-producing fungi. **Ecology and evolution**, v. 7, n. 21, p. 9179-9191, 2017. <https://doi.org/10.1002/ece3.3464>.

MURASHIKI, T. C. ; CHIDEWE, C. ; BENHURA, M. A. ; et al. Levels and daily intake estimates of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in maize consumed by rural households in Shamva and Makoni districts of Zimbabwe. **Food Control**, v. 72, p. 105-109, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.040>.

NASIR, U.; NAEEM, I.; ASIF, M.; et al. Assessment of aflatoxins exposure through urinary biomarker approach and the evaluation of the impacts of aflatoxins exposure on

the selected health parameters of the children of multan city of Pakistan. **Food Control**, v. 123, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107863>.

NEME, G.; RODRIGUES, C.S.; ROCHA, C.F.; RULLO, V.E.V. Austitic spectrum disorder and heavy metal: Systematic Review. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 17, n. 46.

NHMRC. Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand. 2017. Disponível em: <https://www.eatforhealth.gov.au/nutrient-reference-values/nutrients-dietary-energy-calculator>. Acesso em 05 de dez. 2022.

NIAN ,Y.; WANG, H.; YING, G.; et al. Transfer rates of aflatoxins from herbal medicines to decoctions determined by an optimized high-performance liquid chromatography with fluorescence detection method. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 278-288, 2018. doi:10.1111/jphp.12856.

NIDHIANA, N.; BHAVYA, M. L.; BHASKAR, N.; et al. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in rumen liquor and its implications. **Food Control**, 71, 26-31. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.051>.

OJURI, O. T.; EZEKIEL, C. N.; SULYOK, M.; et al. Assessing the mycotoxicological risk from consumption of complementary foods by infants and young children in Nigeria. **Food and Chemical Toxicology**. v. 121, p. 37-50, 2018. doi: 10.1016/j.fct.2018.08.025.

OKPASHI, V. E. Health Risk of Ingested Heavy Metals in Fluidized Canned Milks: Are We Drinking Heavy Metals? **Journal of Food Quality**, v. 2022, p. 8, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2683095>.

OLIVEIRA, D. H. Ocorrência de fumonisinas em milho e derivados, destinados à alimentação humana. 39 folhas. Dissertação de Mestrado (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

OVEISI, M.R.; JANNAT, B.; SADEGHI, N.; HAJIMAHMOODI,; NIKZAD, A. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1216-1218, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.021>.

OUESLATI, S.; BERRADA, H.; MAÑES, J.; et al. Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. **Food Control**, v. 84, p. 362-369, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.021>.

PINTO VIEIRA, Í. G.; FREIRE, F. C. O.; ANDRADE, J. A.; et al. Determinação de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro por cromatografia em camada delgada. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 38, n. 4, p. 430-435, 2007.

PLEADIN, J.; VULIC, A.; PERSI, N.; et al. Annual and regional variations of aflatoxin B₁ levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year

period. **Food Control**, v. 47, p. 221 - 225, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.017>.

RAEMY, A. Behavior of foods studied by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 71, p. 273-8, 2003.

RAMA, A.; LATIFI, F.; BAJRAKTARI, D.; et al. Assessment of aflatoxin M1 levels in pasteurized and UHT milk consumed in Prishtina, Kosovo. **Food Control**, v. 57, p. 351-54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.021>.

RAMA, A.; MONTESISSA, C.; LUCATELLO, L.; et al. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk consumed in Kosovo during 2009-2010. **Food Control**, v. 62, p. 52-55, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.019>.

RAMOS, C. R. B. A.; BRASIL, E. M.; GERALDINE, R. M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três Regiões do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 2, p. 95-102, 2008.

ROMA, A.; ROSSINI, C.; RITIENI, A.; et al. A survey on the Aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. **Food Control**, v. 81, p. 30-33, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.034>.

ROOS Y. H. Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. **Le Lait**, v. 82, p. 475-84, 2002.

ROOS, Y. H. Thermal analysis, state transitions and food quality. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 71, p. 197-203, 2003.

ROOS, Y.; KAREL, M. Differential scanning calorimetry study of phase transitions affecting the quality of dehydrated materials. **Biotechnology Progress**, v. 6, p. 159, 1990.

ROOS, Y.; KAREL, M. Nonequilibrium ice formation in carbohydrate solutions. **Cryo-Letters**, v. 12, n. 6, 1991.

SALTMARCH, M.; VAGNINI-FERMI, M.; LABUZA, T. P. Theoretical basis and application of kinetics to browning in spray-dried whey food systems. **Food Science & Nutrition**, 5331, 1981.

SARMAL, U. P.; BETHARIA, P. J.; DEVI, P.; et al. Aflatoxins: implications on health. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 124 - 133, 2017.

SARTORI, A. V.; MATTOS, J. S.; MORAES, M. H. P. Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid 104 chromatography tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2321- 2330, 2015.

SARTORI, A. V.; MATTOS, J. S.; MORAES, M. H. P.; SANTOS, R.P.; SOUZA, Y.P.; CANDIDO, F.S.; NÓBREGA, A.W. Determination of Aflatoxins M1,M2, B1,B2,B2,G1,G2 and Ochratoxin A in Infant Formulas from Brazil Using a Modified

QuEChERS Method and UHPLC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12161-023-02477-6>.

SHAHBAZI, Y.; NIKOUSEFAT, Z.; KARAMI, N. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of exposure to aflatoxin M₁ in Iranian traditional cheeses. **Food Control**, v. 79, p.356 - 362, 2017.

SHUIB, N. S.; MAKAKLEH, A.; SALHIMI, S. M.; et al. Determination of aflatoxin M₁ in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-fluorescence with post column photochemical derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1510, p. 51-56, 2017. doi:10.1016/j.chroma.2017.06.054.

SILVA, B. C. L., CRUZ, L. C. L. Uso de fórmula infantil, bicos artificiais e aleitamento materno exclusivo: perfil de nutrizes adolescentes atendidas em um banco de leite. Recife:Faculdade Pernambucana de Saúde- FPS, 2018.

SILVA, S. A.; DIAS, M. R. M.; FERREIRA, T. A. P. Labeling food products for breastfeeding infants and toddlers. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 185-194, 2008.

SINEQUE, A. R.; MACUAMULE, C. L.; DOS ANJOS, F. R. Aflatoxin B₁ contamination in chicken livers and gizzards from industrial and small abattoirs, measured by ELISA technique in Maputo, Mozambique. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 951, p.1-10, 2017.

SIPAHI, H.; EKEN, A.; AYDIN, A.; et al. Safety assessment of essential and toxic metals in infant formulas. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 56, n. 4, p. 385-391, 2014.

SLADE, L., LEVINE, H. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, p. 115, 1991.

STASIEWICZ, M. J. ; FALADE, T. D. O. ; MUTUMA, M. ; et al. Multi-spectral kernel sorting to reduce aflatoxins and fumonisins in Kenyan maize. **Food Control**, v. 78, p. 203- 214, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.038>.

SU, C.; ZHENG, N. GAO, Y. et al. Content and Dietary Exposure Assessment of Toxic Elements in Infant Formulas from the Chinese Market. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1839, 2020. doi:10.3390/foods9121839.

TAVARES, A.D. Determinação de Cádmio e Chumbo em Alimentos e Bebidas Industrializados por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica. Tese de Doutorado, Univerdade Federal da Paraíba, 2010.

USEPA. Assessing human health risks from chemically contaminated fish and shellfish. Guidance Manual; USEPA: Washington, DC, USA, 1989.

USEPA. Risk assessment guidance for Superfund: volume III — part A, process for conducting probabilistic risk assessment. EPA 540-R-02-002. Washington, D.C.:US Environmental Protection Agency. 2001.

USEPA. Integrated Risk Information System (IRIS). Chemical Search. Oral Slope Factor. USEPA. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/>. Acesso em 15 dez. 2022).

VANDERHOUT, S.M.; AGLIPAY, M; TORABI, N.; JÜNI, P.; COSTA, B.R.; BIRKEN, C.S.; O'CONNOR, D.L.; THORPE, K.E.; MAGUIRE, J.L. Whole milk compared with reduced-fat milk and childhood overweight: a systematic review and meta-analysis, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 111, n. 2, p. 266–279, 2020. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz276>.

VENKATARAMAN, S., SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Detection of lipid radicals using EPR. **Antioxid Redox Signal**, v. 6, p. 631-638, 2004. doi: 10.1089/152308604773934396.

VUATAZ, G. Preservation of skim-milk powders: role of water activity and temperature in lactose crystallization and lysine loss. Page 73 in Food preservation by water activity control. C. C. Seow, ed. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, The Netherlands, 1988.

VUATAZ, G. The phase diagram of milk: a new tool for optimizing the drying process. **Le Lait**, v. 82, n. 4 p. 485-500, 2002.

WACOO, A. P. ; WENDIRO, D. ; VUZI, P. C.; et al. Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. **Journal of Applied Chemistry**, v. 2014, p. 1-14, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/706291>.

WARE, L.Y.; DURAND, N.; NIKIEMA, P. A.; et al. Occurrence of mycotoxins in commercial infant formulas locally produced in Ouagadougou (Burkina Faso). **Food Control**, v. 73, p. 518-523, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.047>.

WHO, World Health Organization. Girls table- Weight-for-age: Birth to 5 years (percentiles). Disponível em: <https://www.who.int/tools/child-growth-standards/standards/weight-for-age>. Acessado 06/01/2023.

WHO. World Organization Health. ENHIS (European Environment and Health Information System). Children's health and the Environment in Europe: a baseline assessment, 2007.

WHO. World Organization Health. Estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015, 2015.

WHO. World Organization Health. World Food Safety Day 2021. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-food-safety-day/2021>. Acesso em: 04 de março de 2023.

WILD, C. P.; TURNER, P. C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**, v. 17, n. 6, p. 471- 481, 2002.

WU, L. X.; DING, X. X.; LI, P. W.; et al. Aflatoxin contamination of peanuts at harvest in China from 2010 to 2013 and its relationship with climatic conditions. **Food Control**, v. 60, p.117-123, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.029>.

ZHENG, N.; LI, S.L.; ZHANG, H.; et al. A survey of aflatoxin M1 of raw cow milk in China during the four seasons from 2013 to 2015. **Food Control**, v. 78, p. 176-182, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.055>.

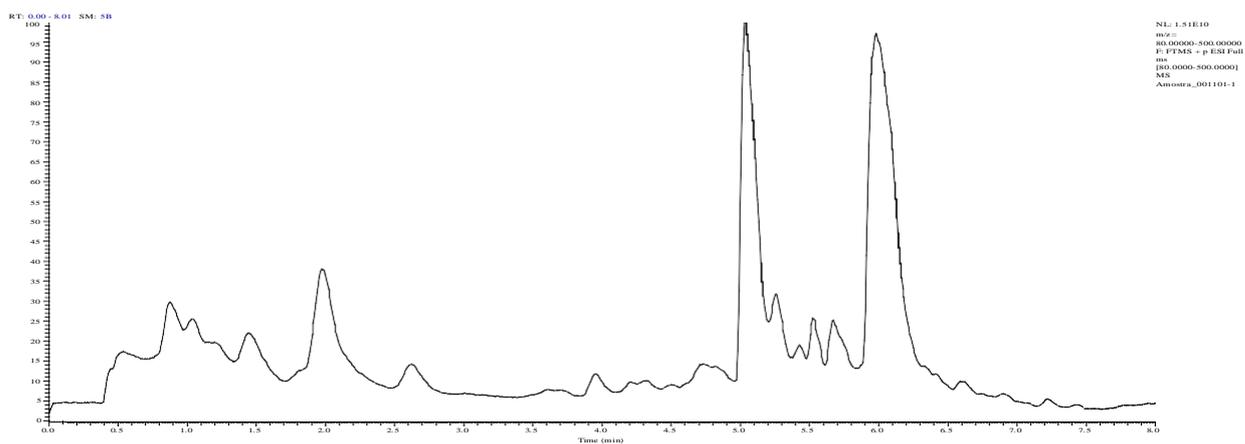
ZINA, L.G. Evidências científicas da associação entre fórmula infantil, fluorose e cárie dentária. Tese de Doutorado, Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, 2009.

APÊNDICE

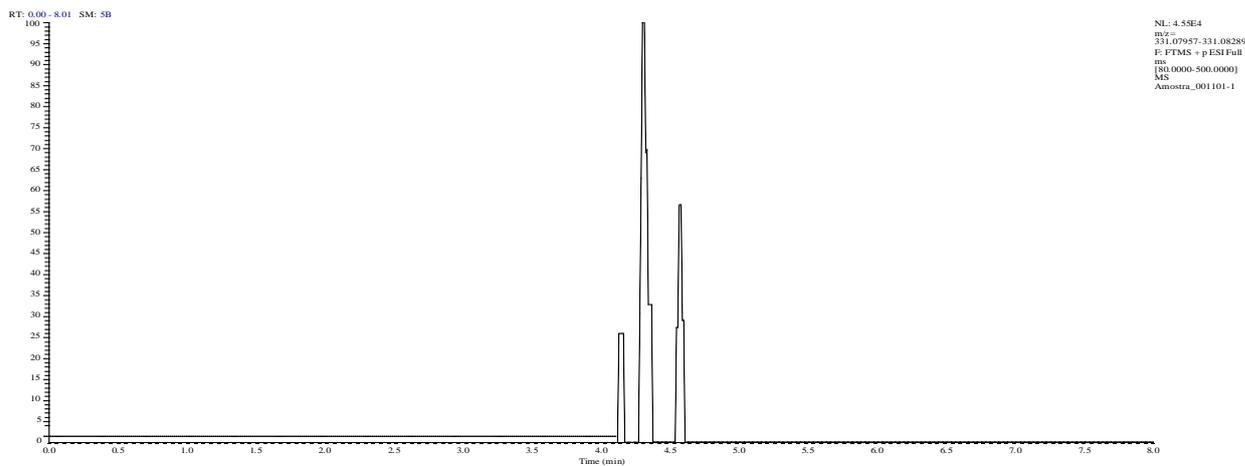
Cromatogramas gerados a partir da análise de fórmulas infantis em HPLC.

Amostra 1101 – 1

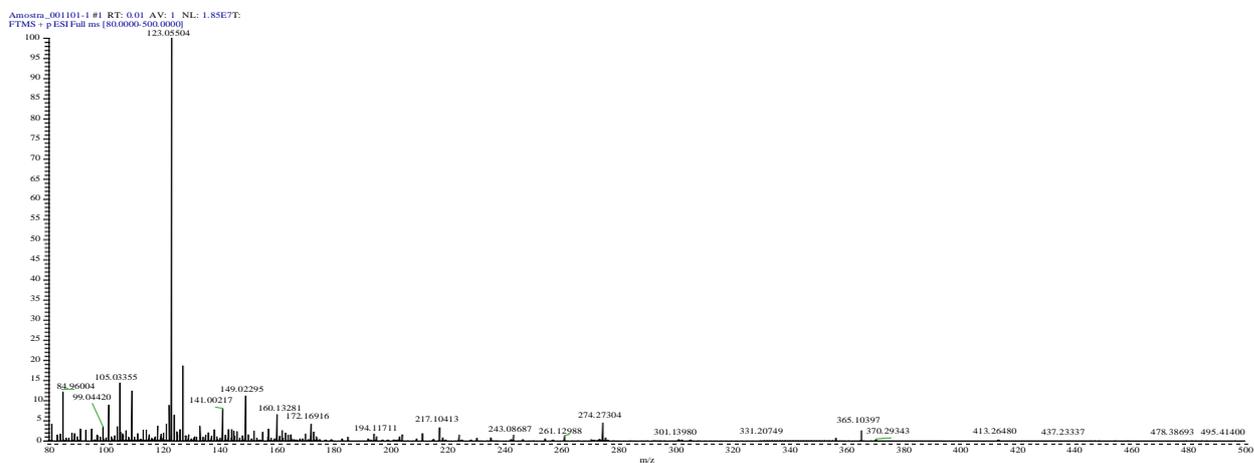
cromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma Aflatoxina G2

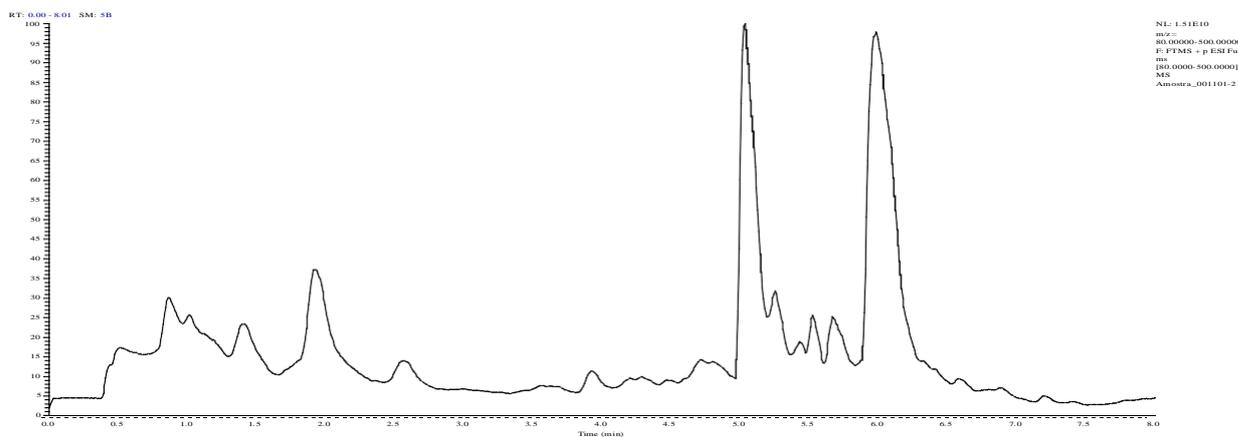


Espectro de massa

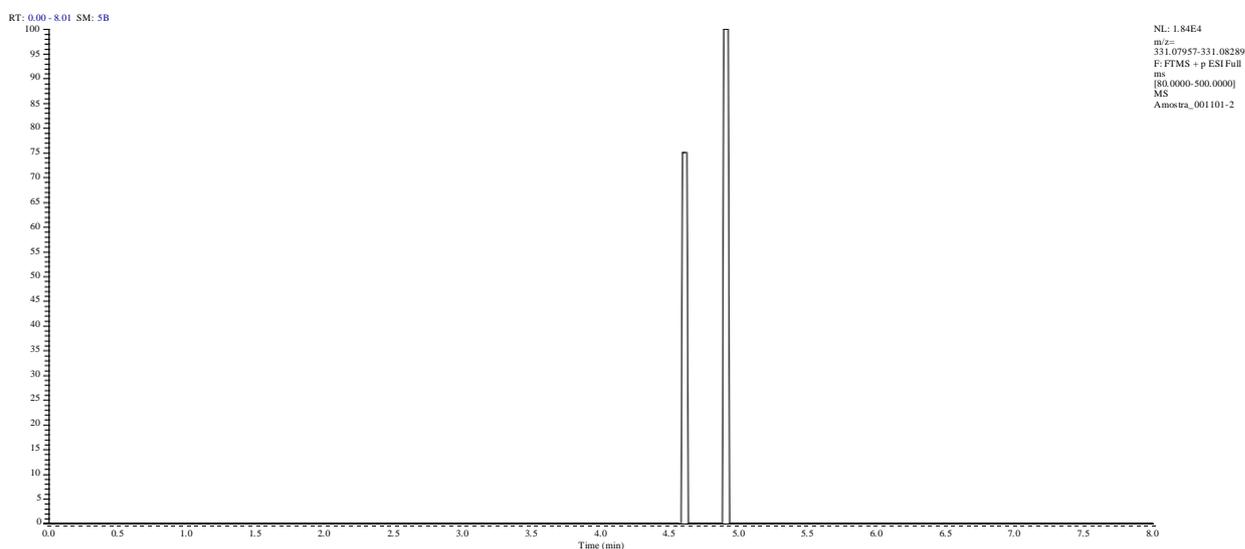


Amostra 1101 – 2

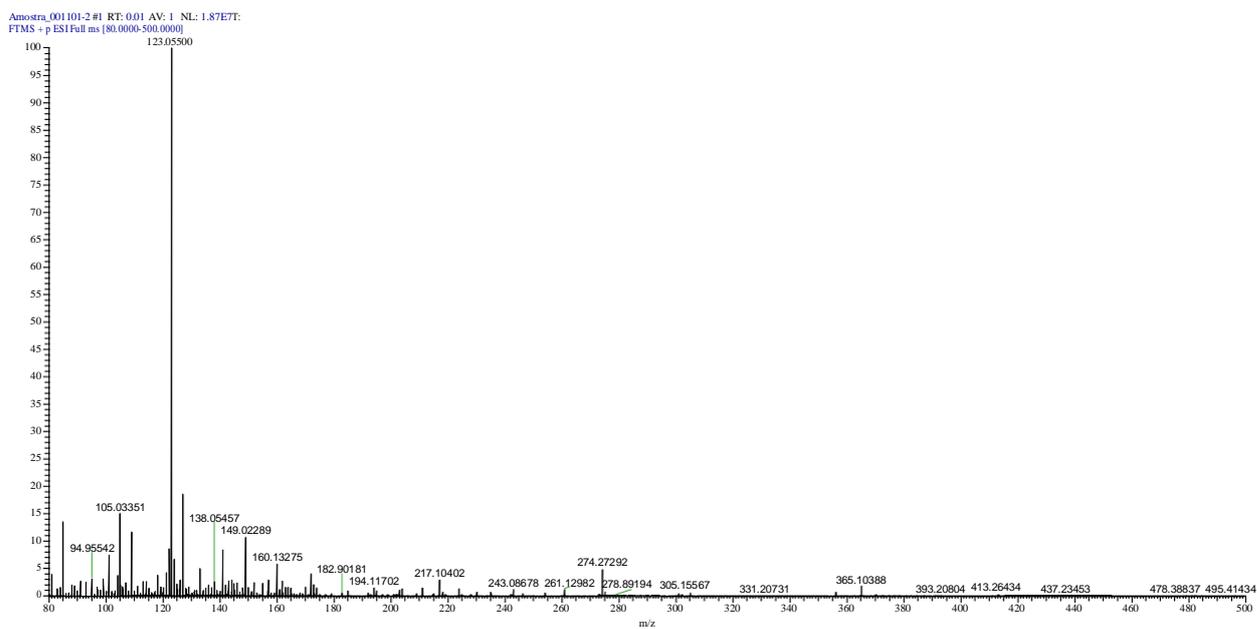
chromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma Aflatoxina G2

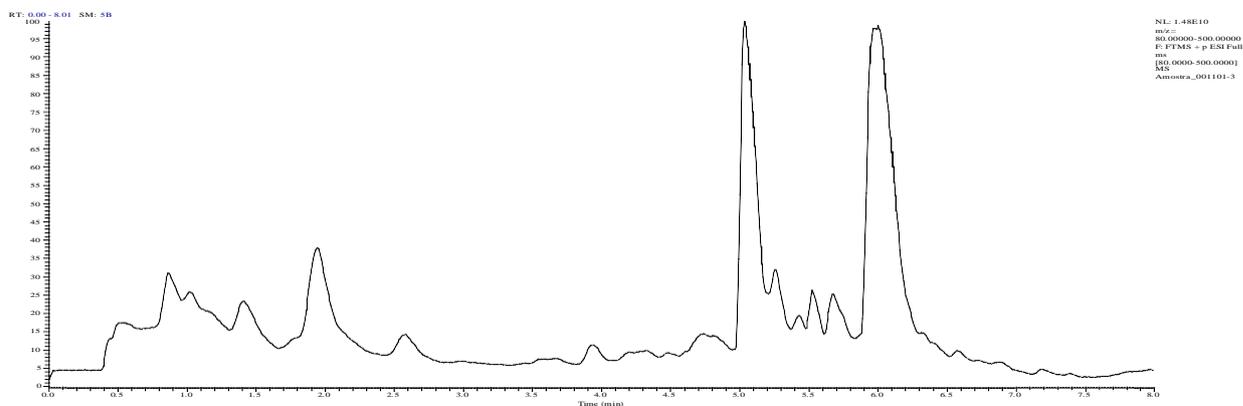


Espectro de massa

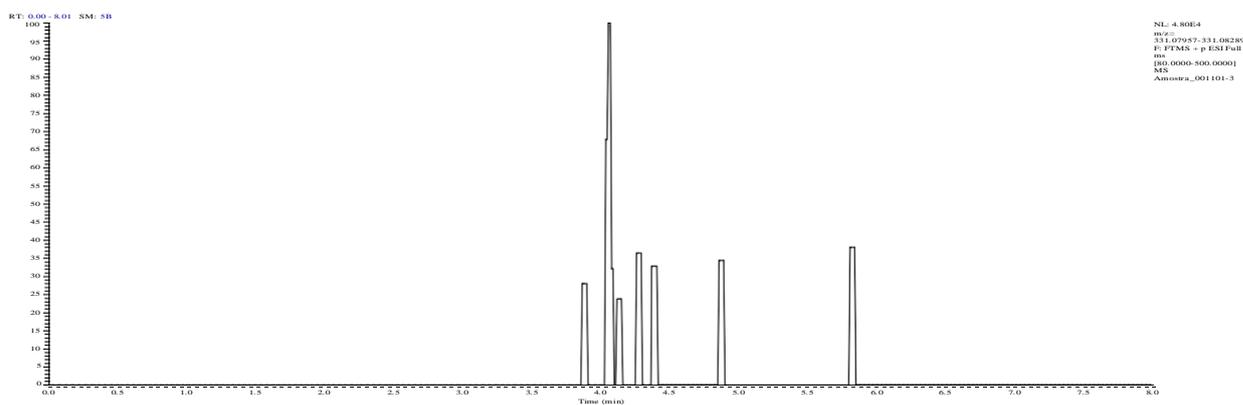


Amostra 1101 - 3

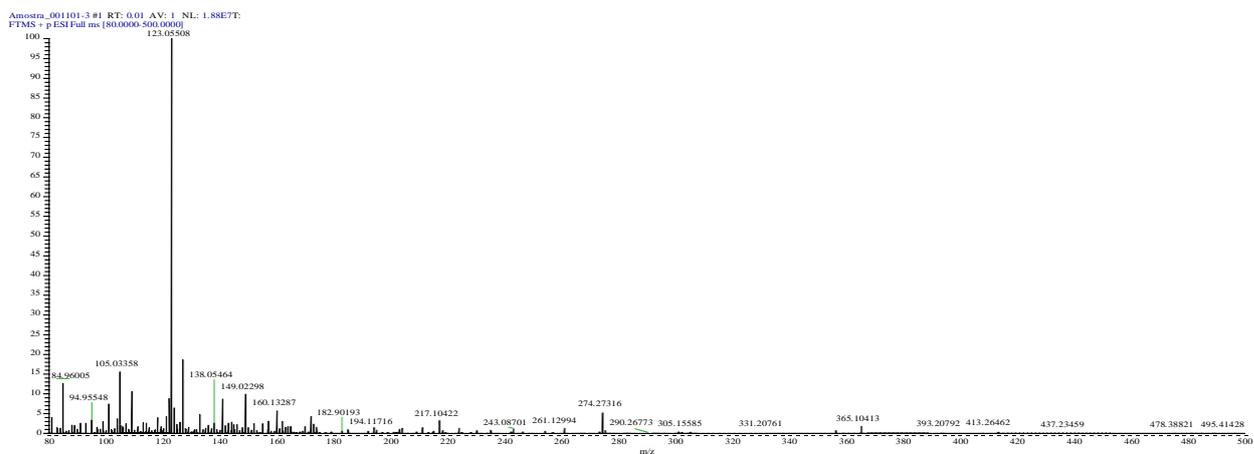
cromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma Aflatoxin G2

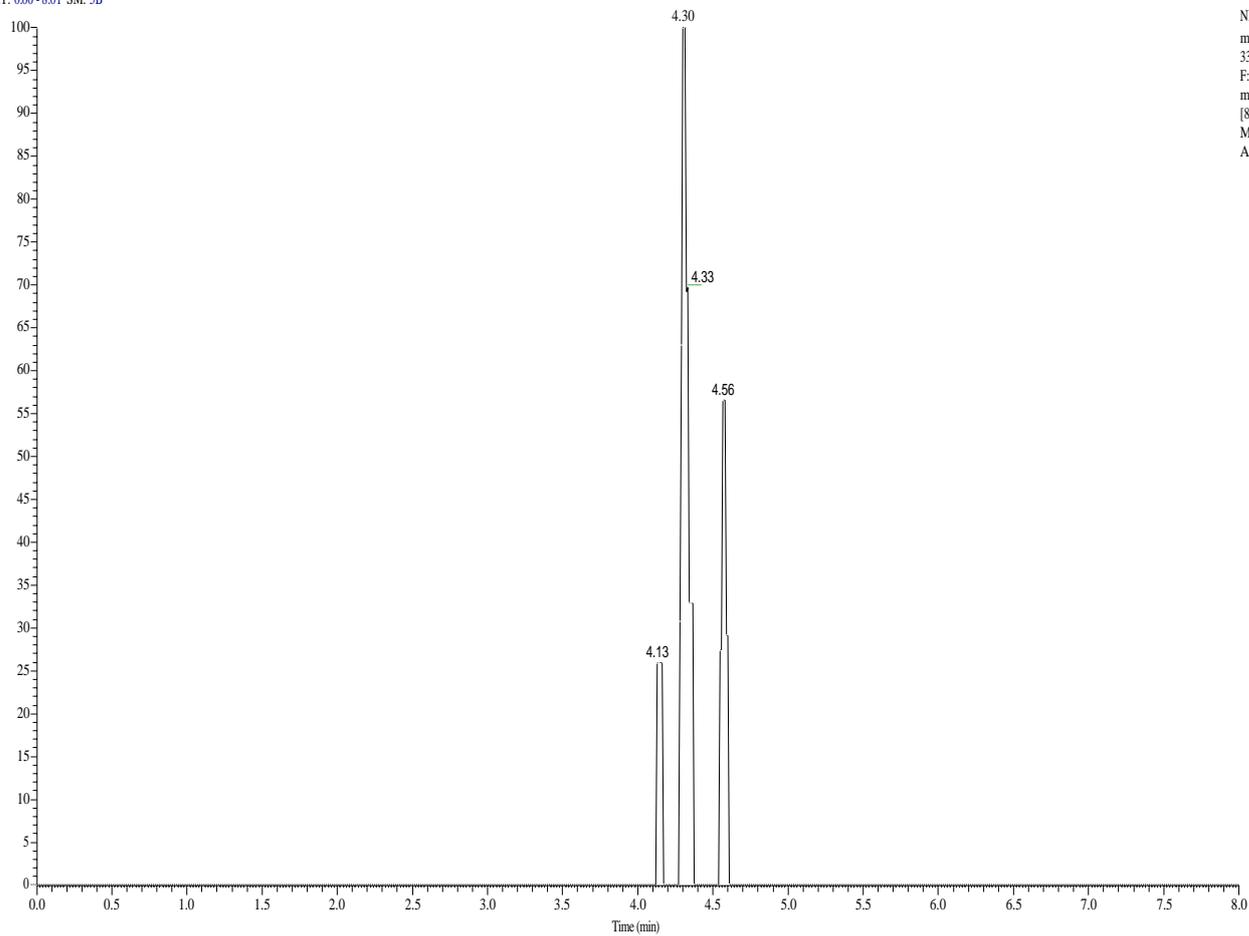


Espectro de massa

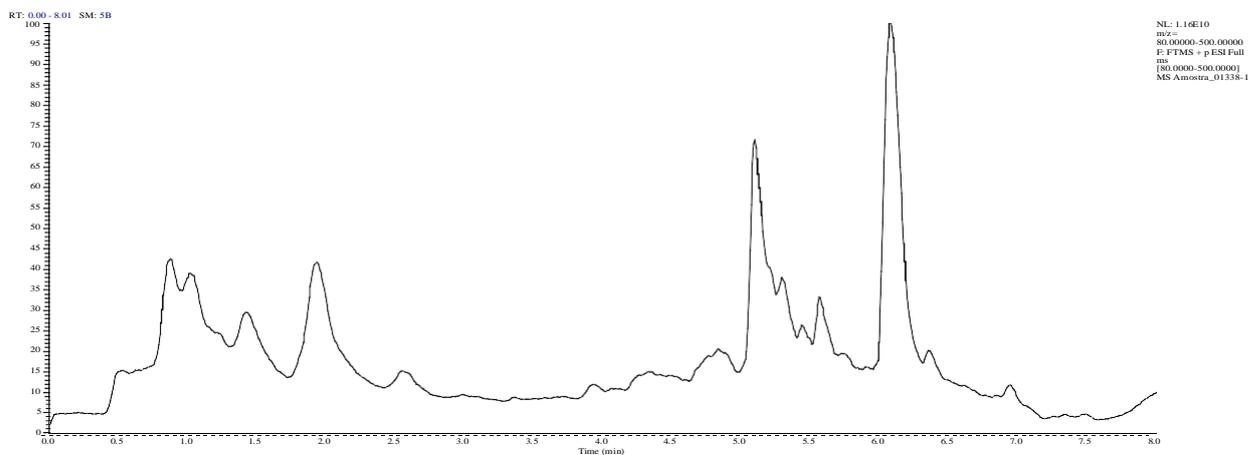
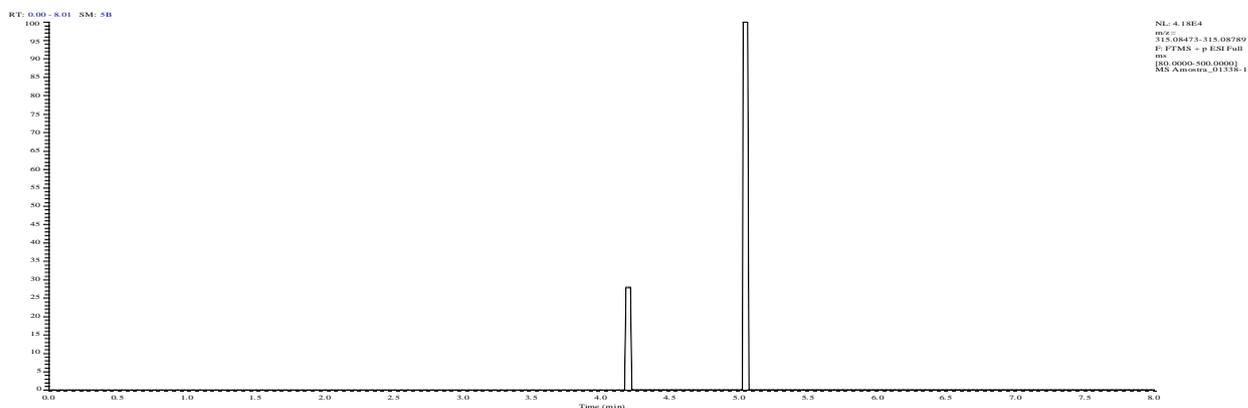
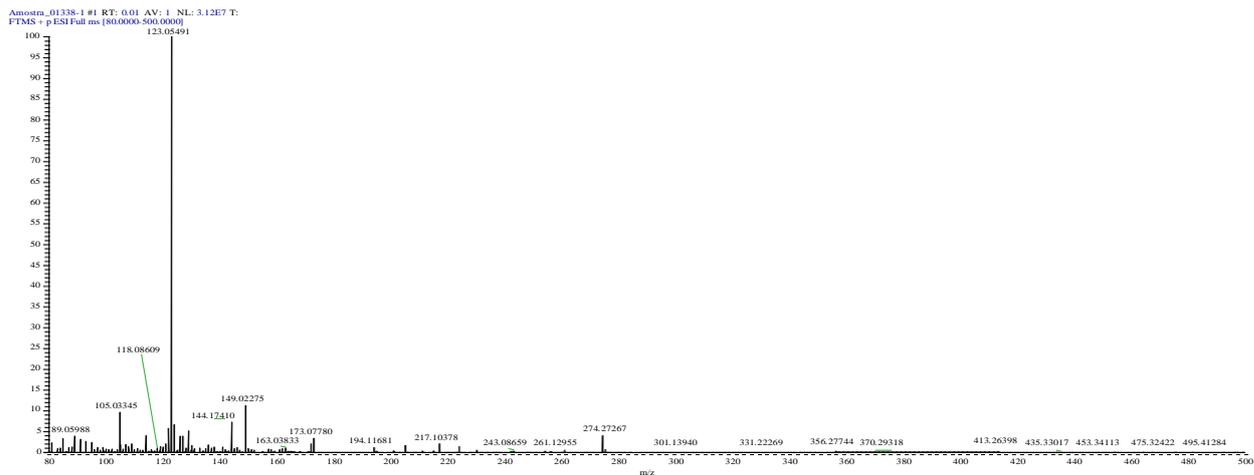


Com tempo de retenção

RT: 000-8.01 SM: 5B

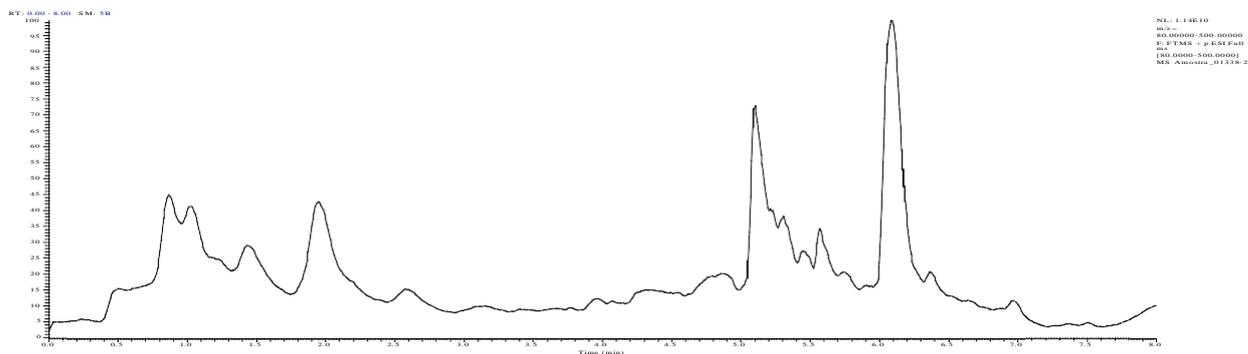


NL: 4.55E4
m/z=
331.07957-331.08289
F: FTMS + p ESI Full
ms
[80.0000-500.0000]
MS
Amostra_001101-1

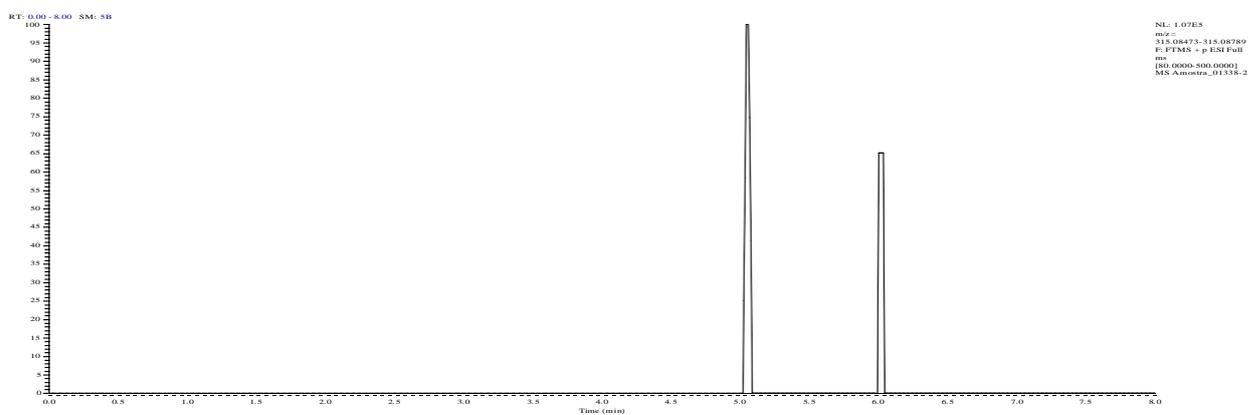
Amostra 1338 – 1**cromatograma Aflatoxina B2****Extração: cromatograma Aflatoxin B2****Espectro de massa**

Amostra 1338 – 2

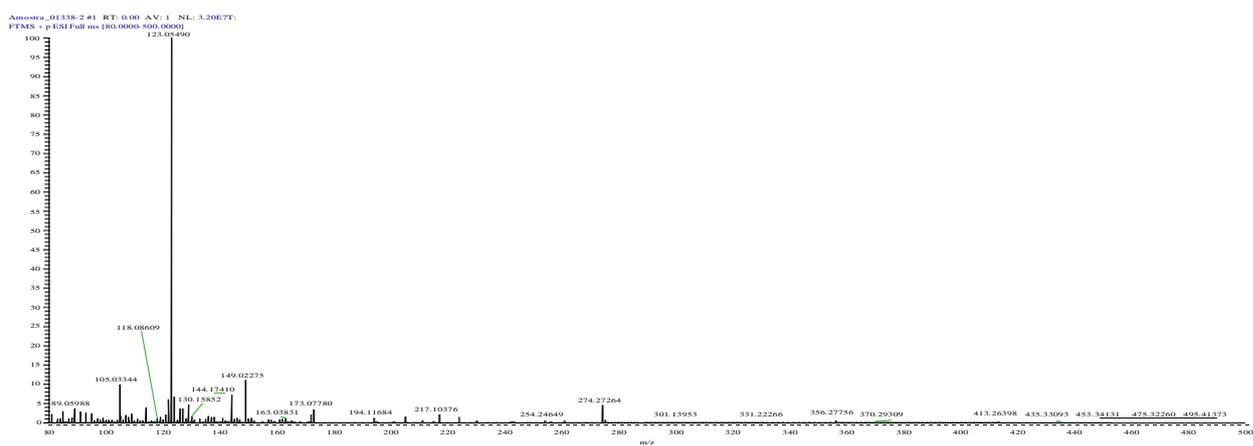
cromatograma da Aflatoxina B2



Extração: cromatograma da Aflatoxin B2

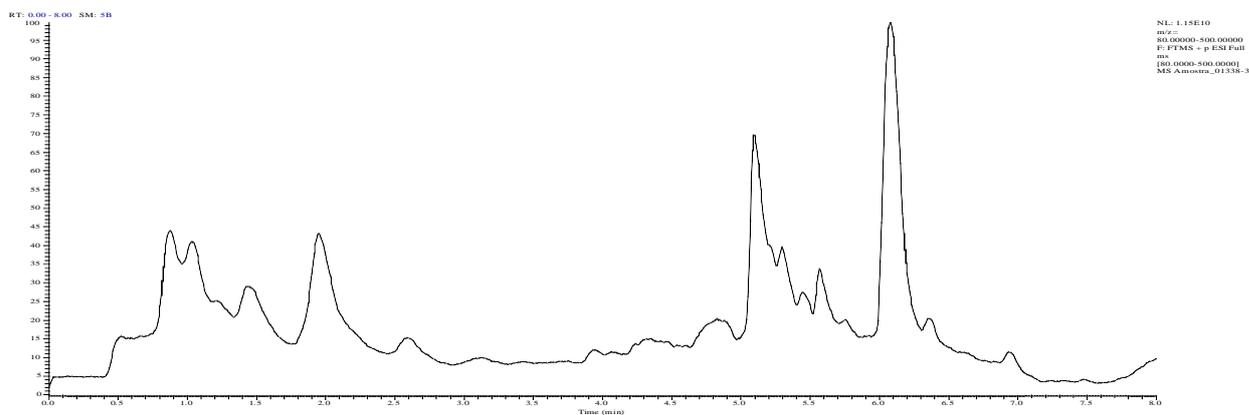


Espectro de massa



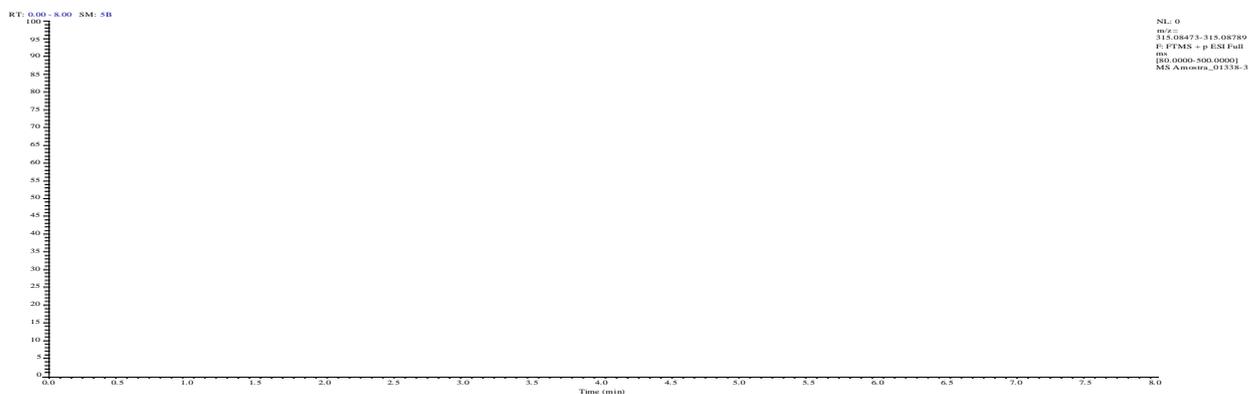
Amostra 1338 – 3

cromatograma da Aflatoxina B2

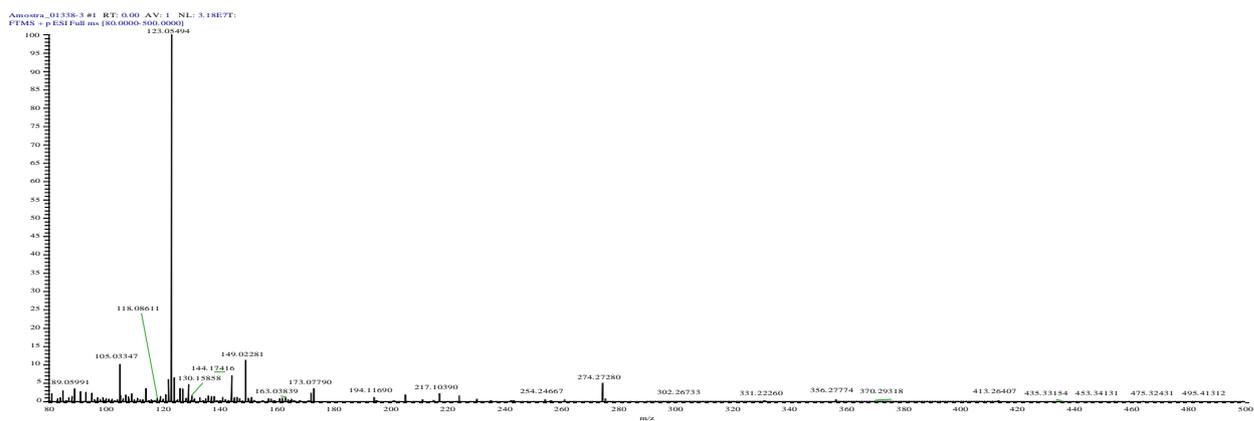


Extração: cromatograma da Aflatoxina B2

Sem pico

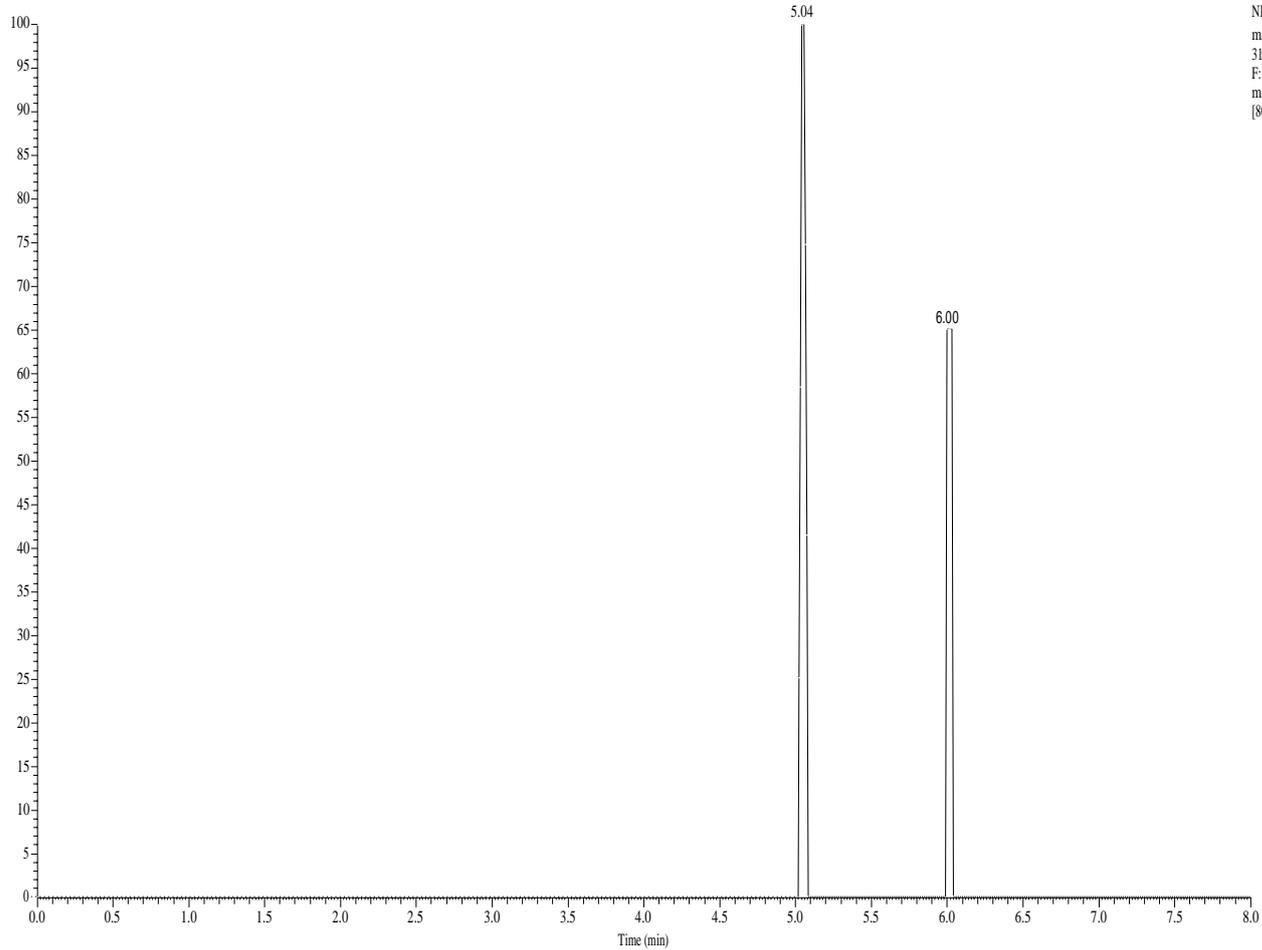


Espectro de massa



Com tempo de retenção

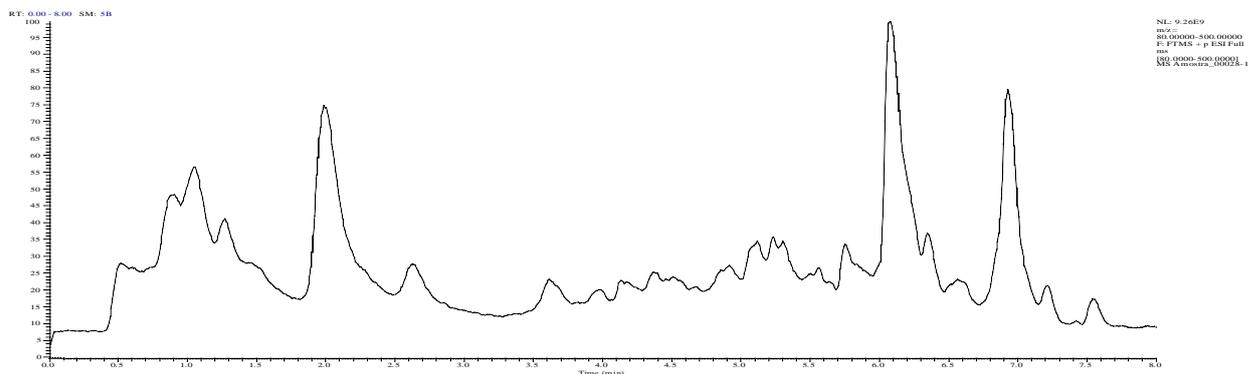
RT: 0.00-8.00 SM: 5B



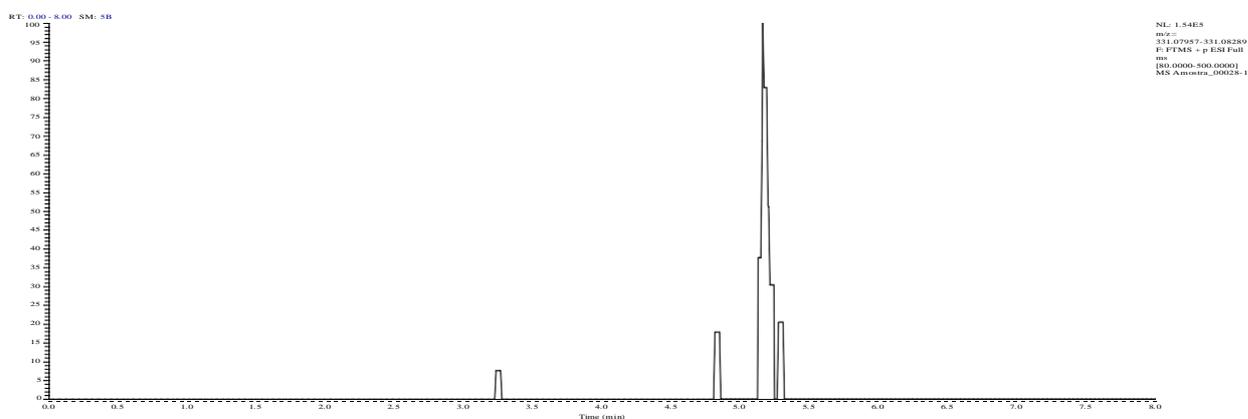
NL: 1.07E5
m/z=
315.08473-315.0878
F: FTMS + p ESI Full
ms
[80.0000-500.0000]
MS Amostra_01338-

Amostra 28 – 1

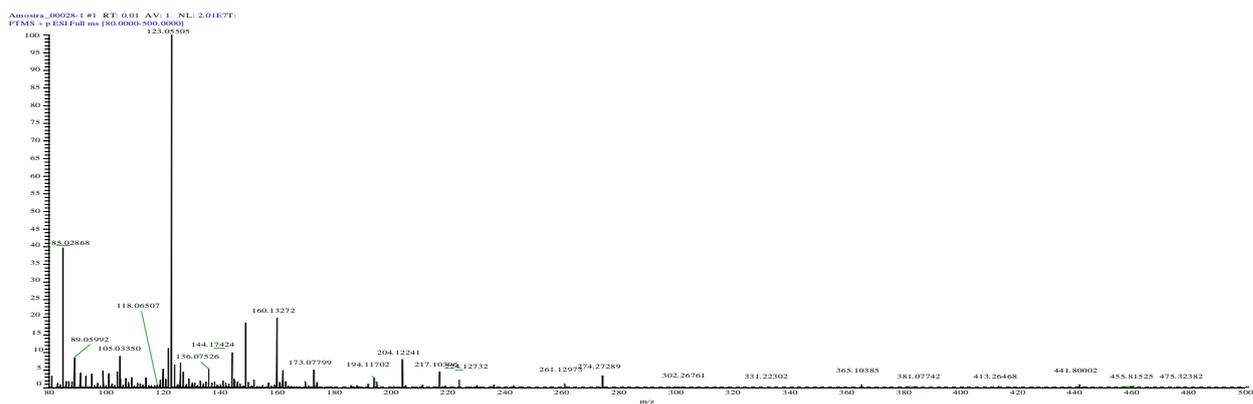
cromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma da Aflatoxina G2

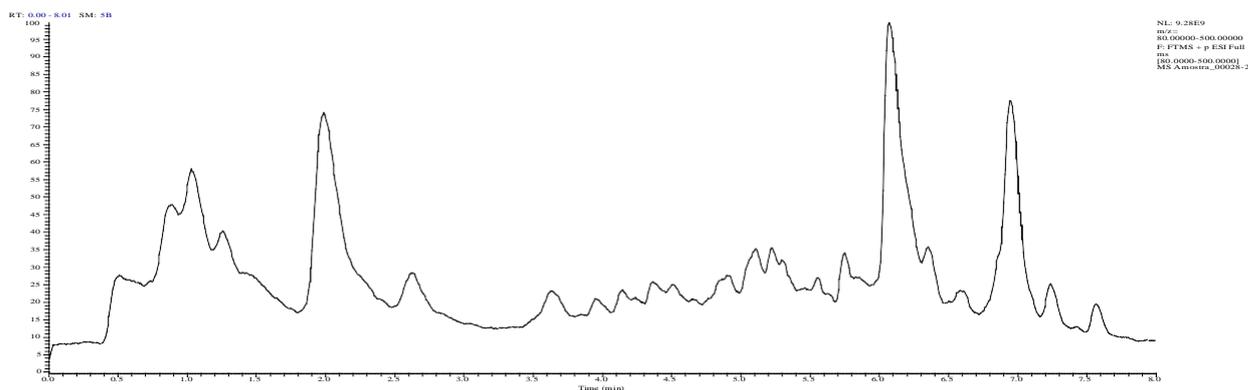


Espectro de massa

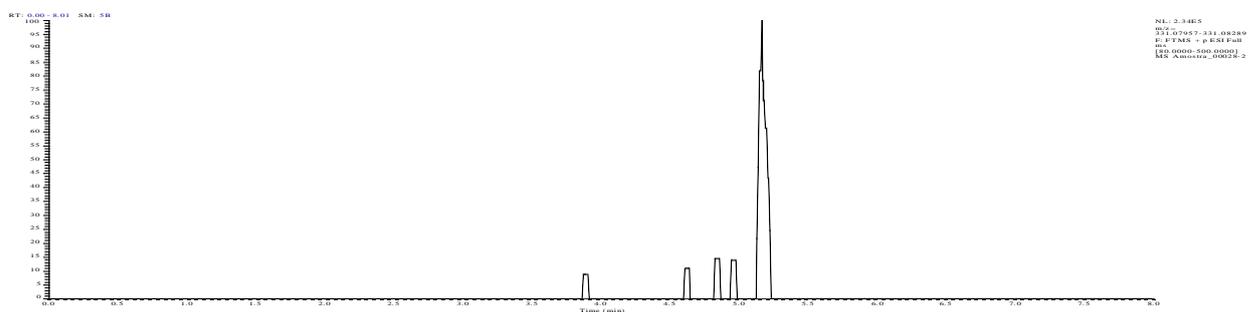


Amostra 28 – 2

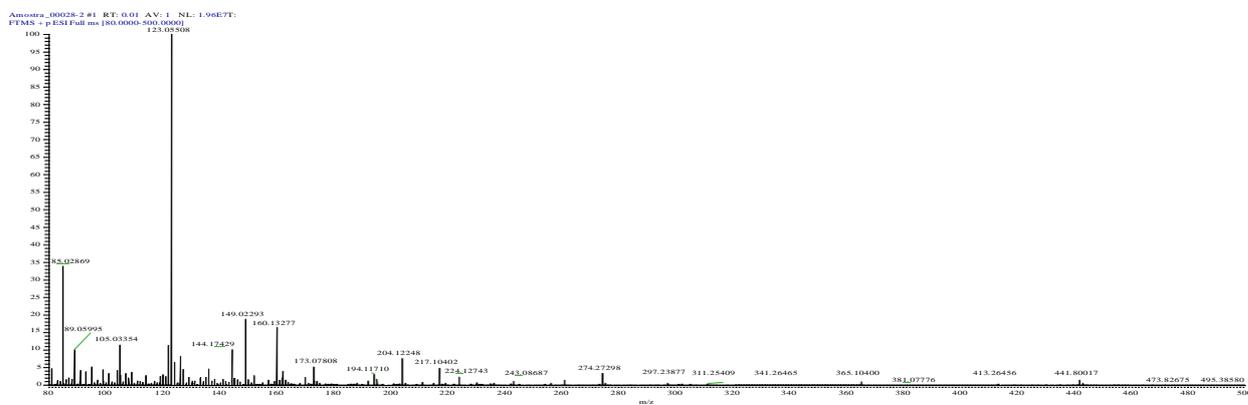
cromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma Aflatoxina G2

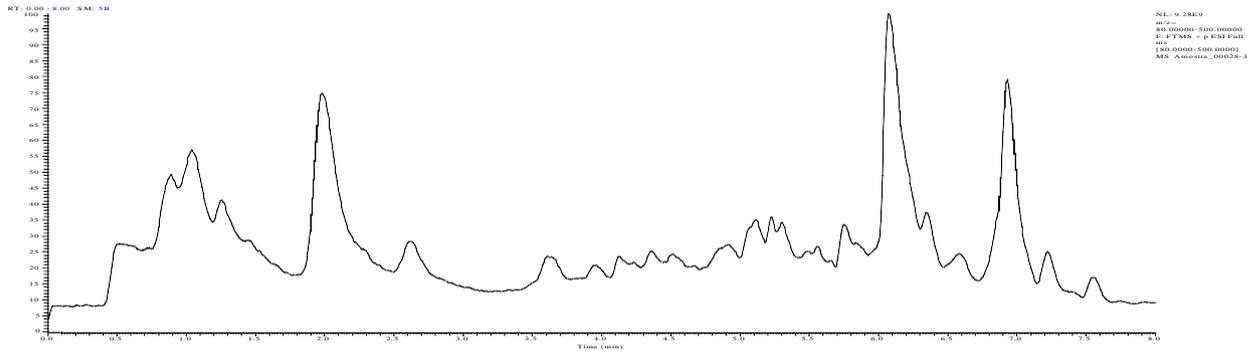


Espectro de massa

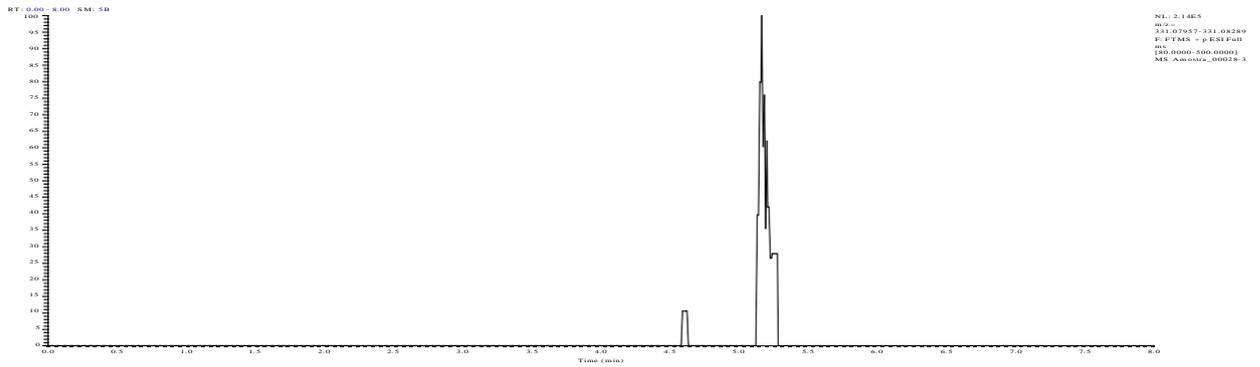


Amostra 28 – 3

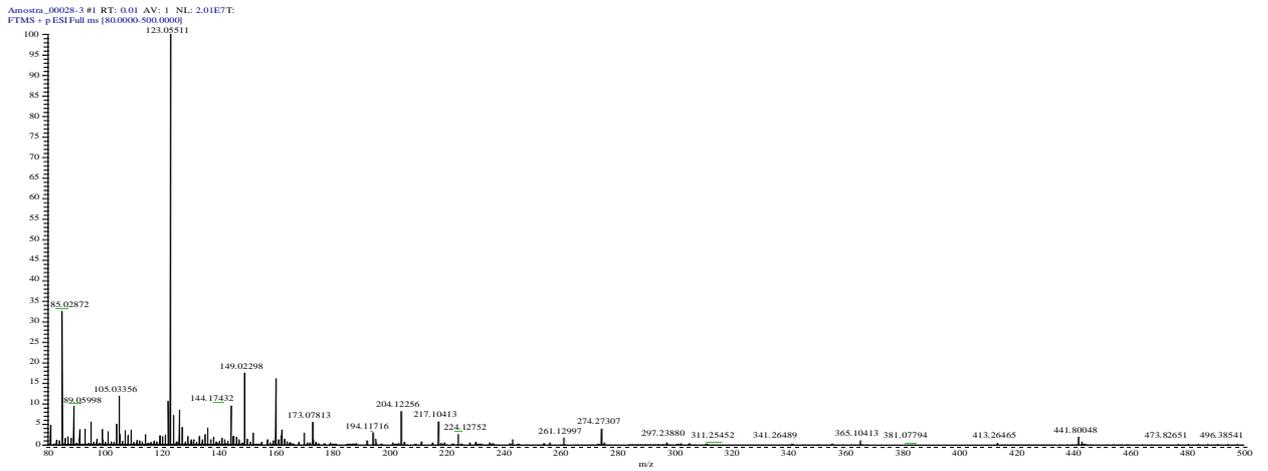
chromatograma da Aflatoxina G2



Extração: chromatograma da Aflatoxina G2

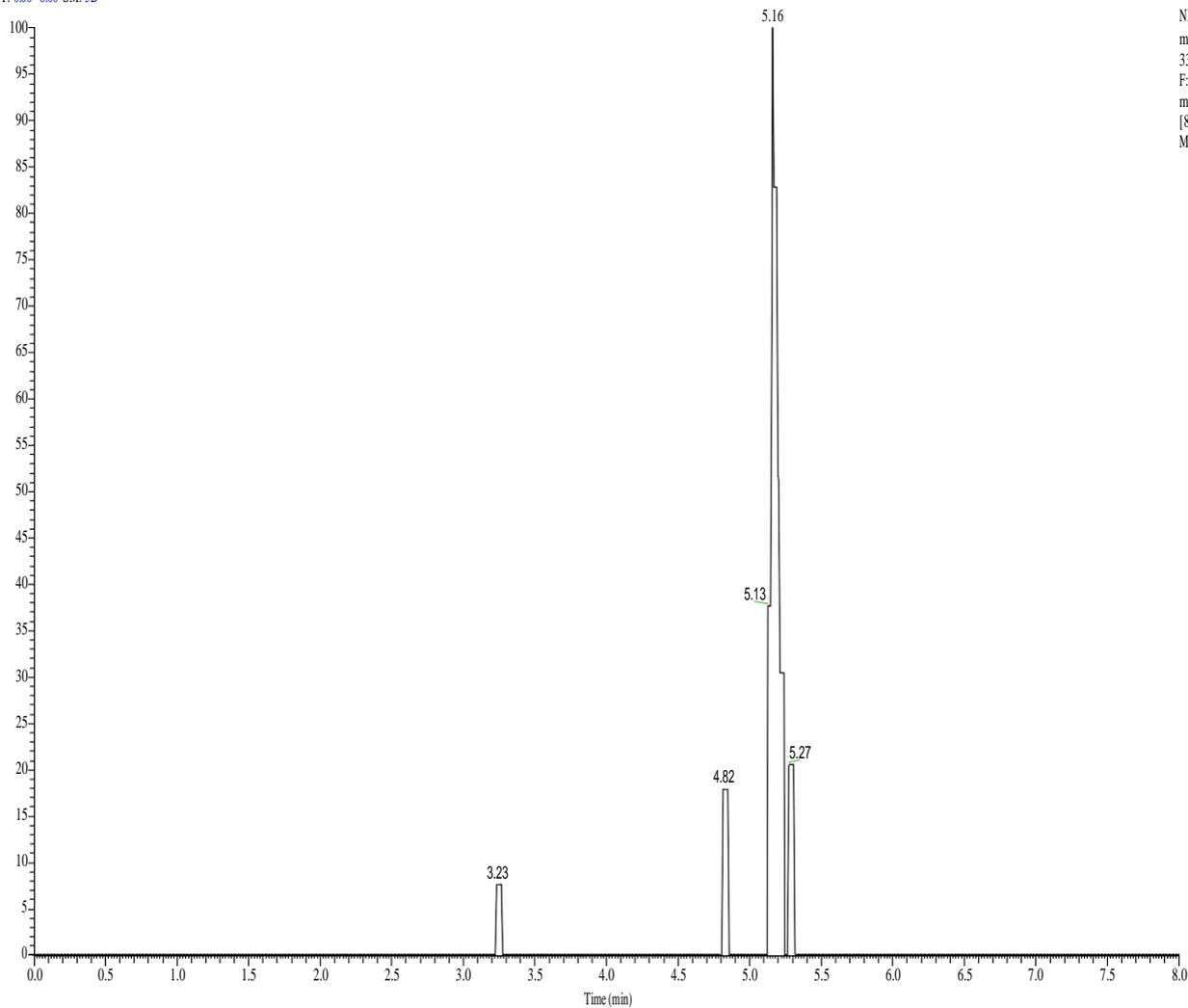


Espectro de massa



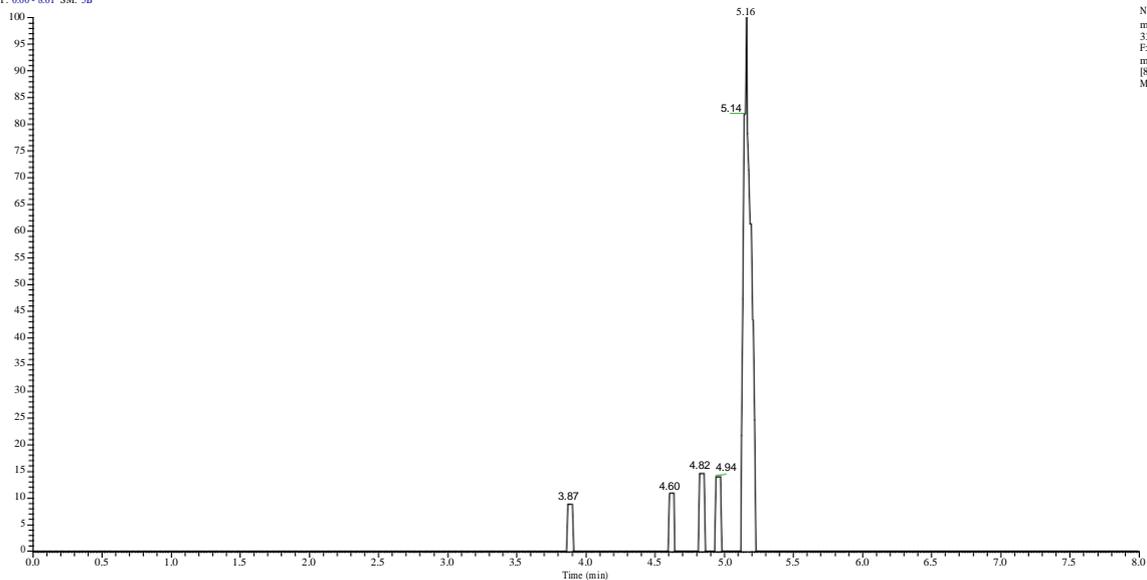
Com tempo de retenção

RT: 0.00 - 8.00 SM: 5B



NL: 1.54E5
m/z=
331.07957-331.08289
F: FTMS + p ESI Full
ms
[80.0000-500.0000]
MS Amostra_00028-1

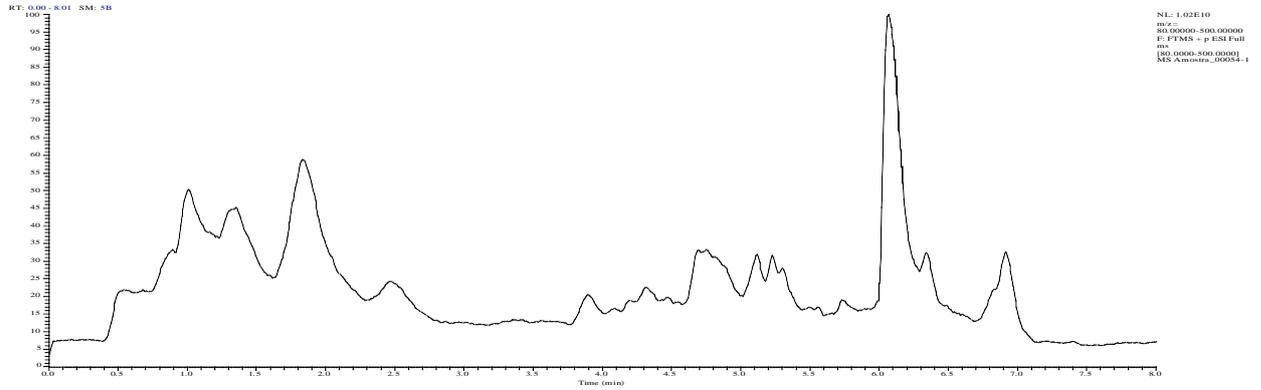
RT: 0.00 - 8.01 SM: 5B



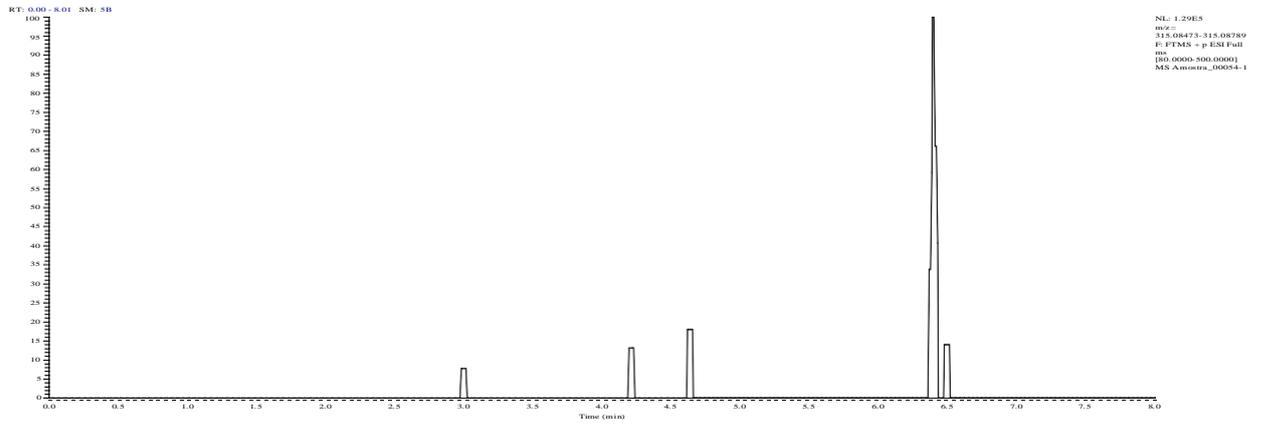
NL: 2.34E5
m/z=
331.07957-331.08289
F: FTMS + p ESI Full
ms
[80.0000-500.0000]
MS Amostra_00028-2

Amostra 54 – 1

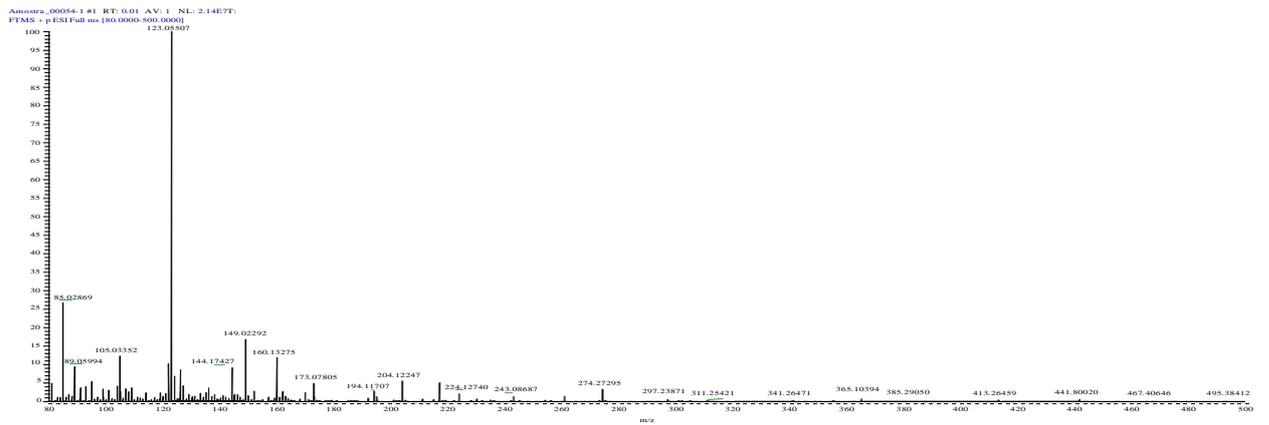
cromatograma da Aflatoxina B2



Extração: cromatograma da Aflatoxin B2

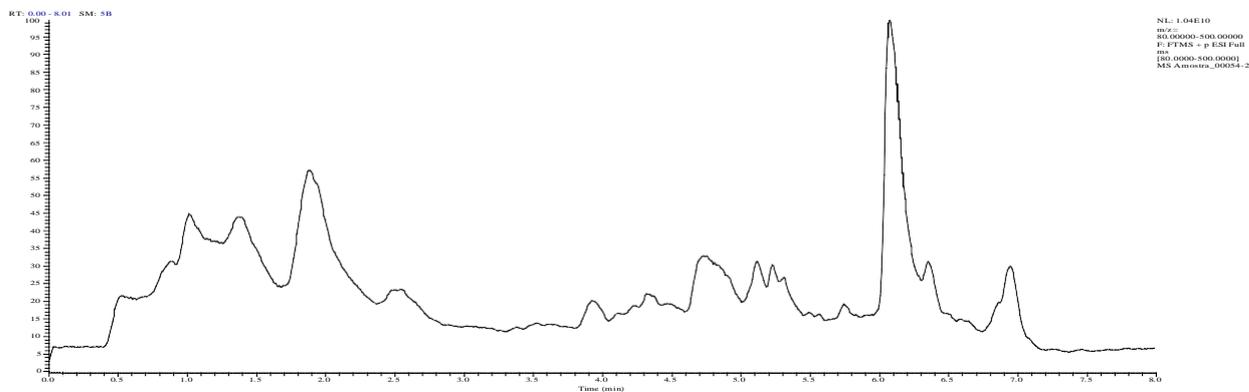


Espectro de massa

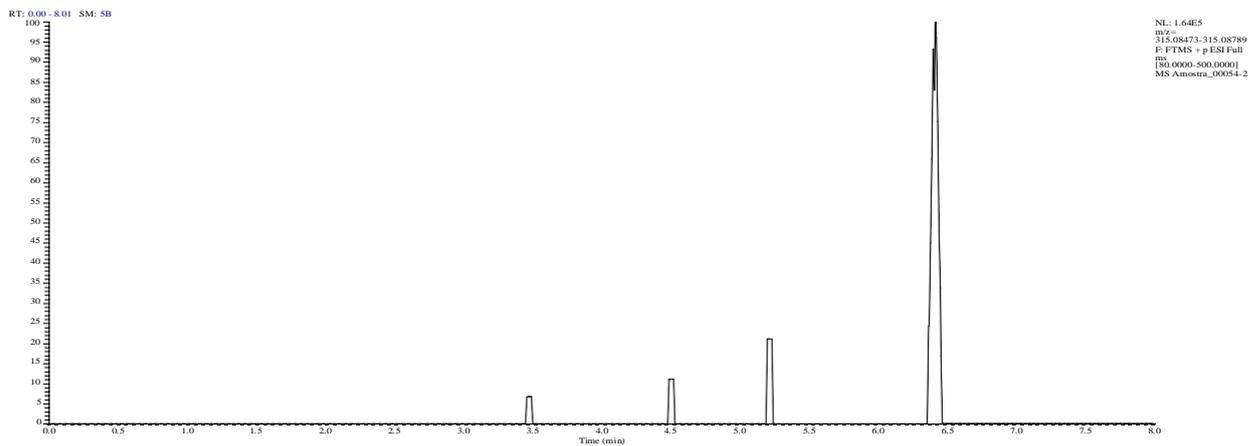


Amostra 54 – 2

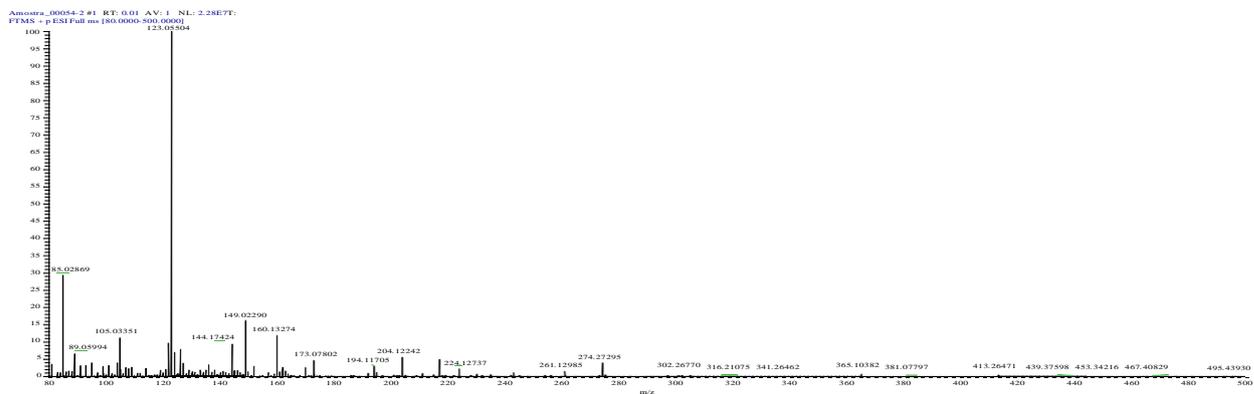
chromatograma da Aflatoxina B2



Extração: chromatograma da Aflatoxina B2

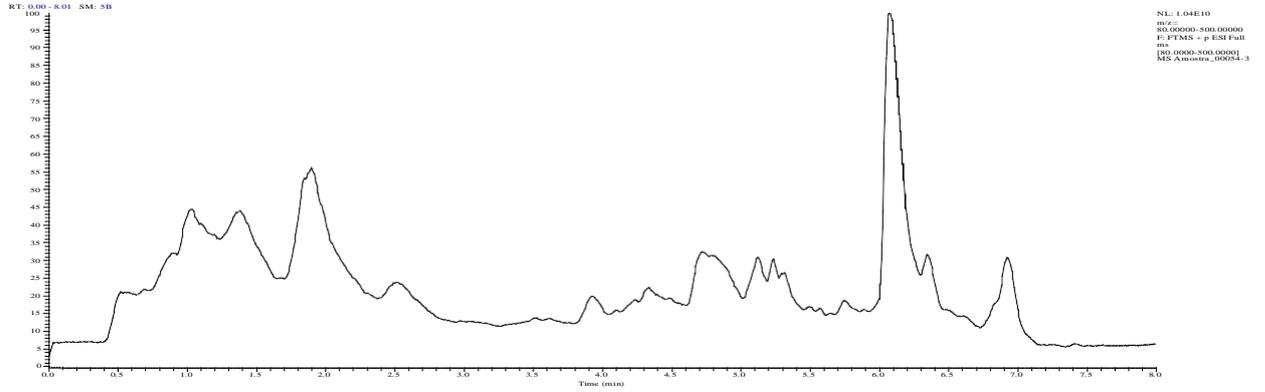


Espectro de massa

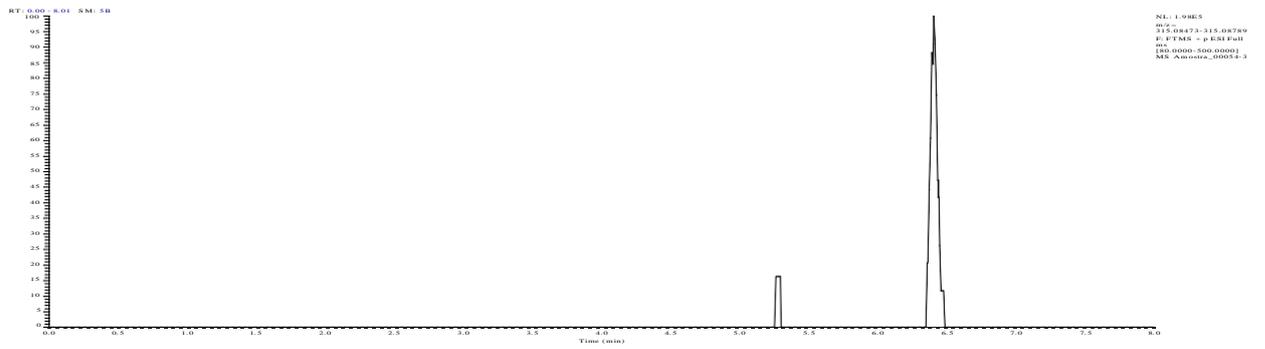


Amostra 54 – 3

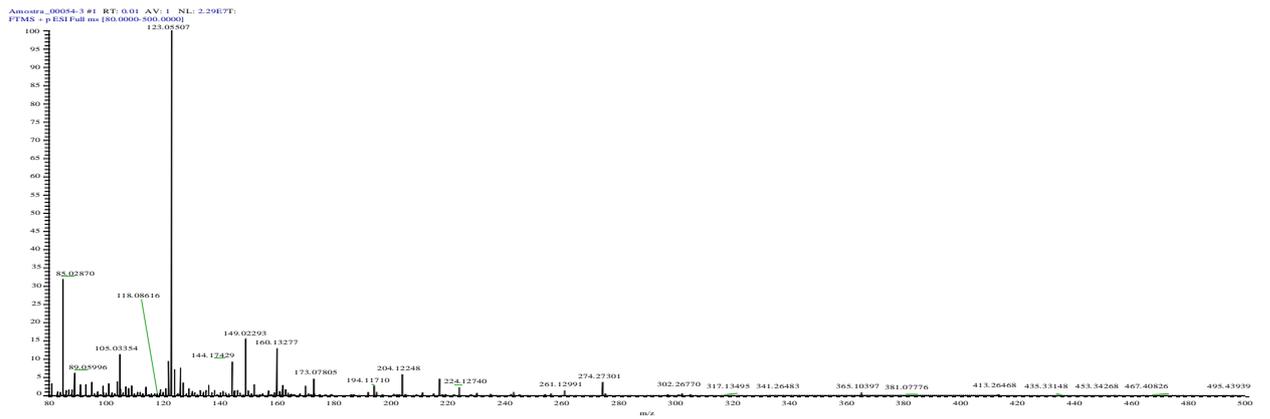
cromatograma da Aflatoxina B2



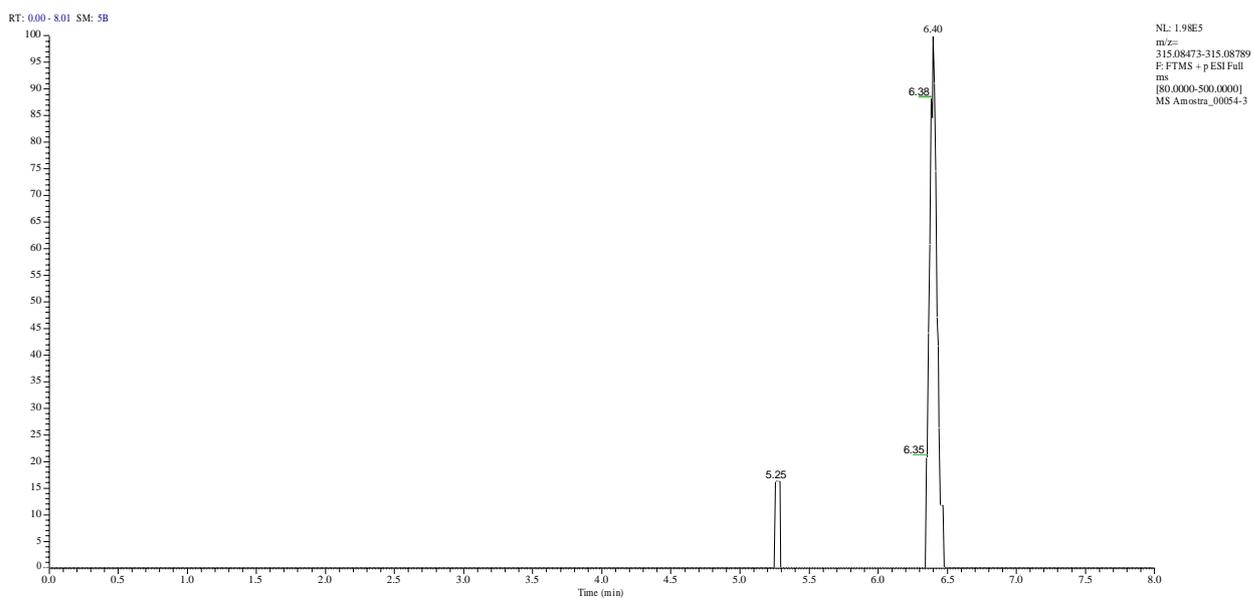
Extração: cromatograma da Aflatoxina B2



Espectro de massa

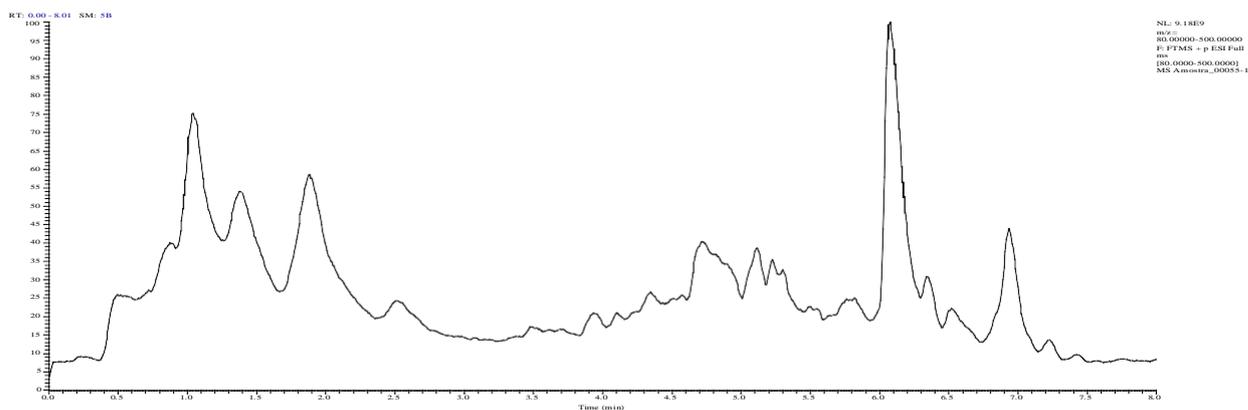


Com tempo de retenção

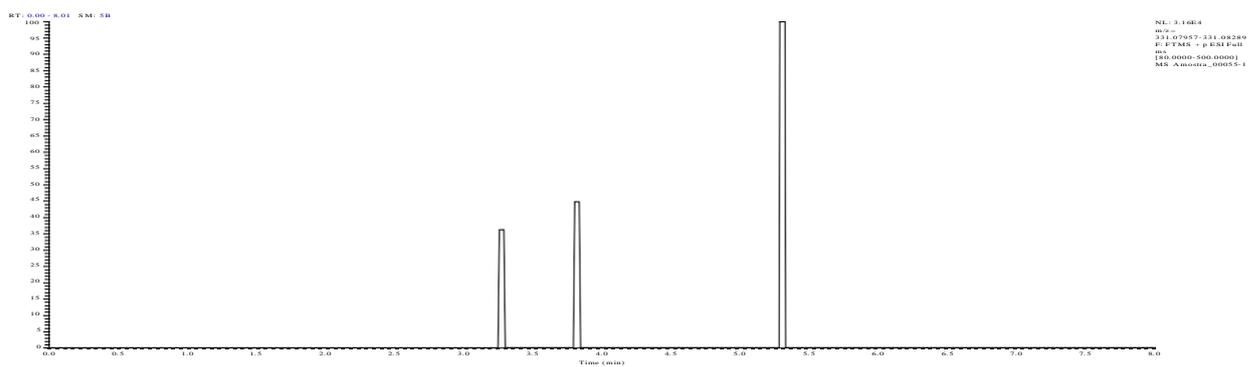


Amostra 55 – 1

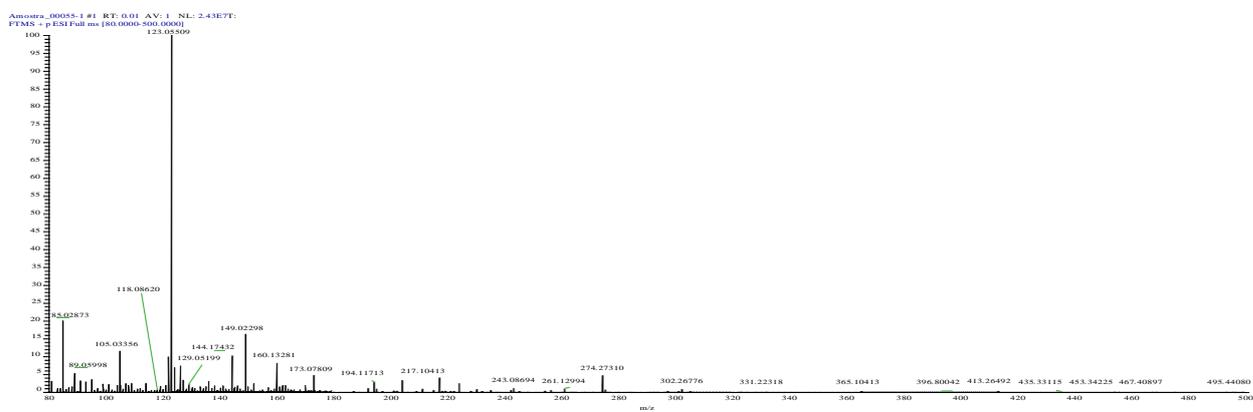
chromatograma da Aflatoxina G2



Extração: chromatograma da Aflatoxina G2

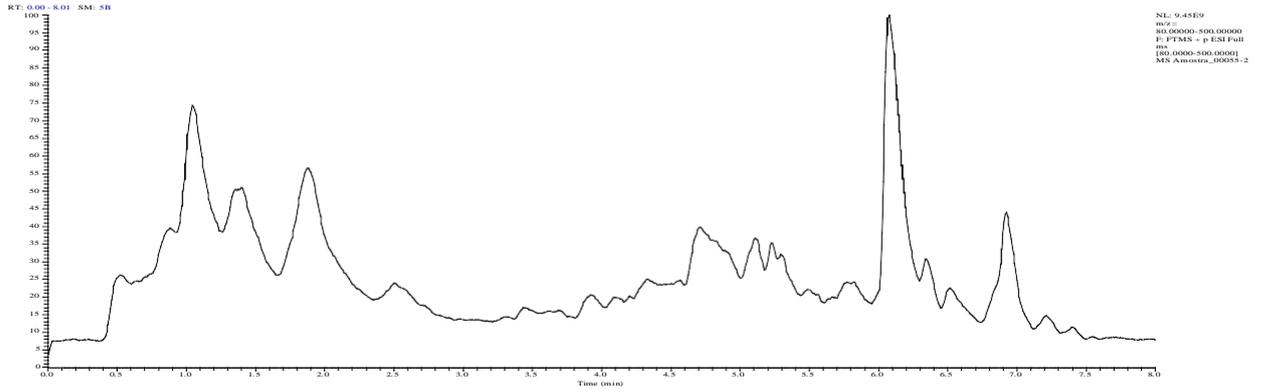


Espectro de massa

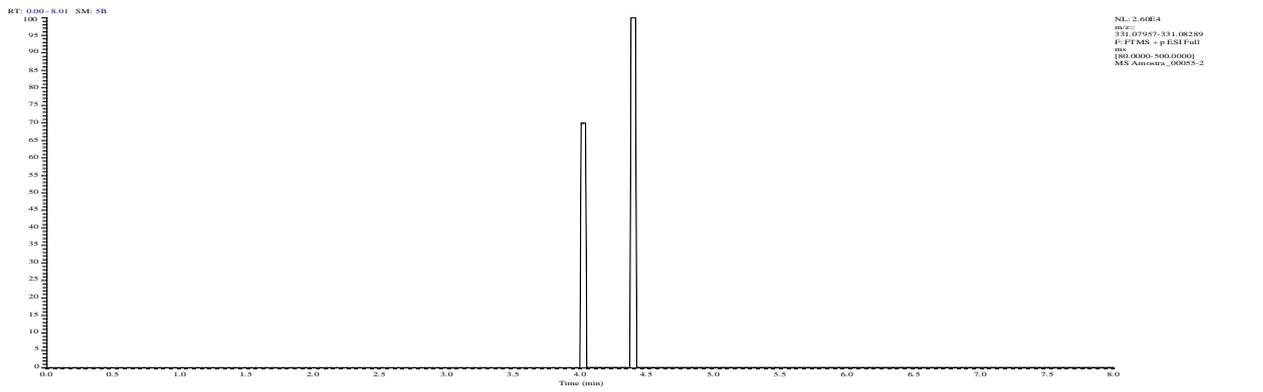


Amostra 55 – 2

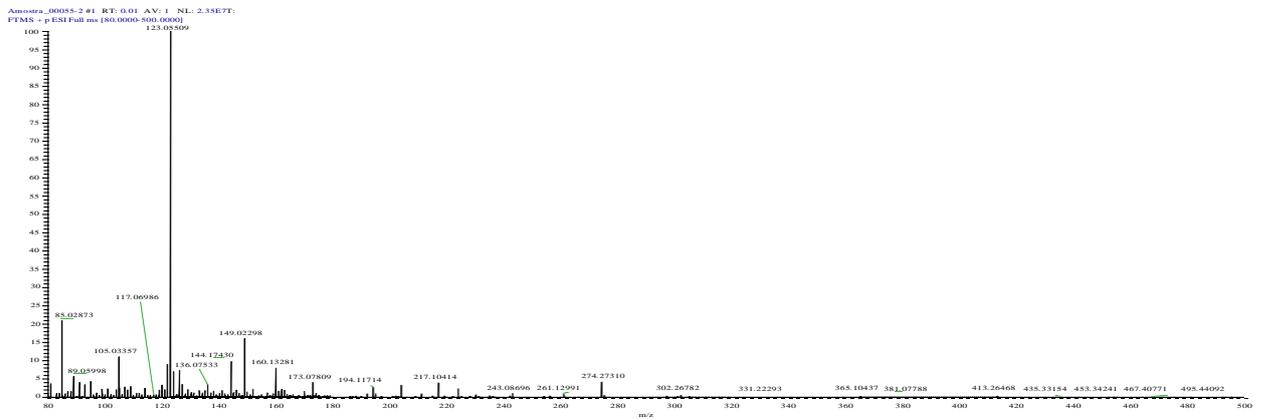
cromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma da Aflatoxina G2

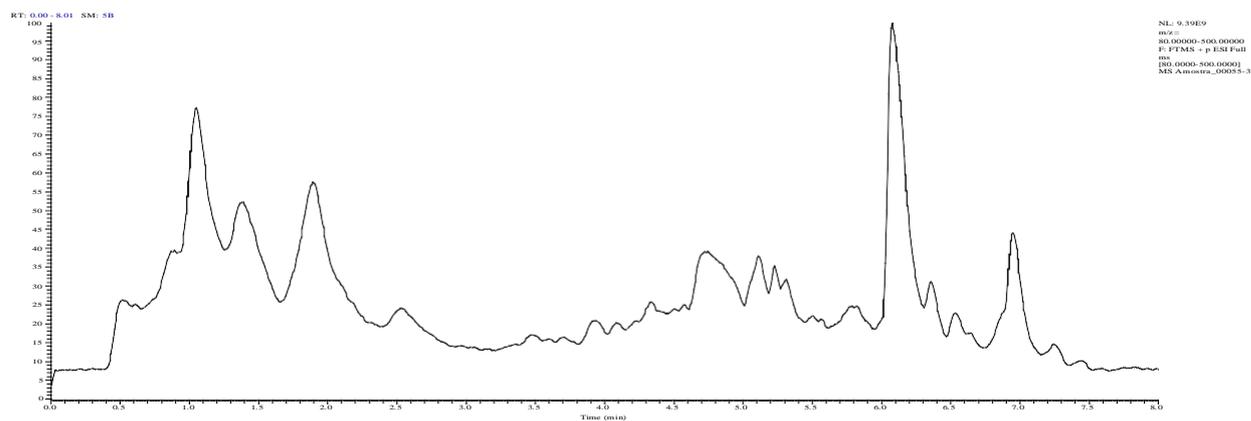


Espectro de massa

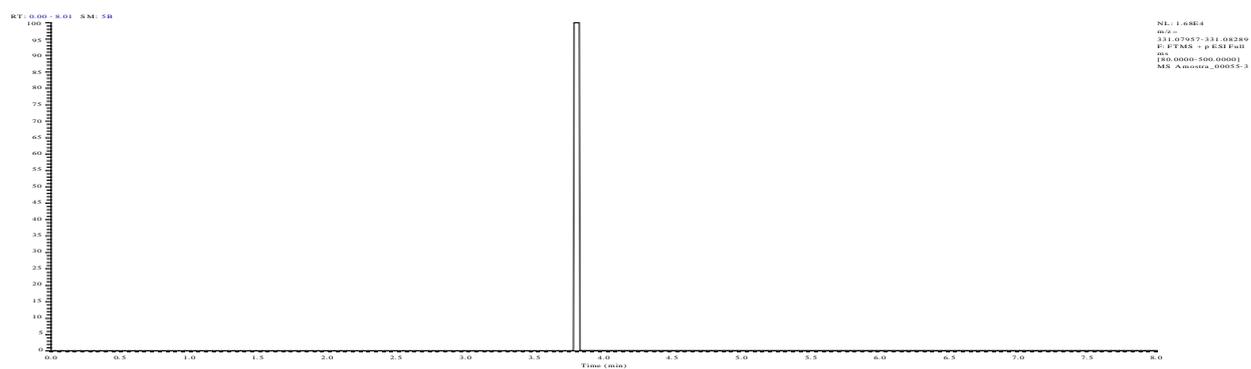


Amostra 55 – 3

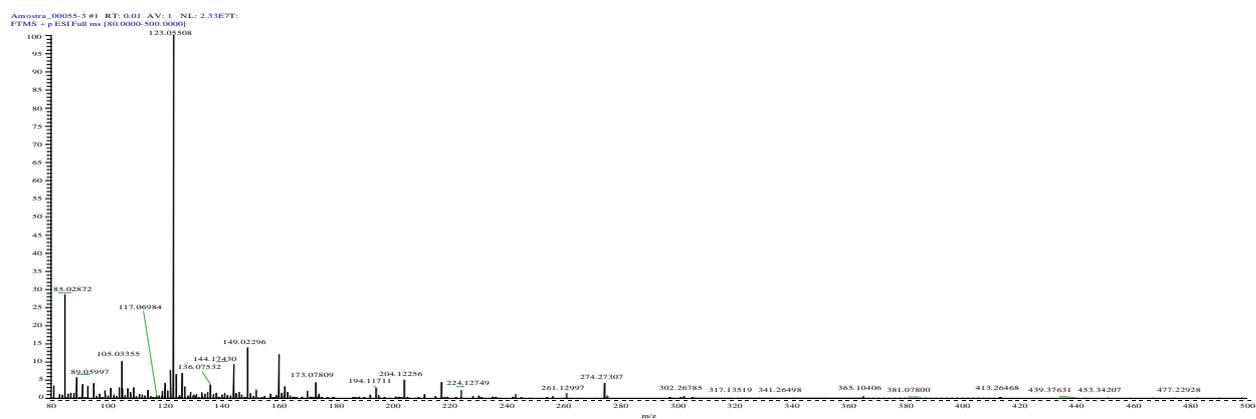
chromatograma da Aflatoxina G2



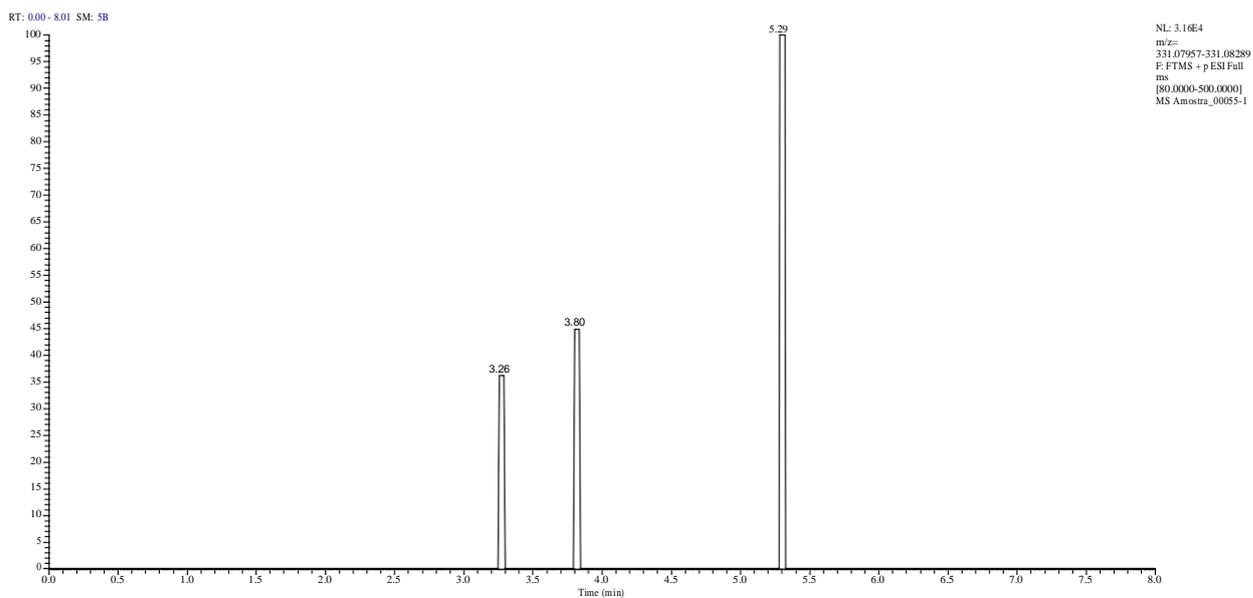
Extração: cromatograma da Aflatoxina G2



Espectro de massa

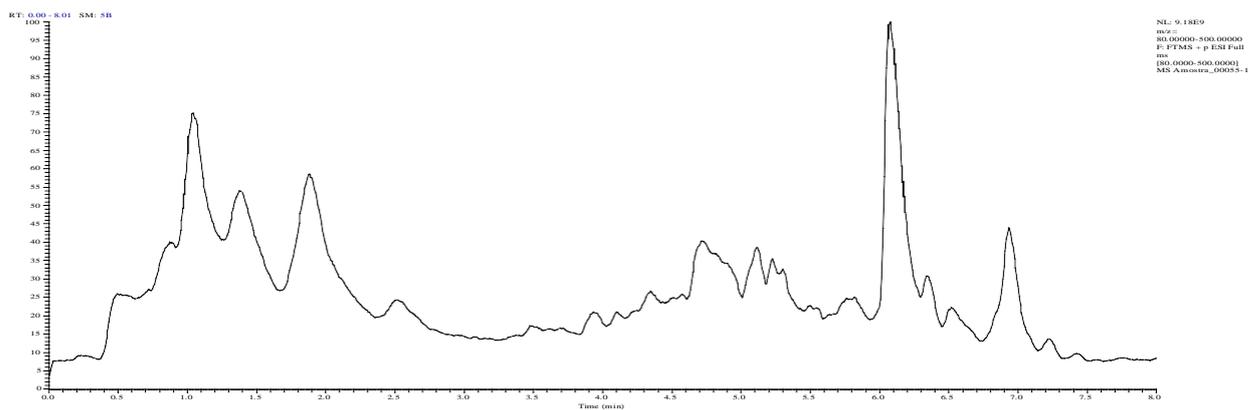


Com tempo de retenção

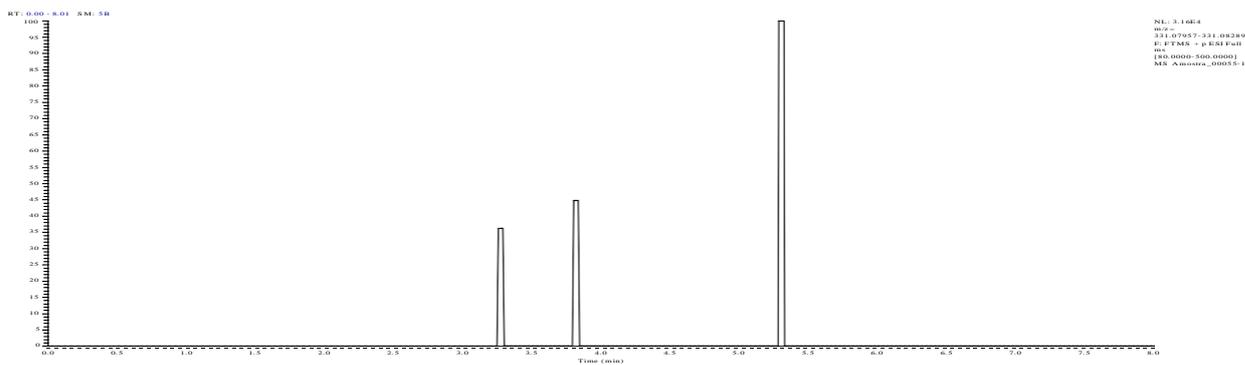


Amostra 55 - 1

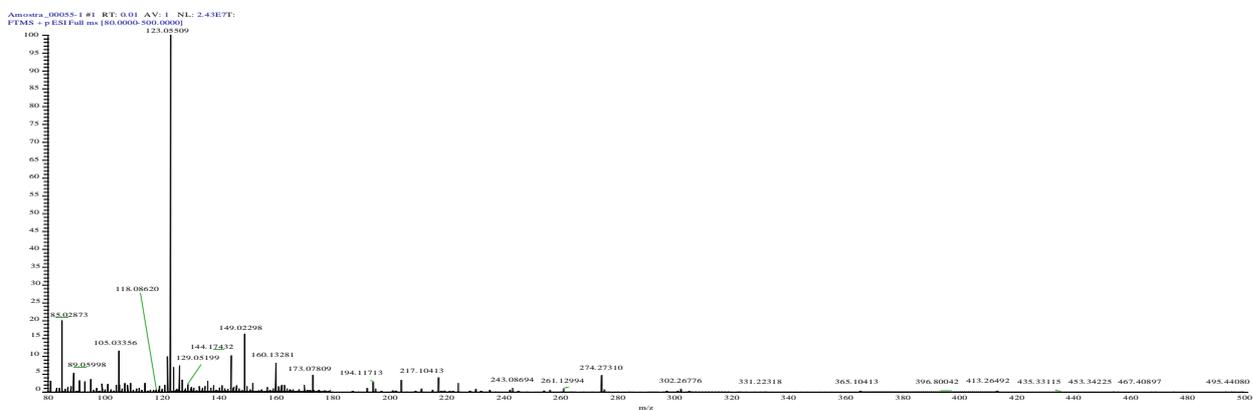
chromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma da Aflatoxina G2

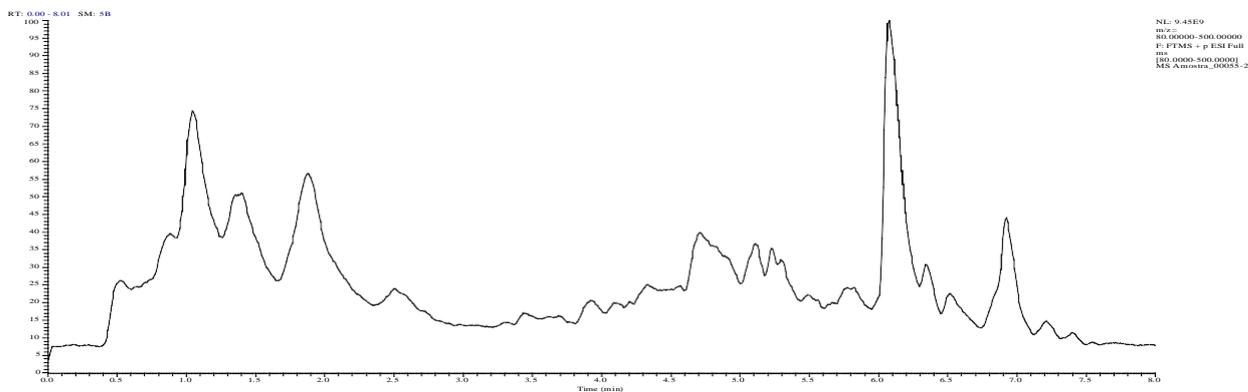


Espectro de massa

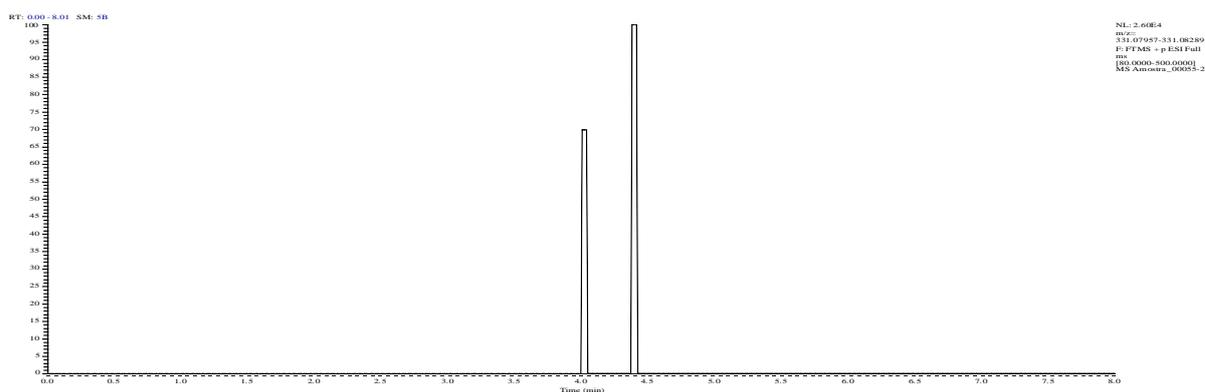


Amostra 55 - 2

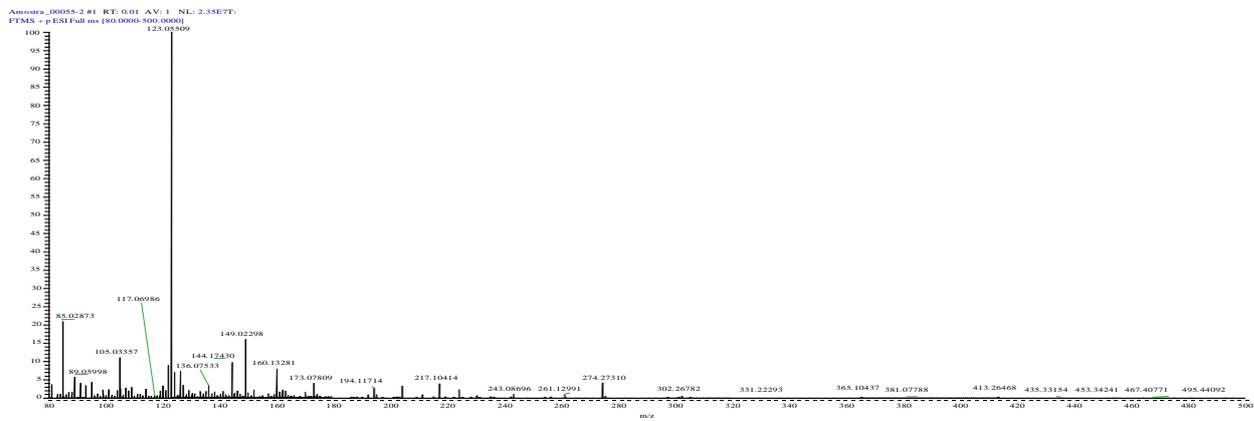
chromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma da Aflatoxina G2

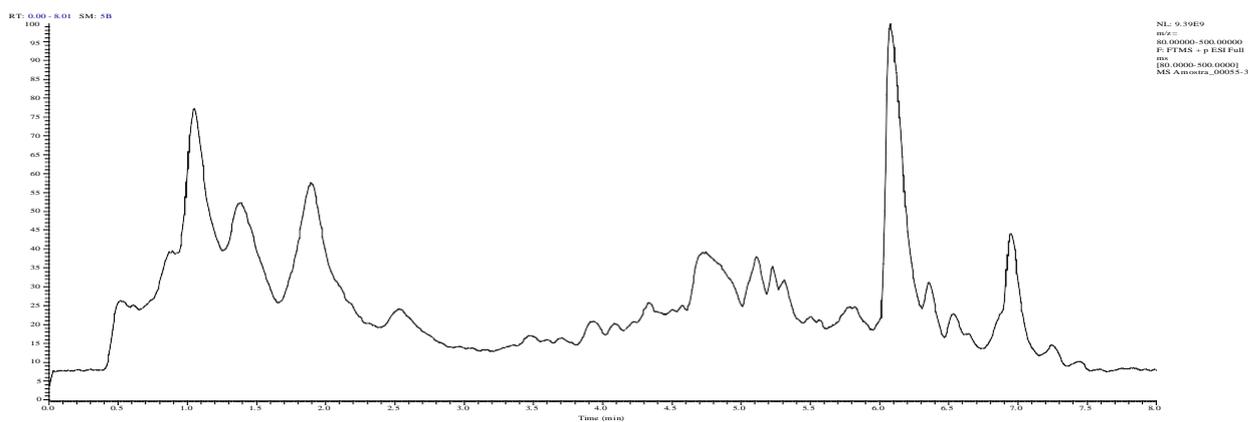


Espectro de massa

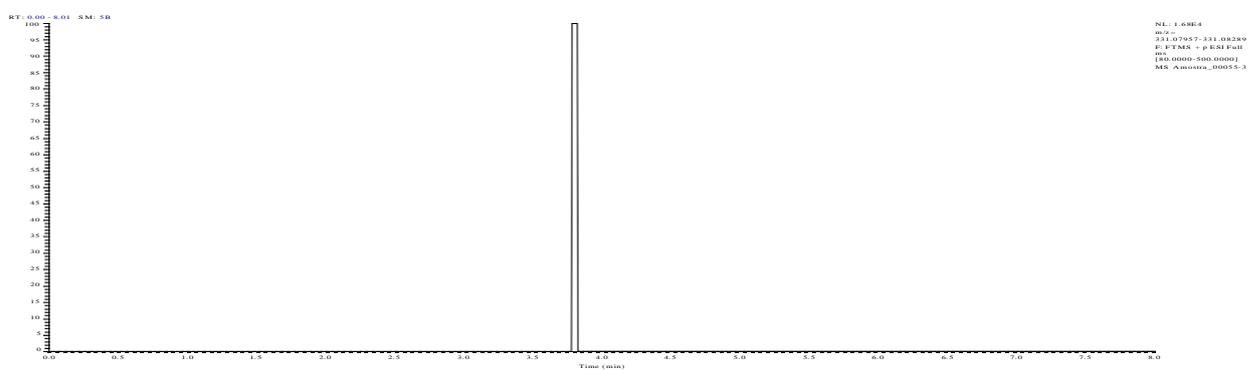


Amostra 55 – 3

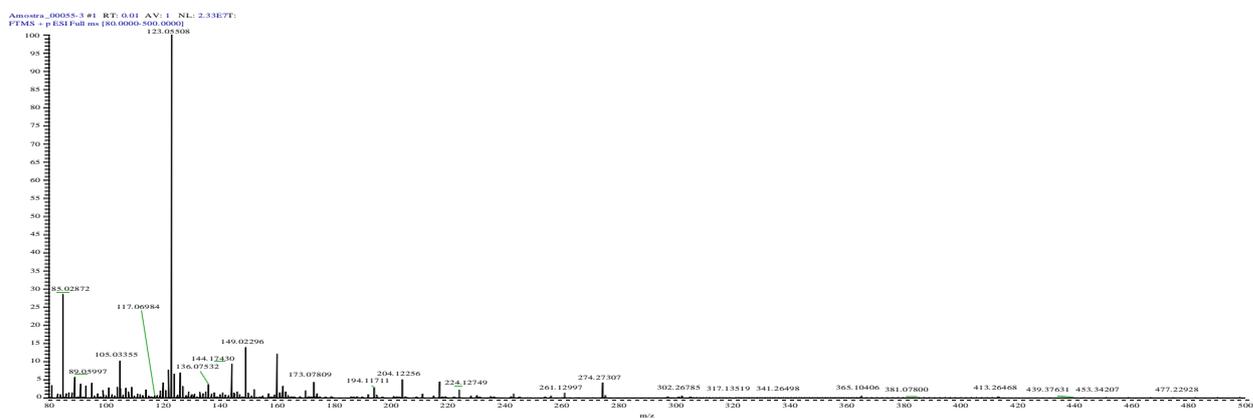
chromatograma da Aflatoxina G2



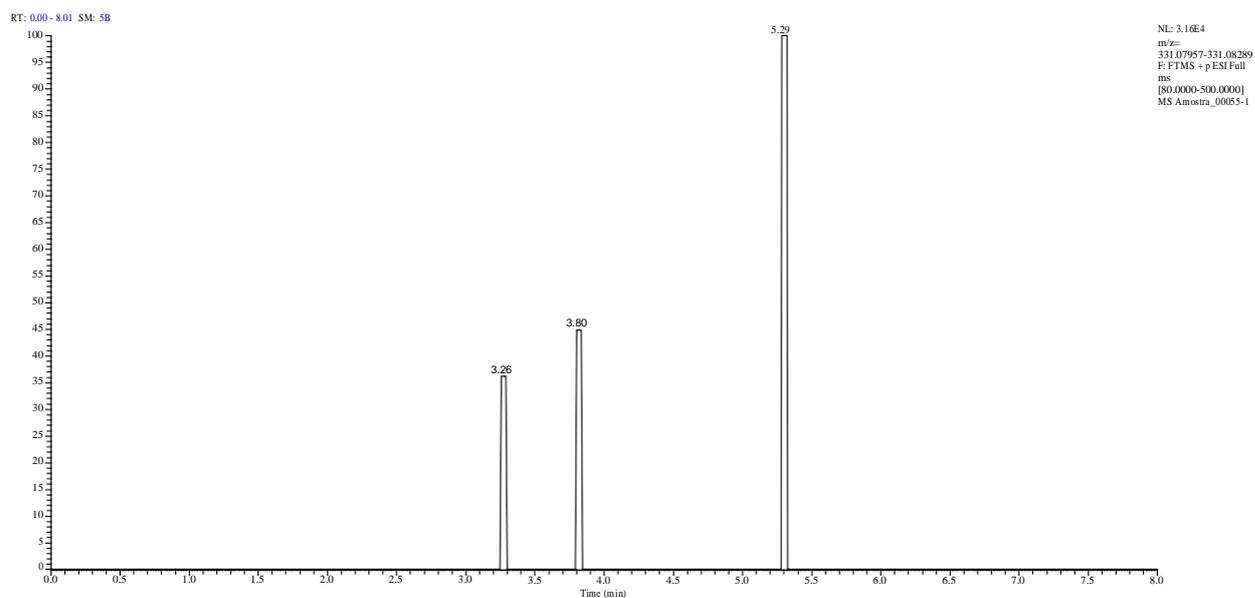
Extração: chromatograma da Aflatoxina G2



Espectro de massa

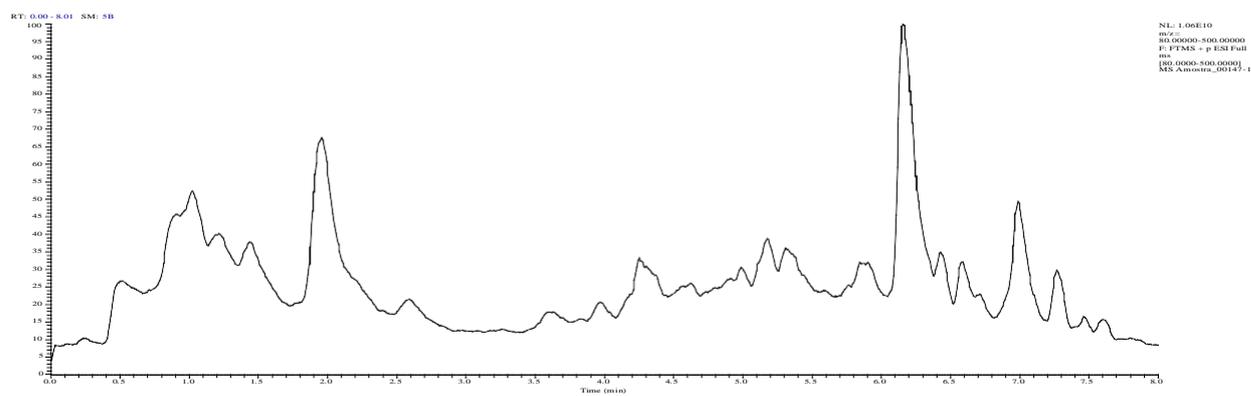


Com tempo de retenção

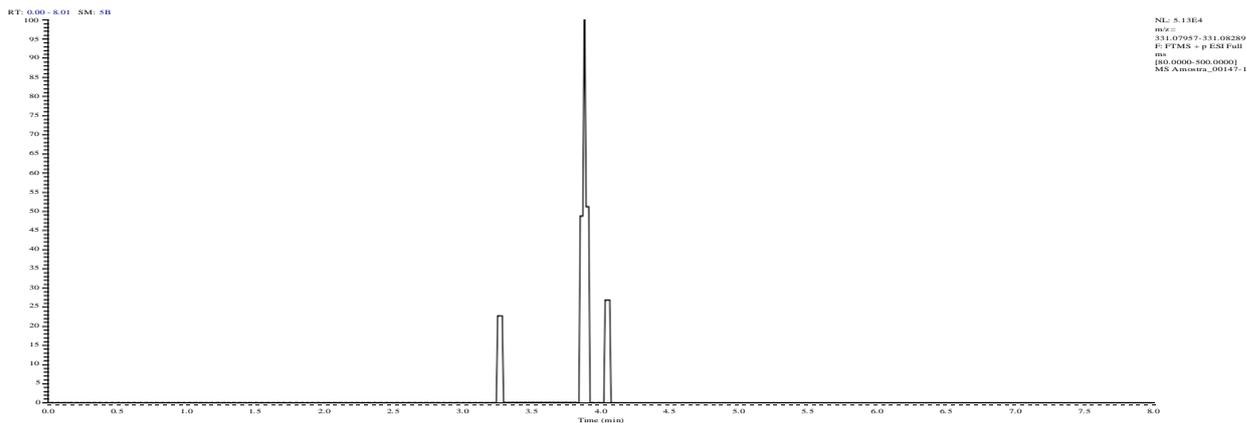


Amostra 147 - 1

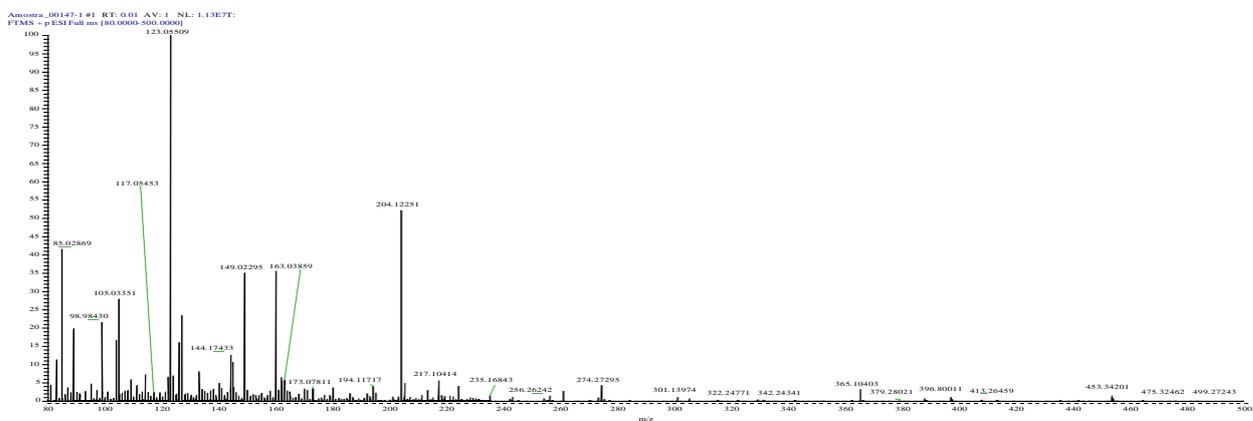
chromatograma da Aflatoxina G2



Extração: cromatograma da Aflatoxina G2

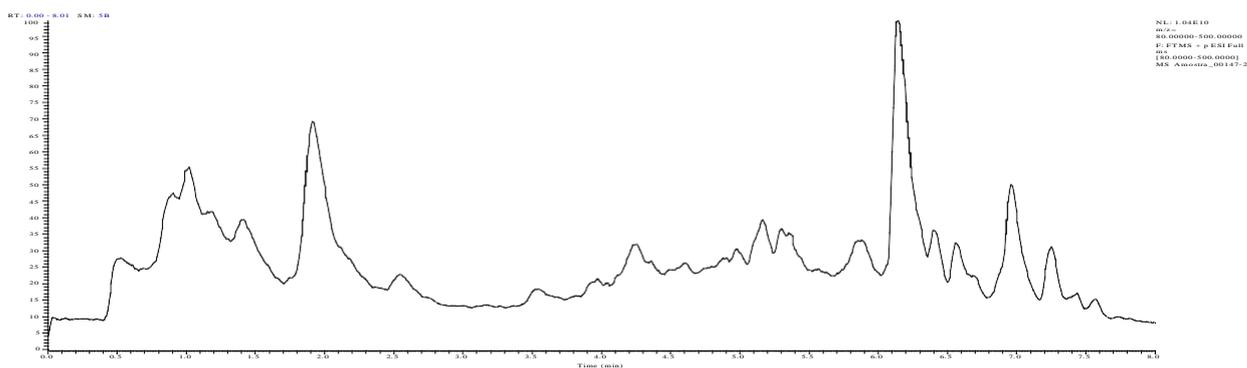


Espectro de massa

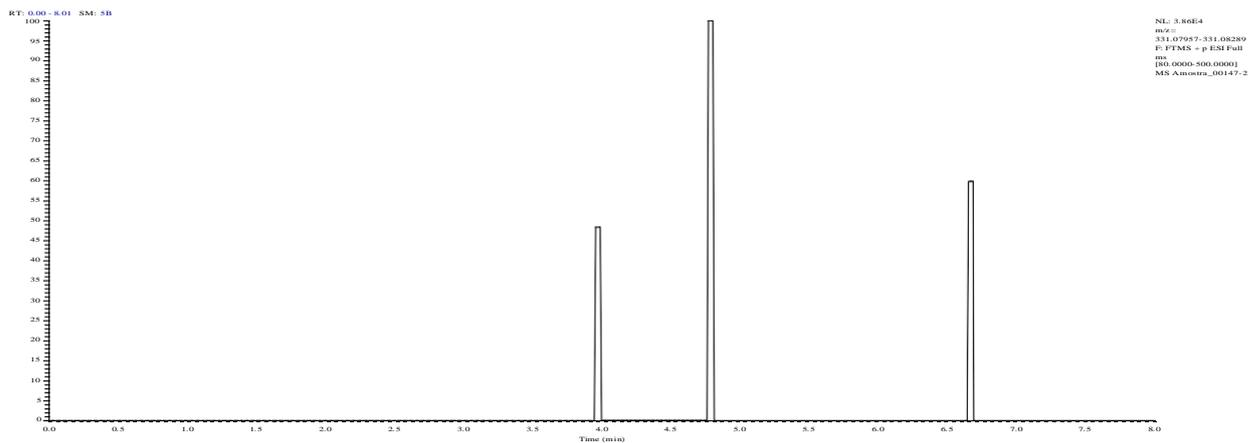


Amostra 147 - 2

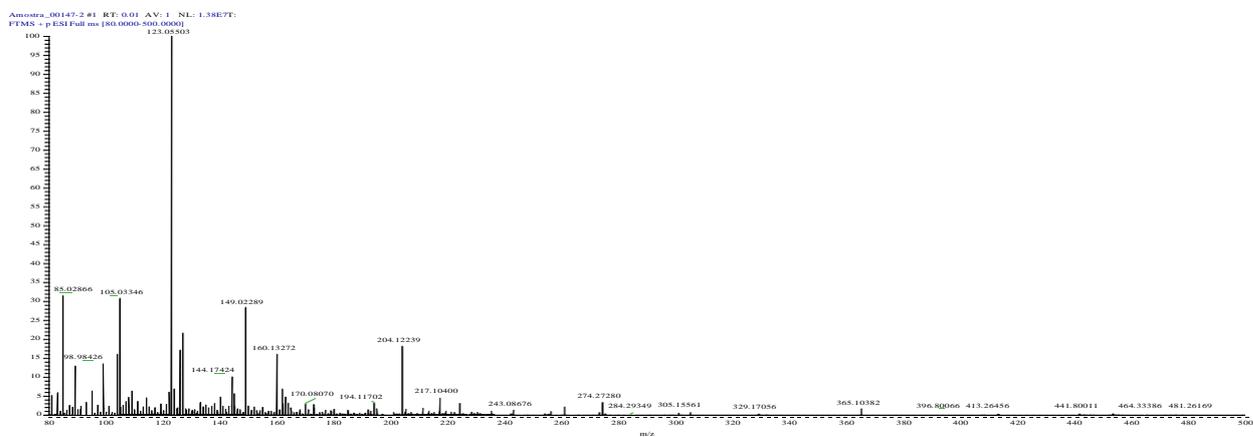
Aflatoxin G2 cromatograma



Extração: Aflatoxin G2 cromatograma

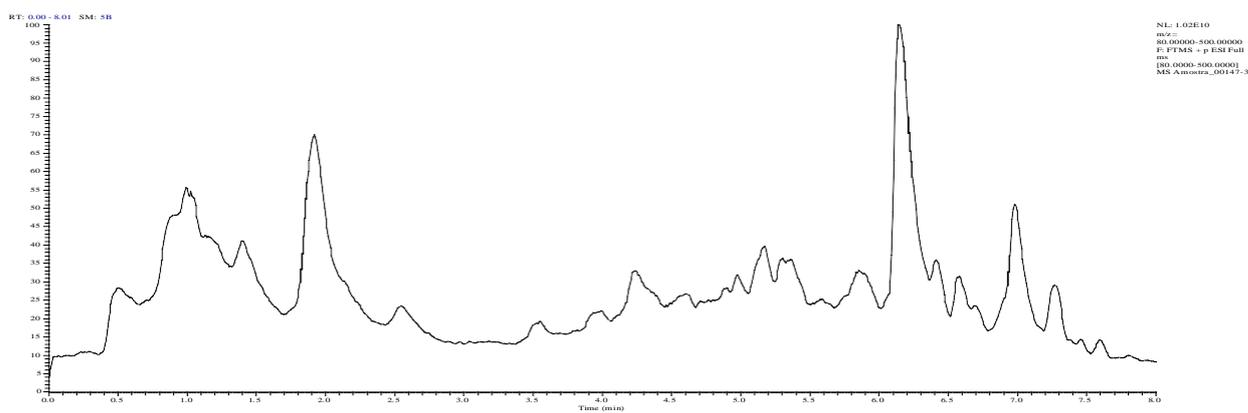


Espectro de massa

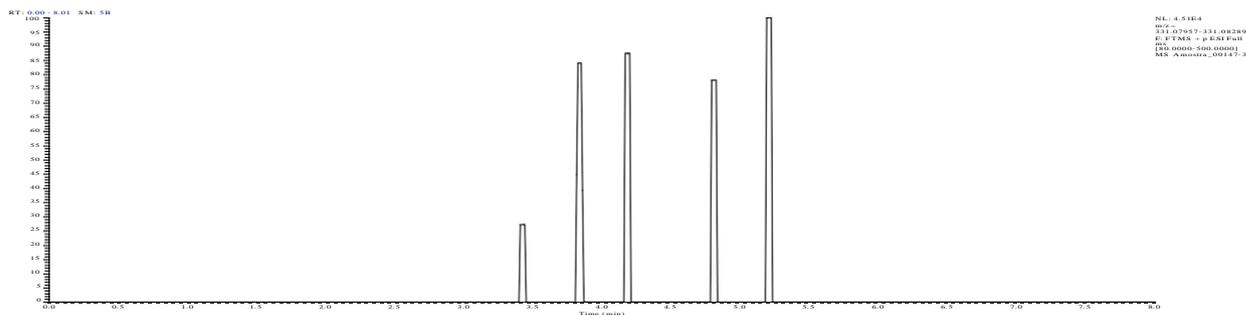


Amostra 147 - 3

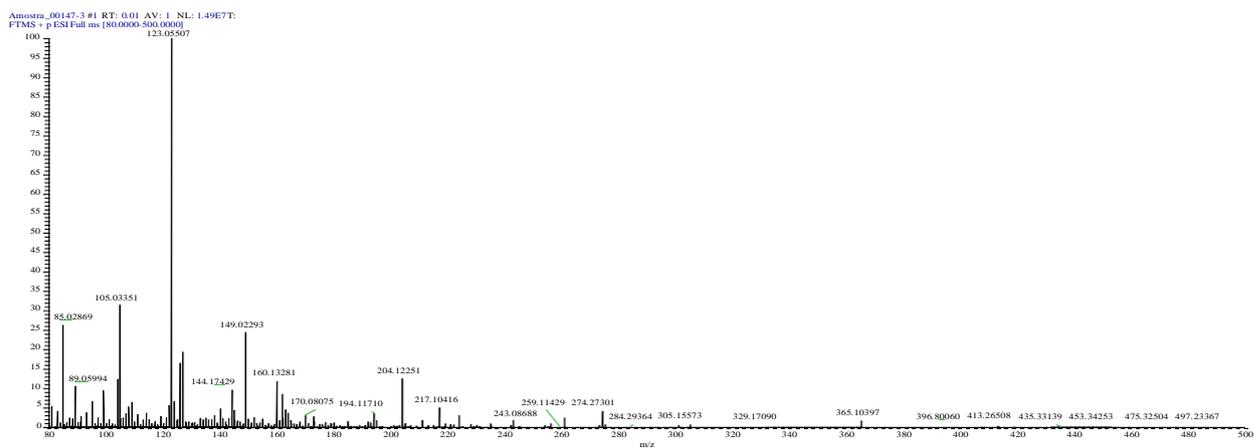
Aflatoxin G2 cromatograma



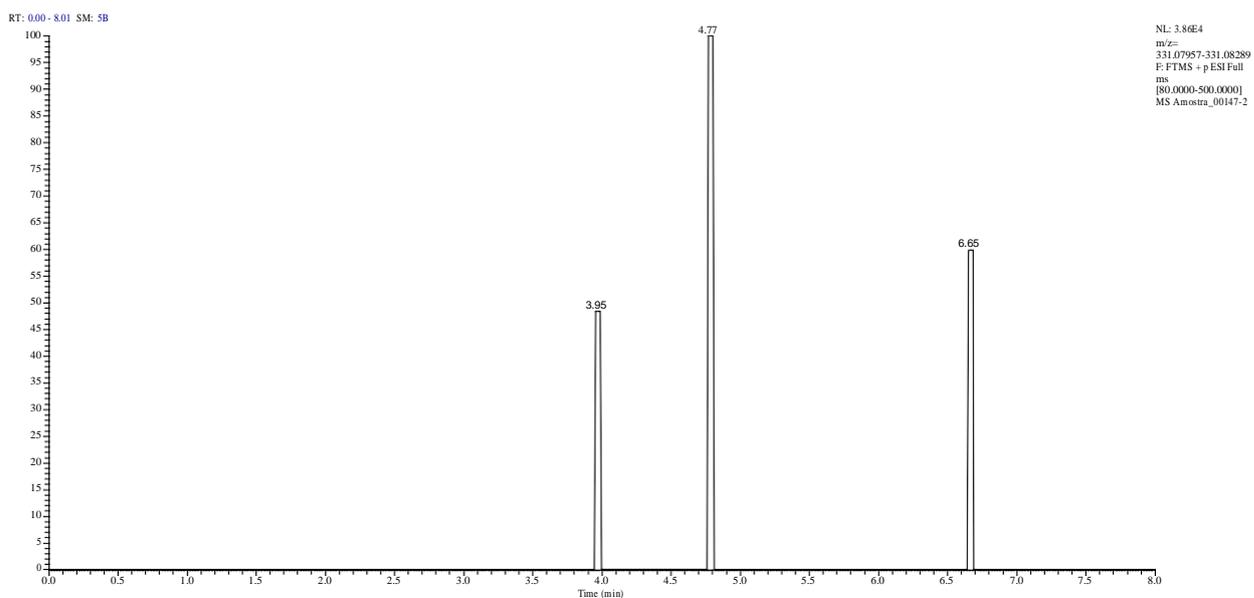
Extração: Aflatoxin G2 cromatograma



Espectro de massa

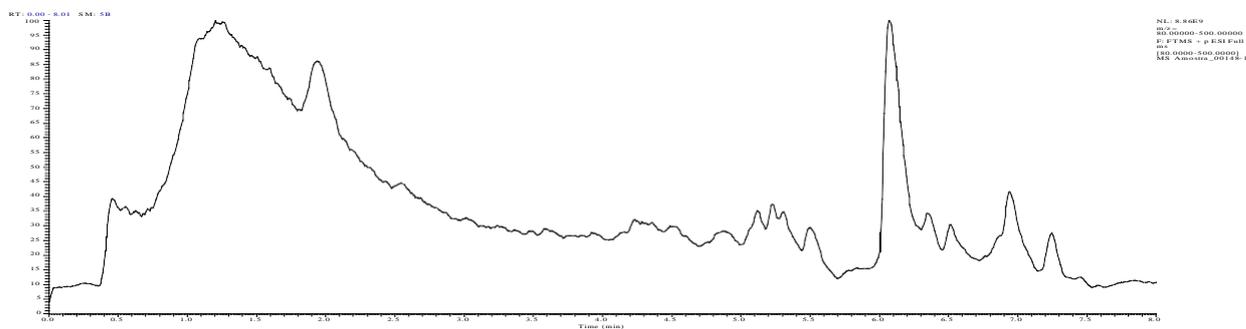


Com tempo de retenção

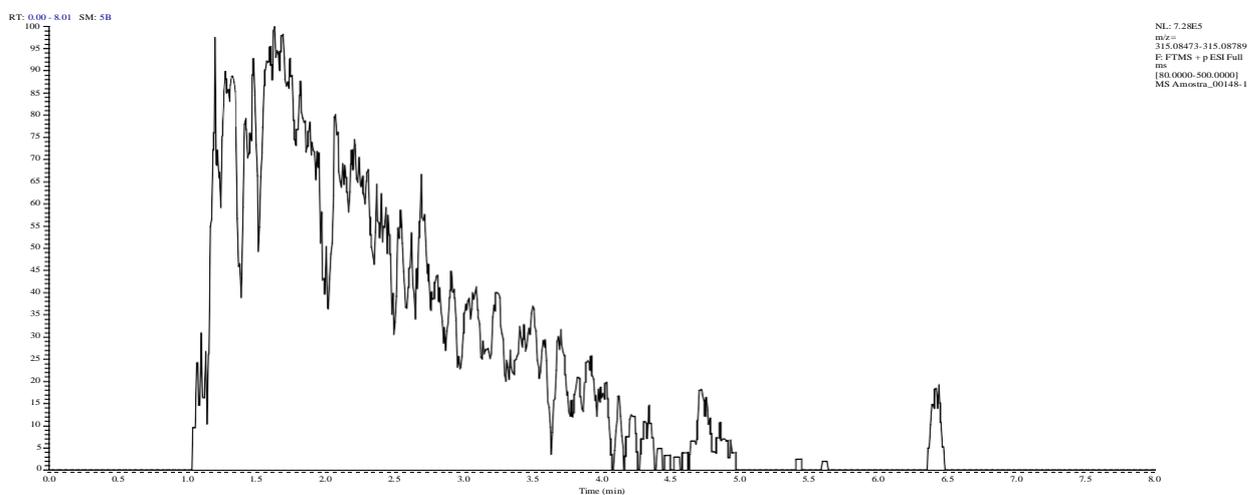


Amostra 148 - 1

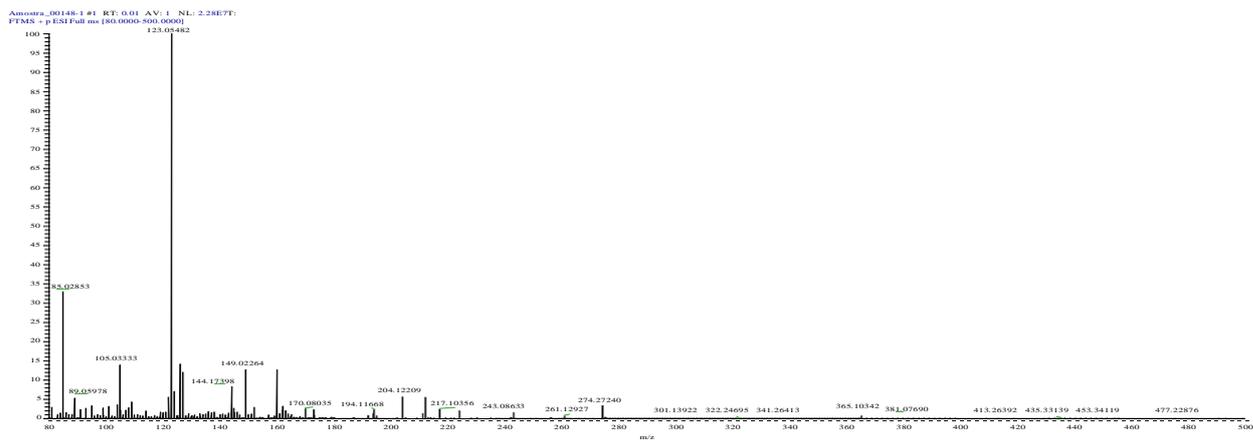
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

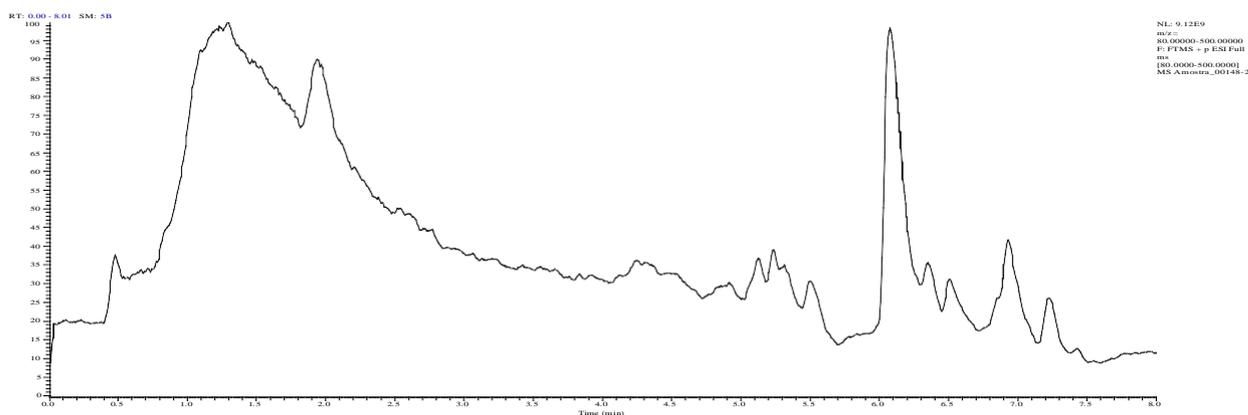


Espectro de massa

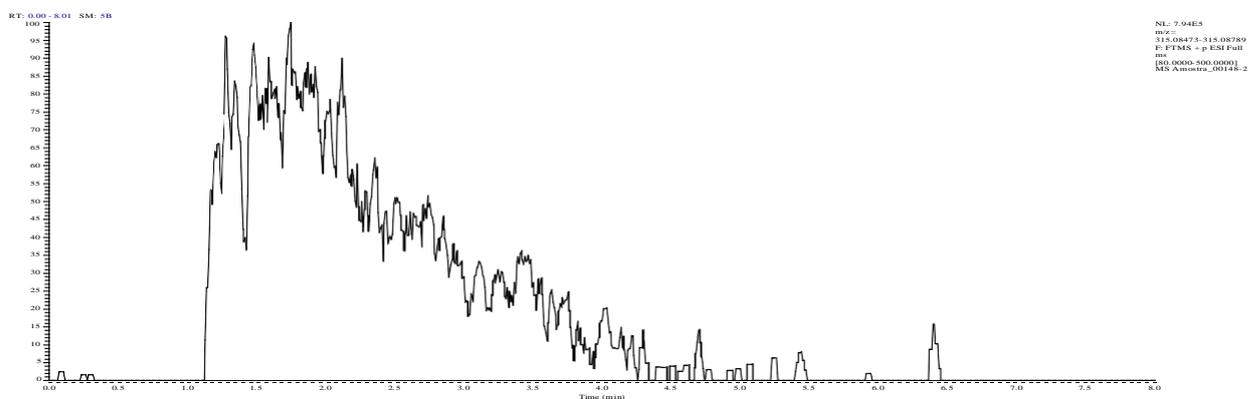


Amostra 148 – 2

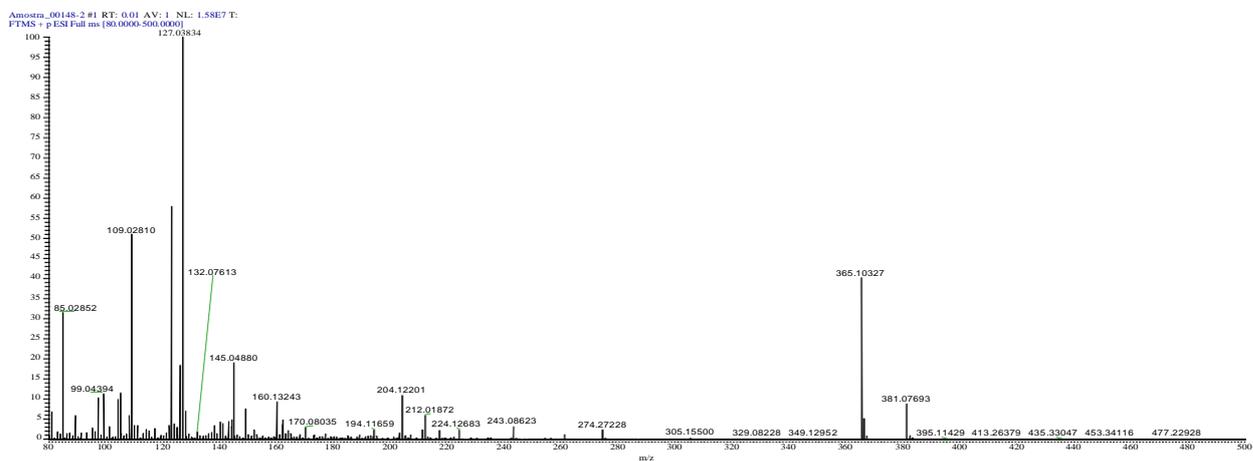
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

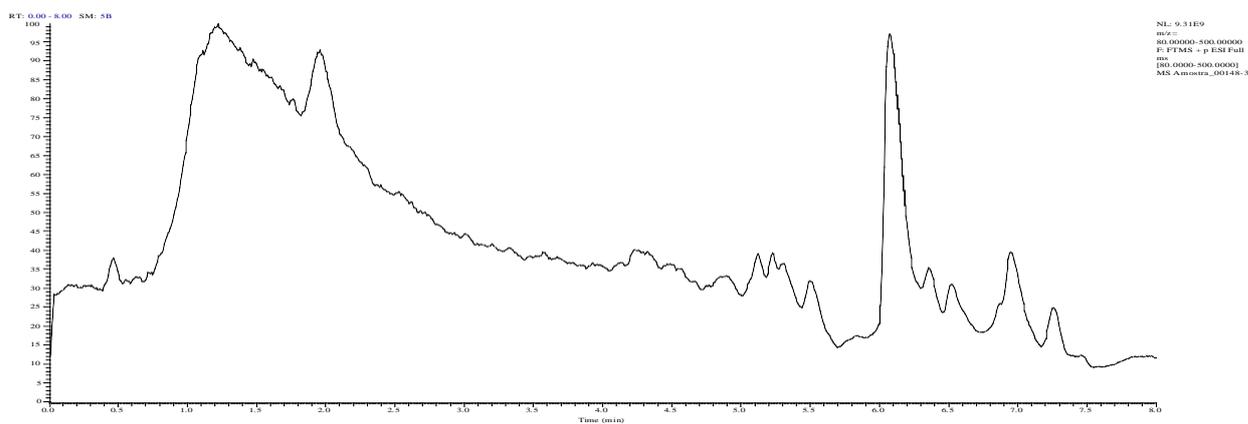


Espectro de massa

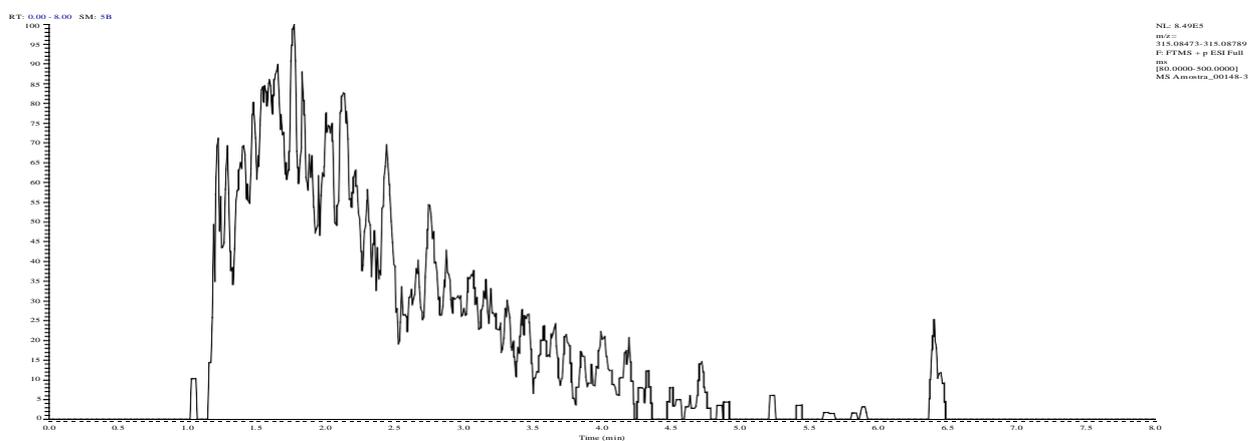


Amostra 148 – 3

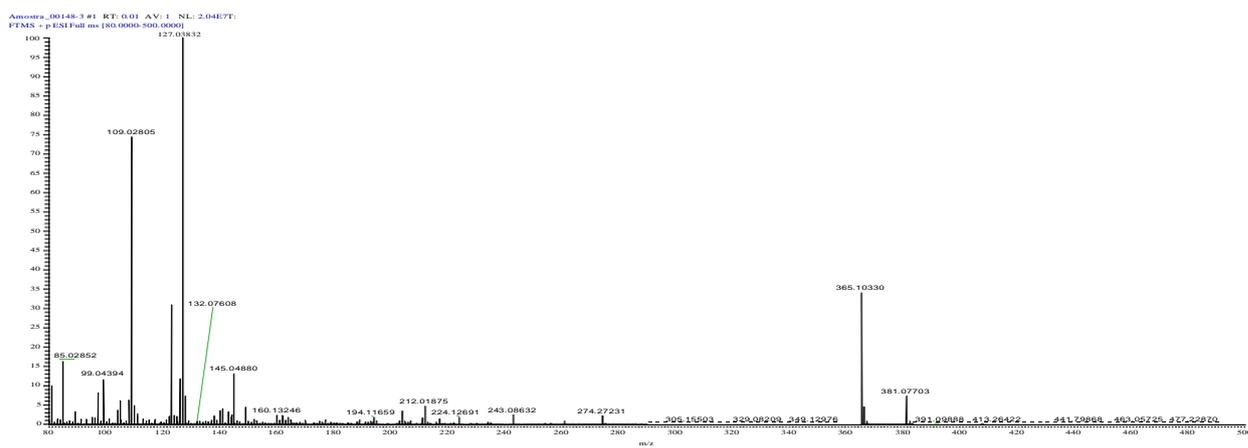
Aflatoxin B2 cromatograma



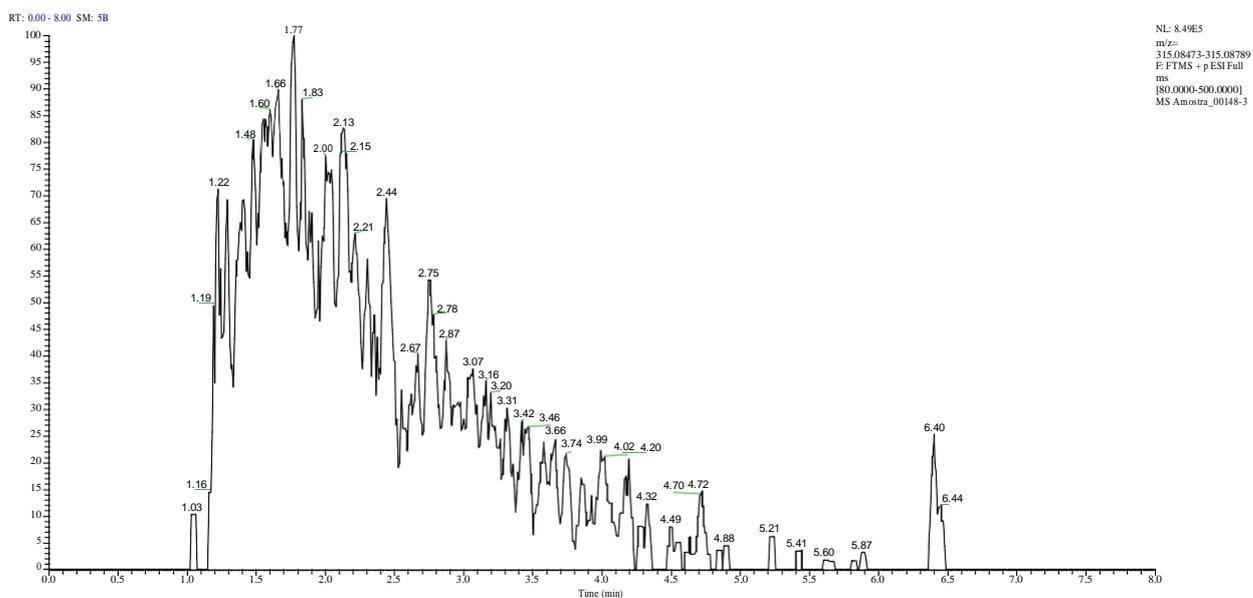
Extração: Aflatoxin B2 cromatograma



Espectro de massa

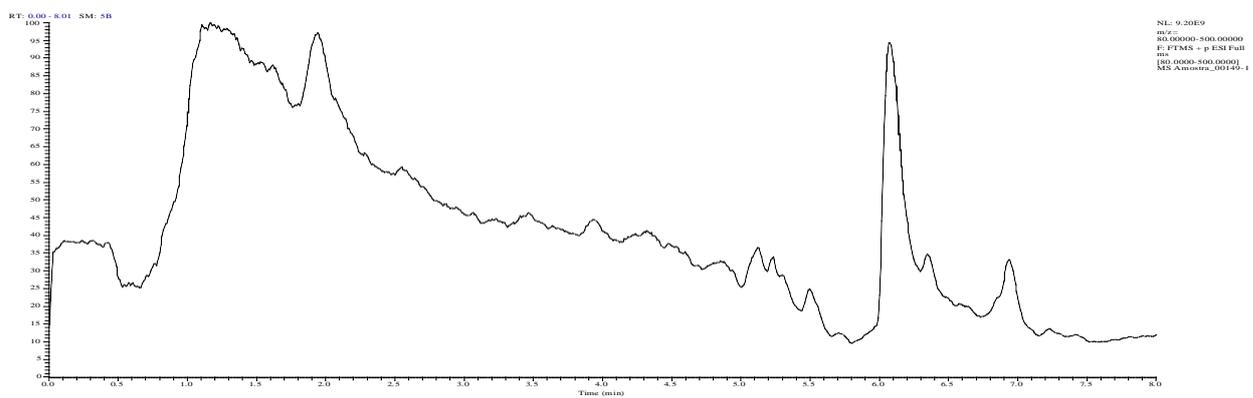


Com tempo de retenção

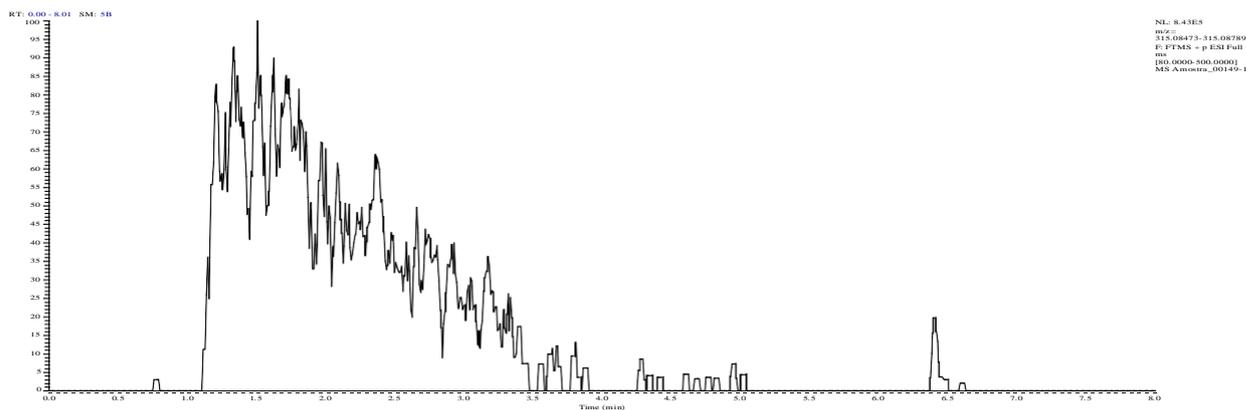


Amostra 149 - 1

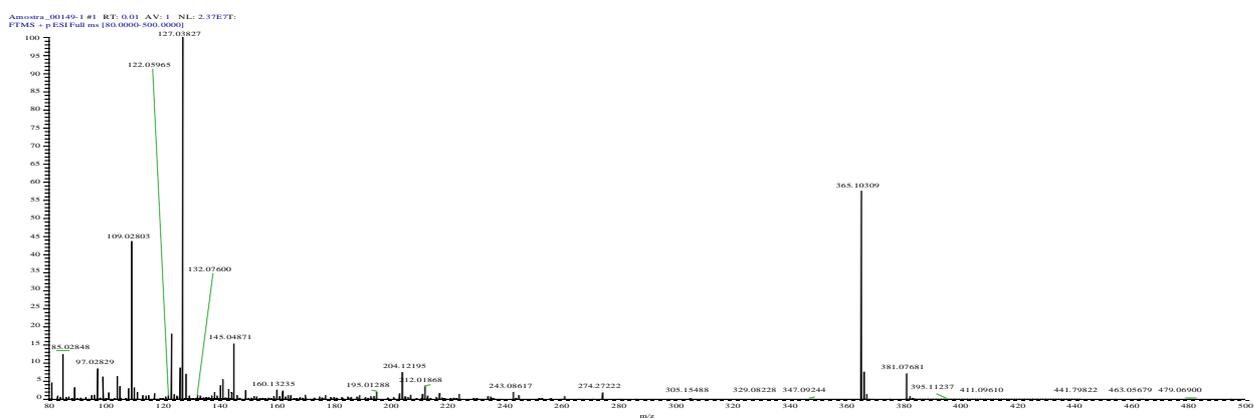
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

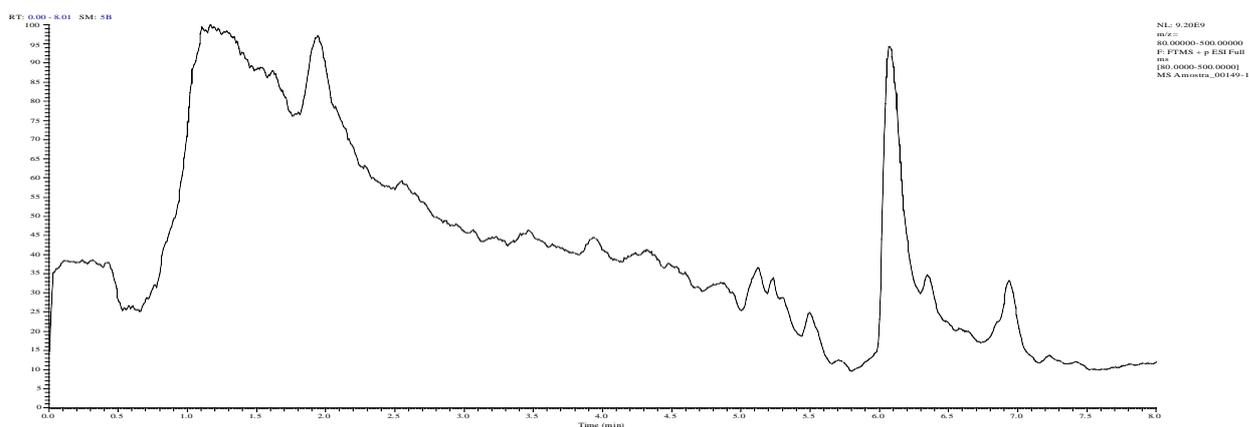


Espectro de massa

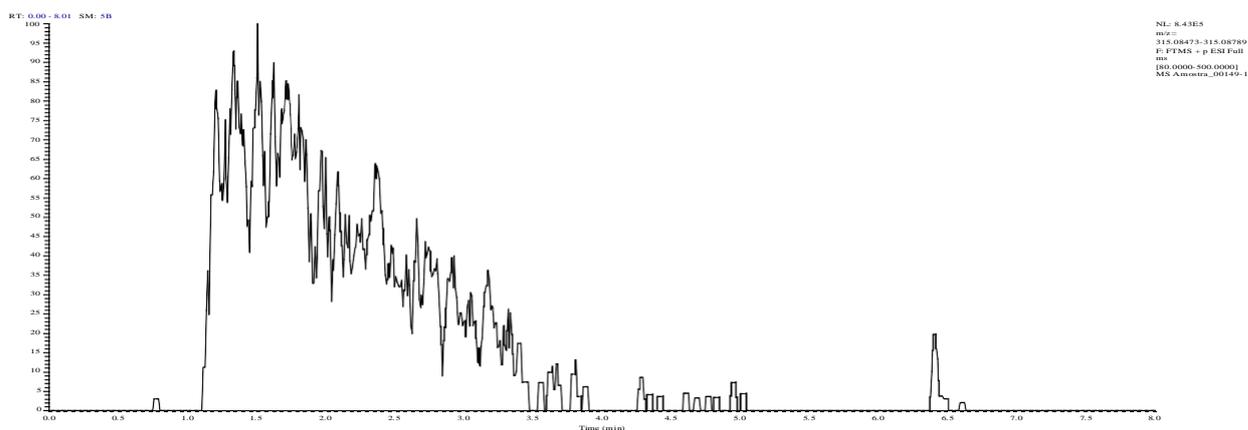


Amostra 149 - 2

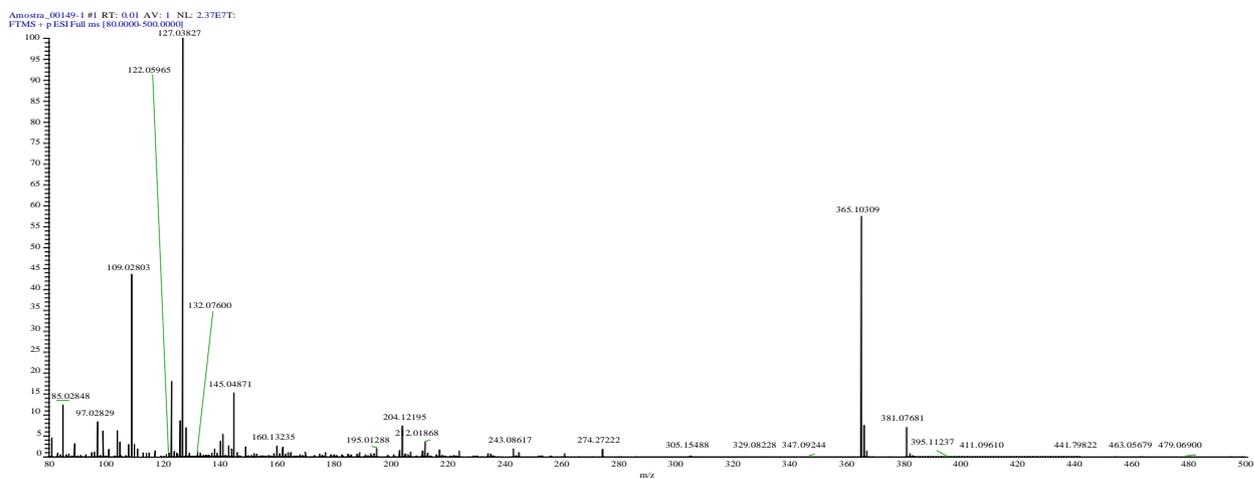
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

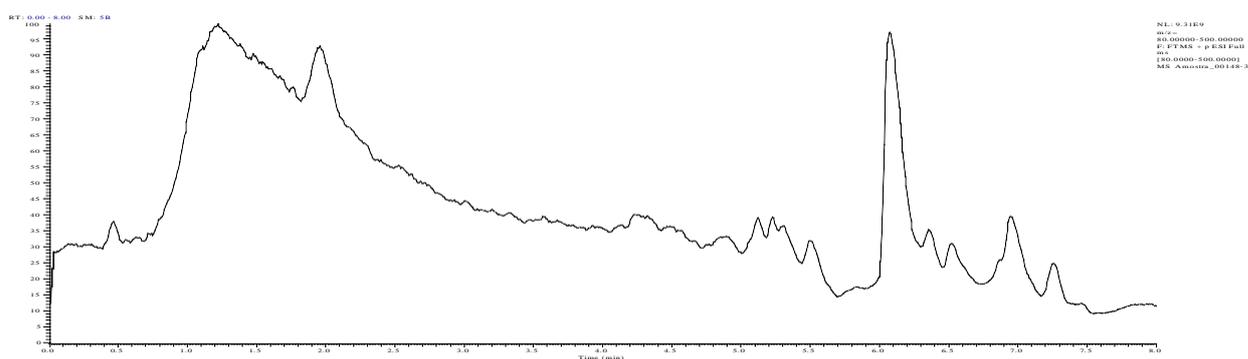


Espectro de massa

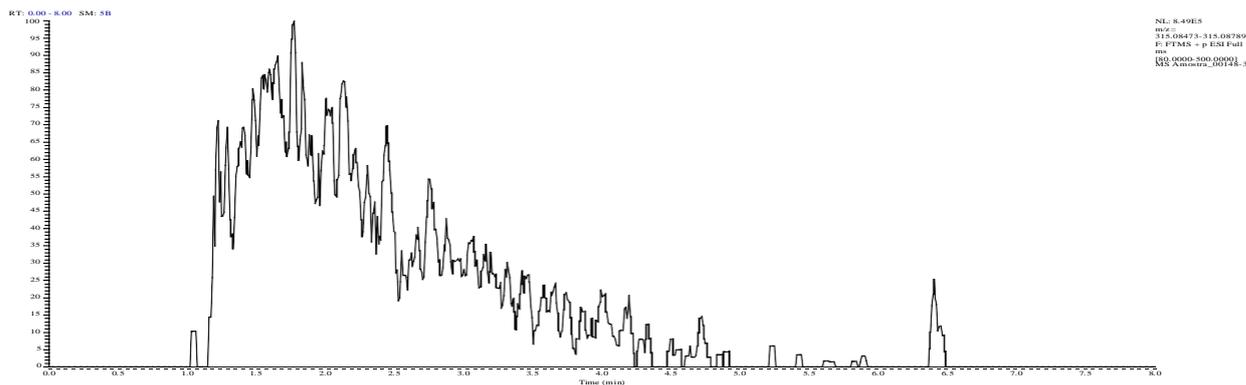


Amostra 149 - 3

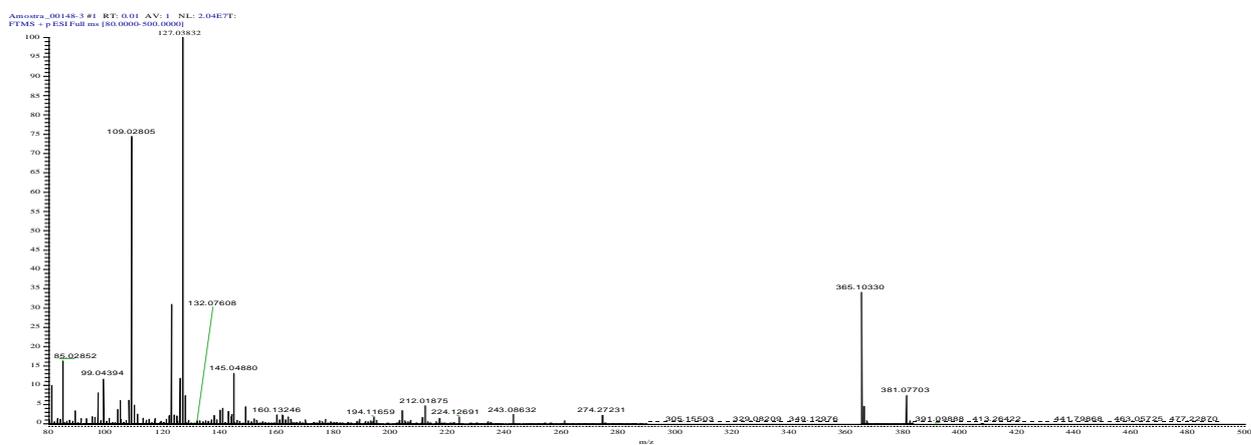
Aflatoxin B2 cromatograma



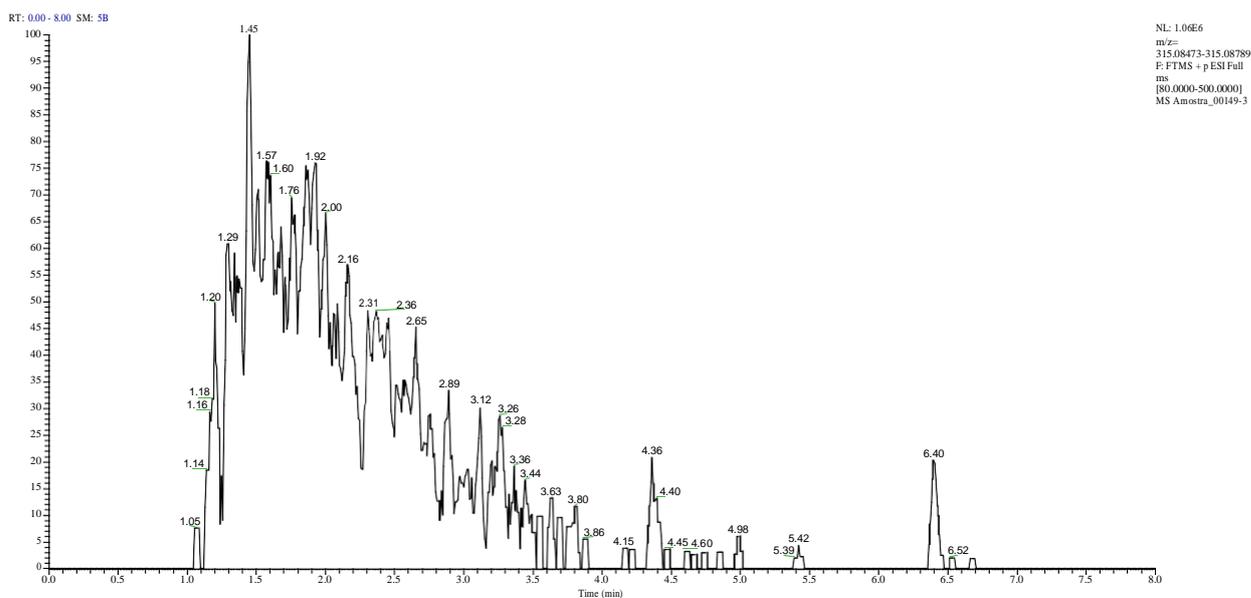
Extração: Aflatoxin B2 cromatograma



Espectro de massa

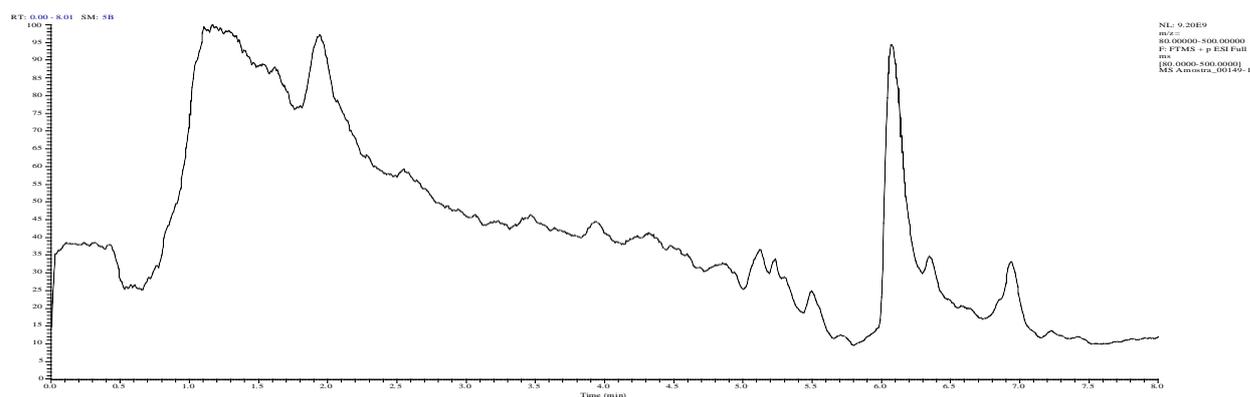


Com tempo de retenção

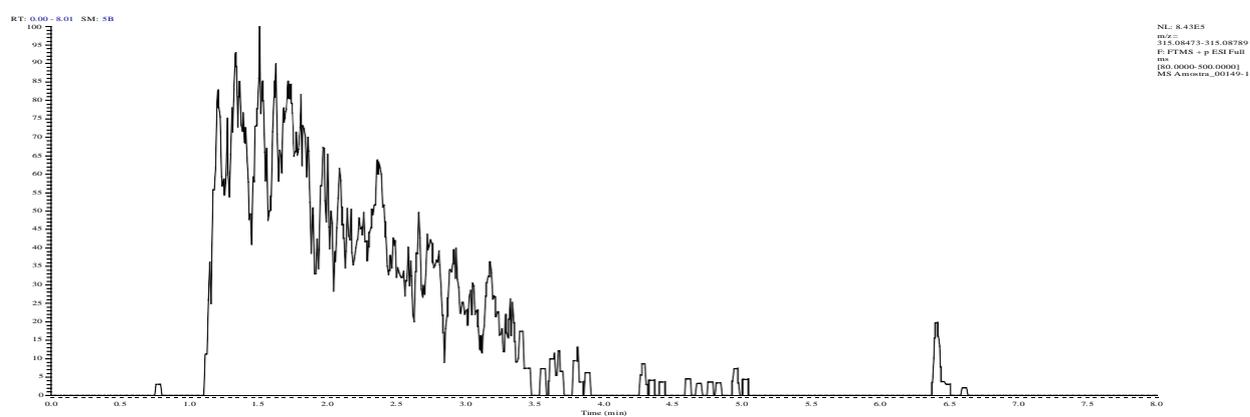


Amostra 149 – 1

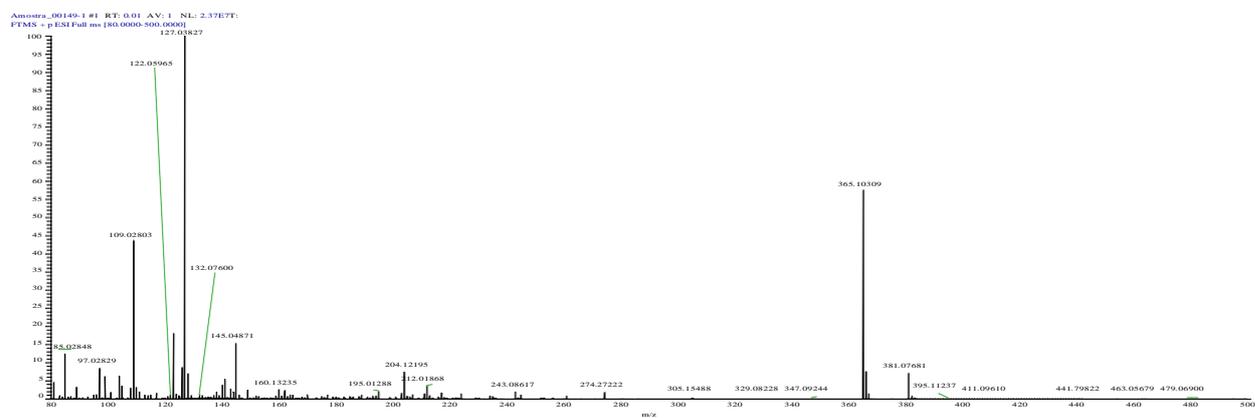
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

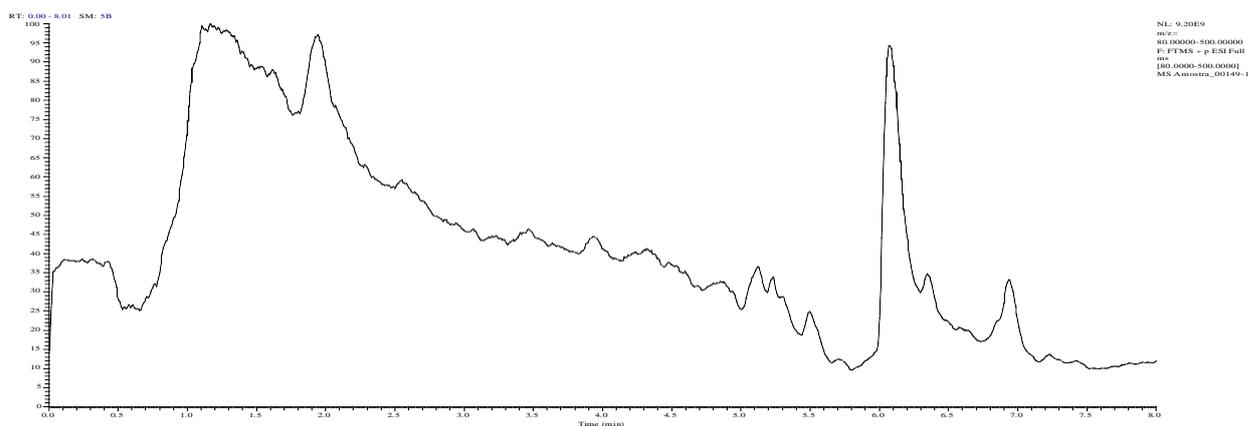


Espectro de massa

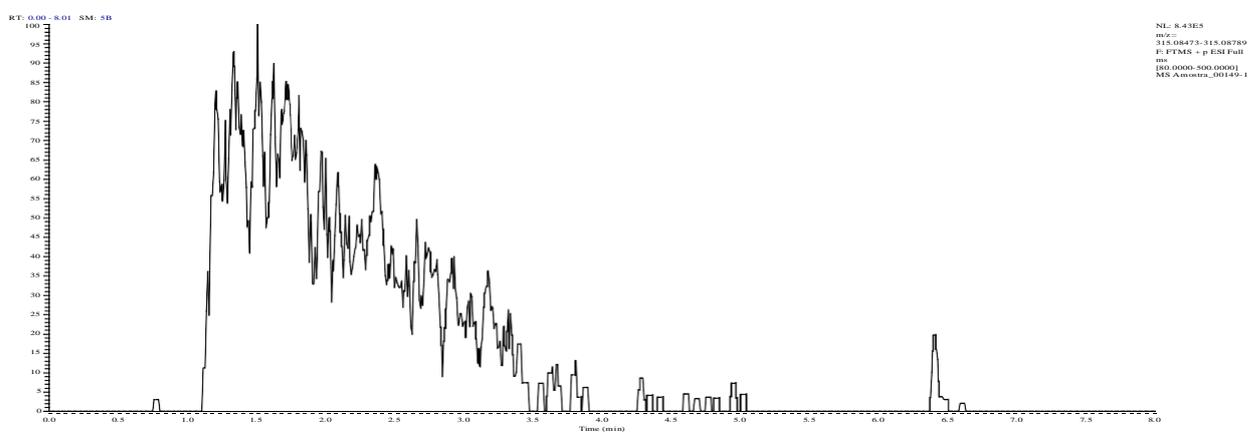


Amostra 149 – 2

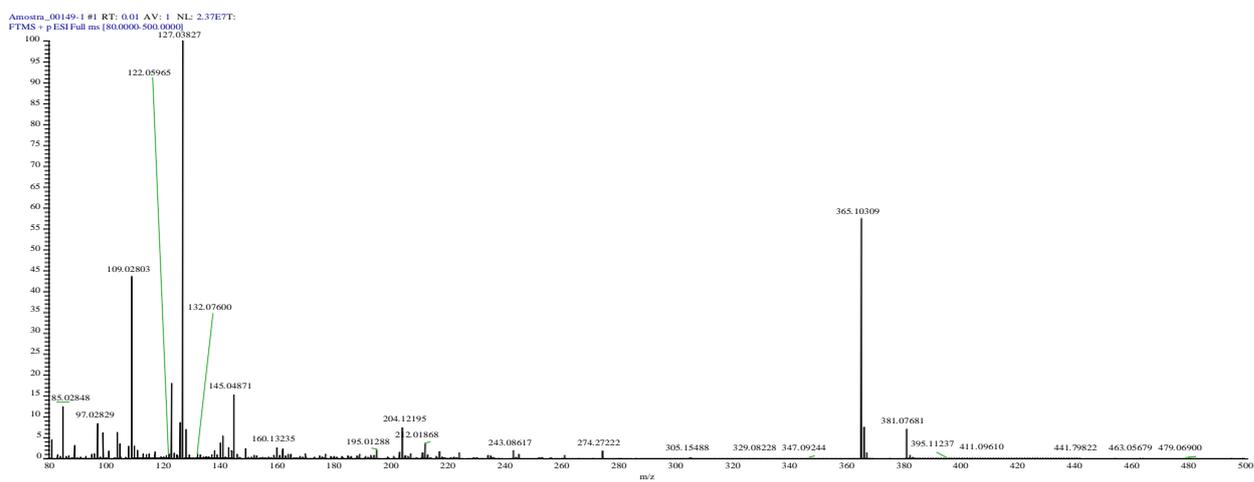
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

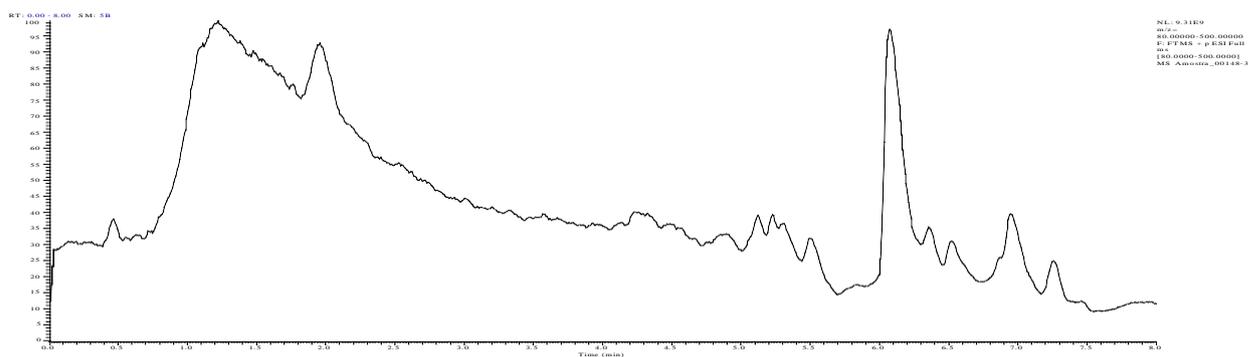


Espectro de massa

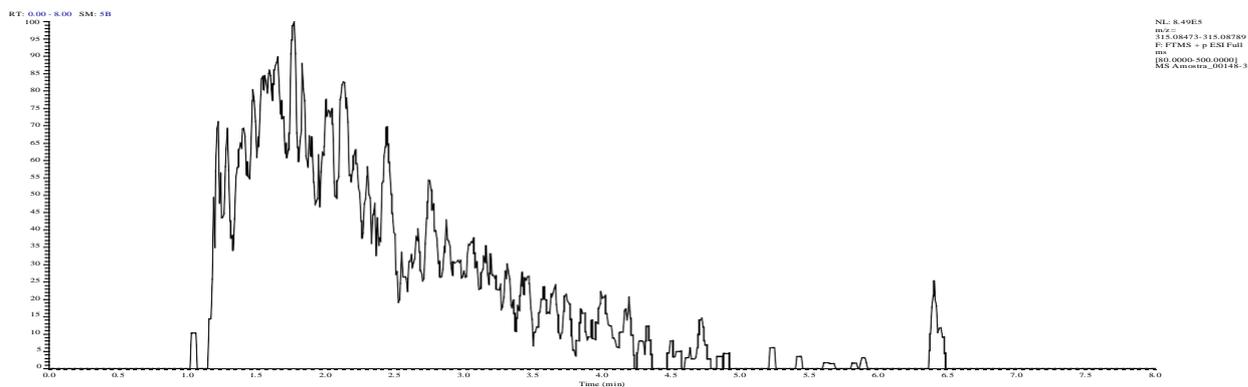


Amostra 149 – 3

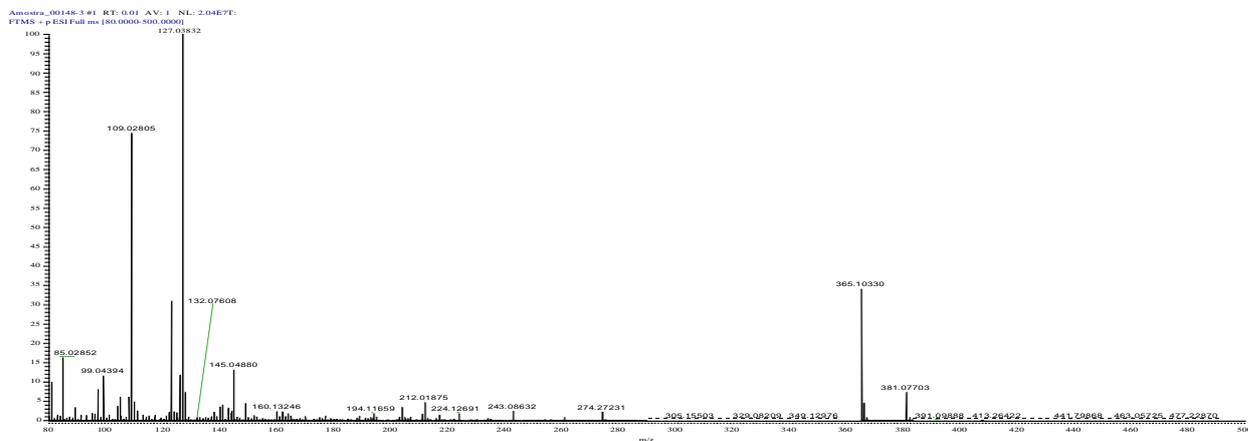
Aflatoxin B2 cromatograma



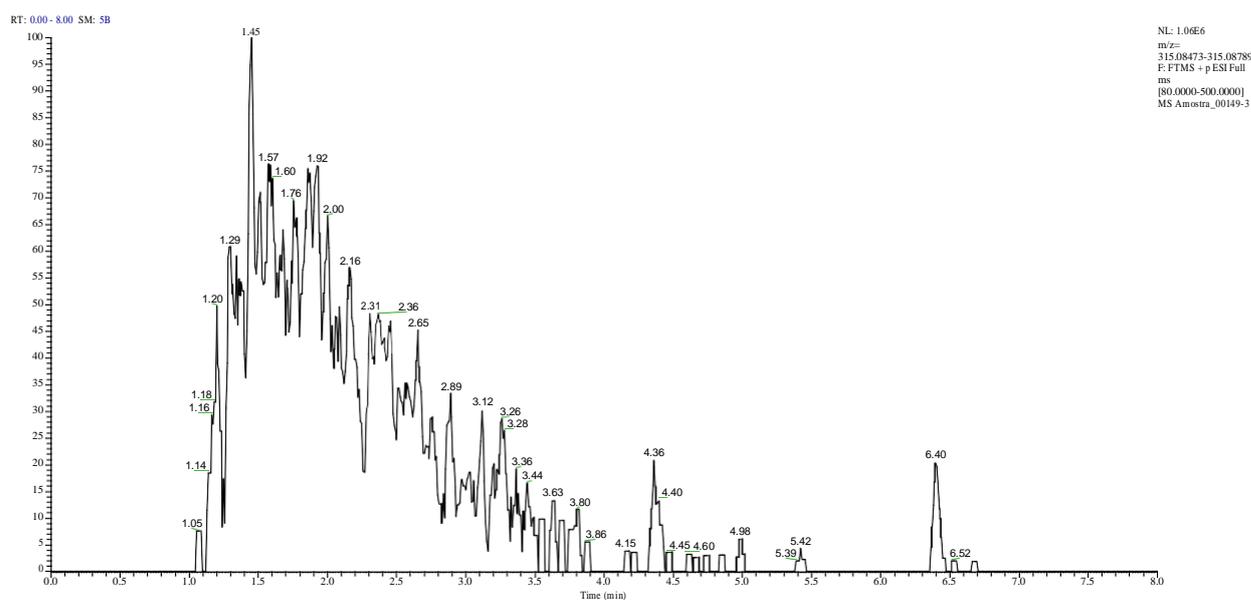
Extração: Aflatoxin B2 cromatograma



Espectro de massa

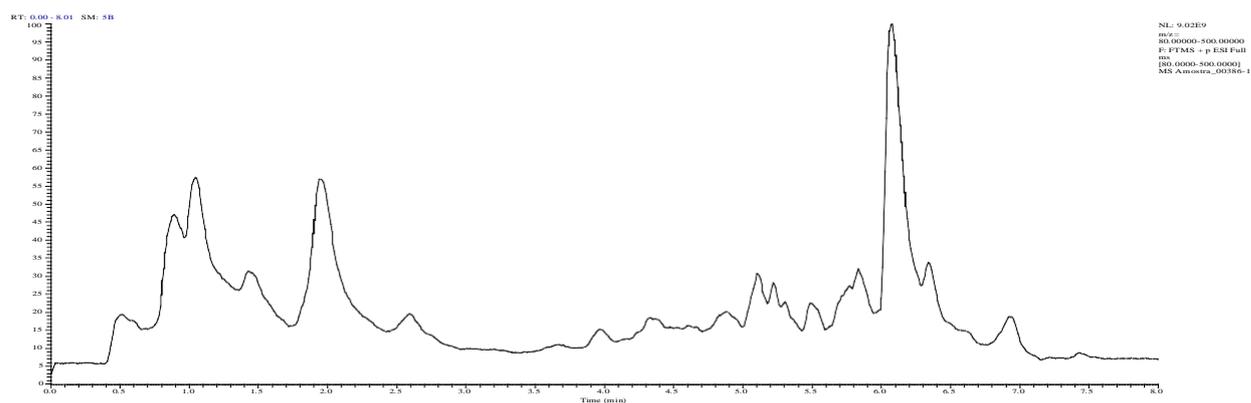


Com tempo de retenção

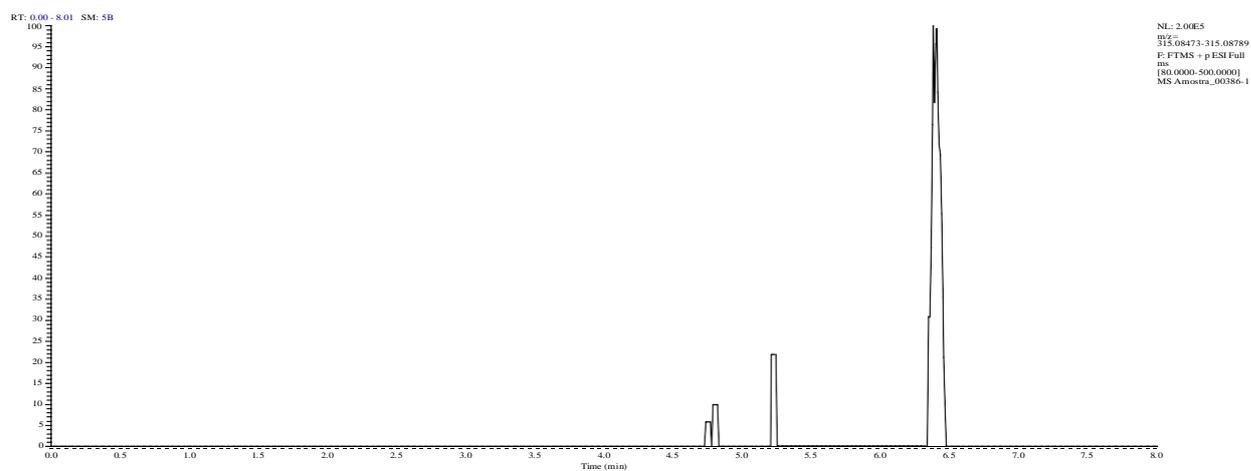


Amostra 386 - 1

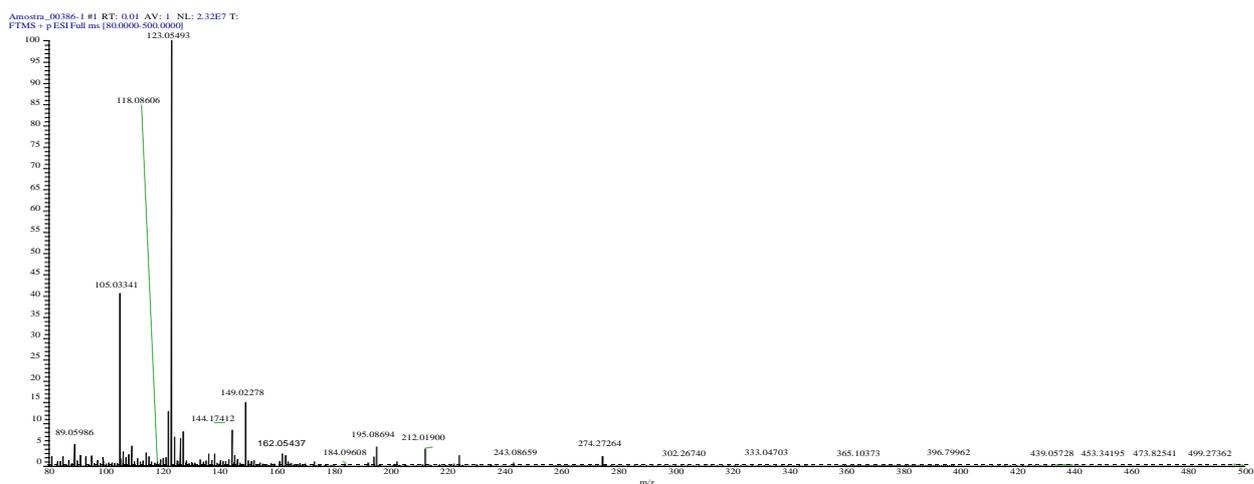
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

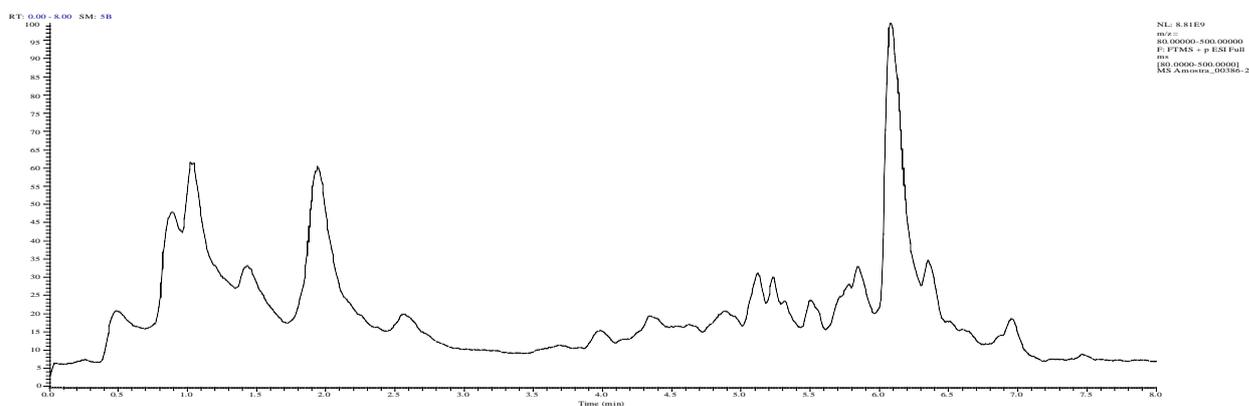


Espectro de massa

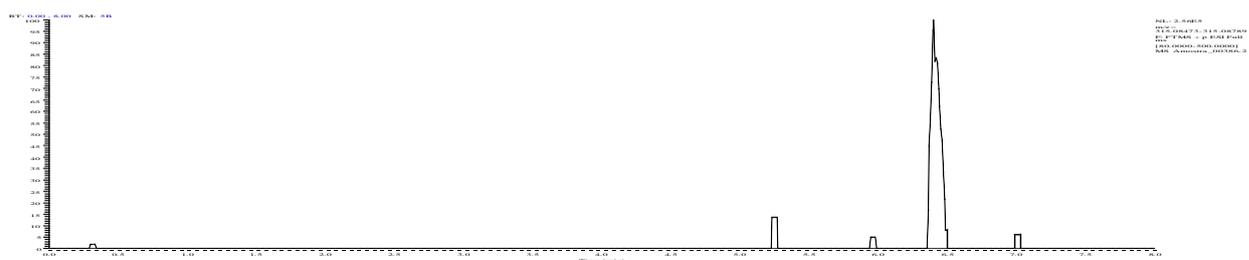


Amostra 386 - 2

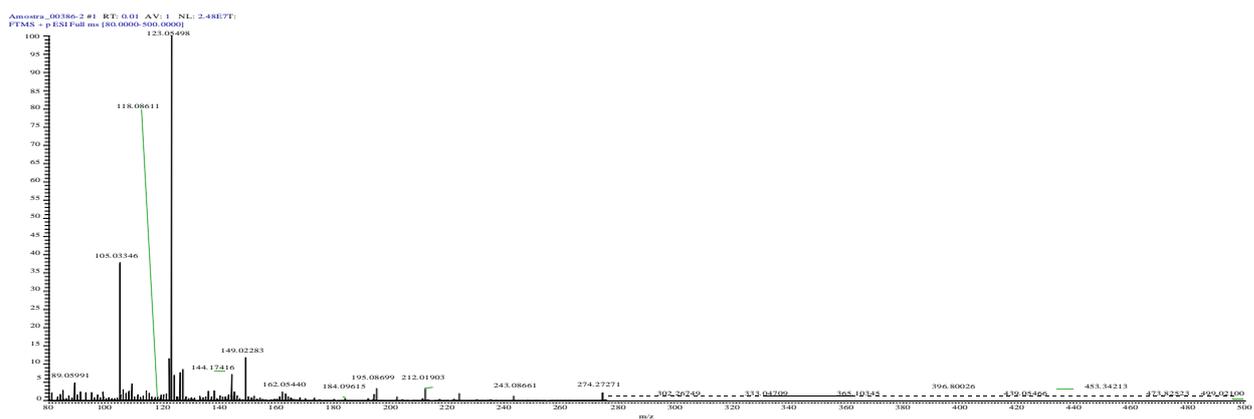
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

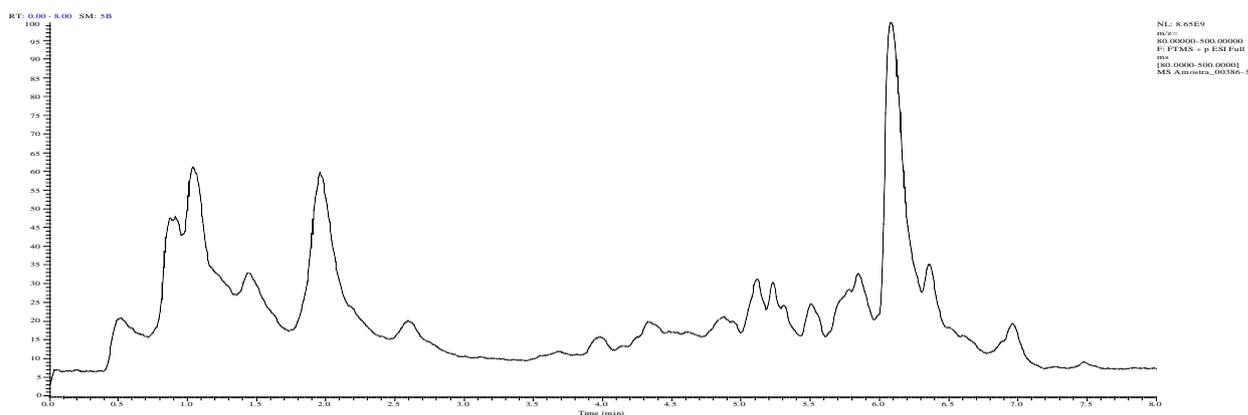


Espectro de massa

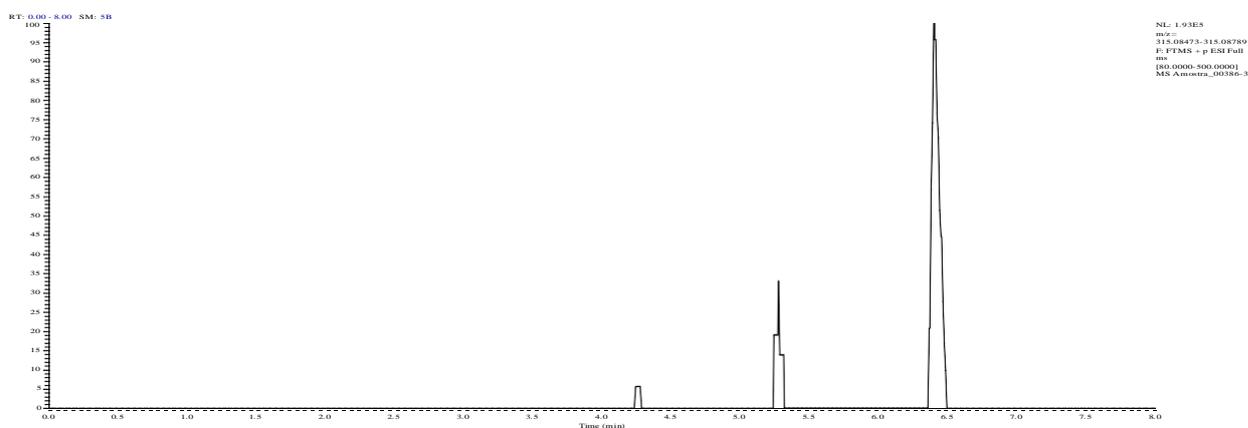


Amostra 386 – 3

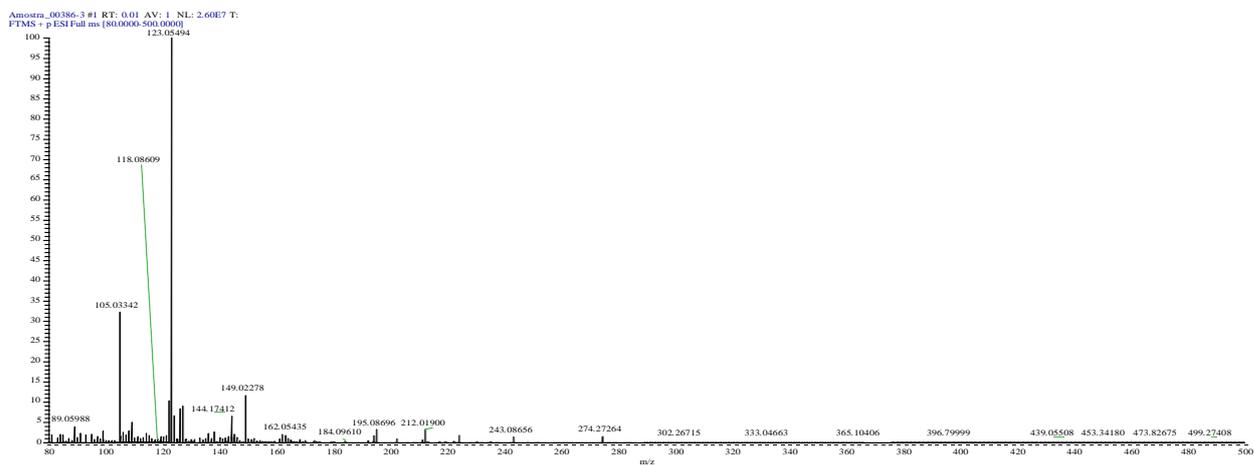
Aflatoxin B2 cromatograma



Extração: Aflatoxin B2 cromatograma

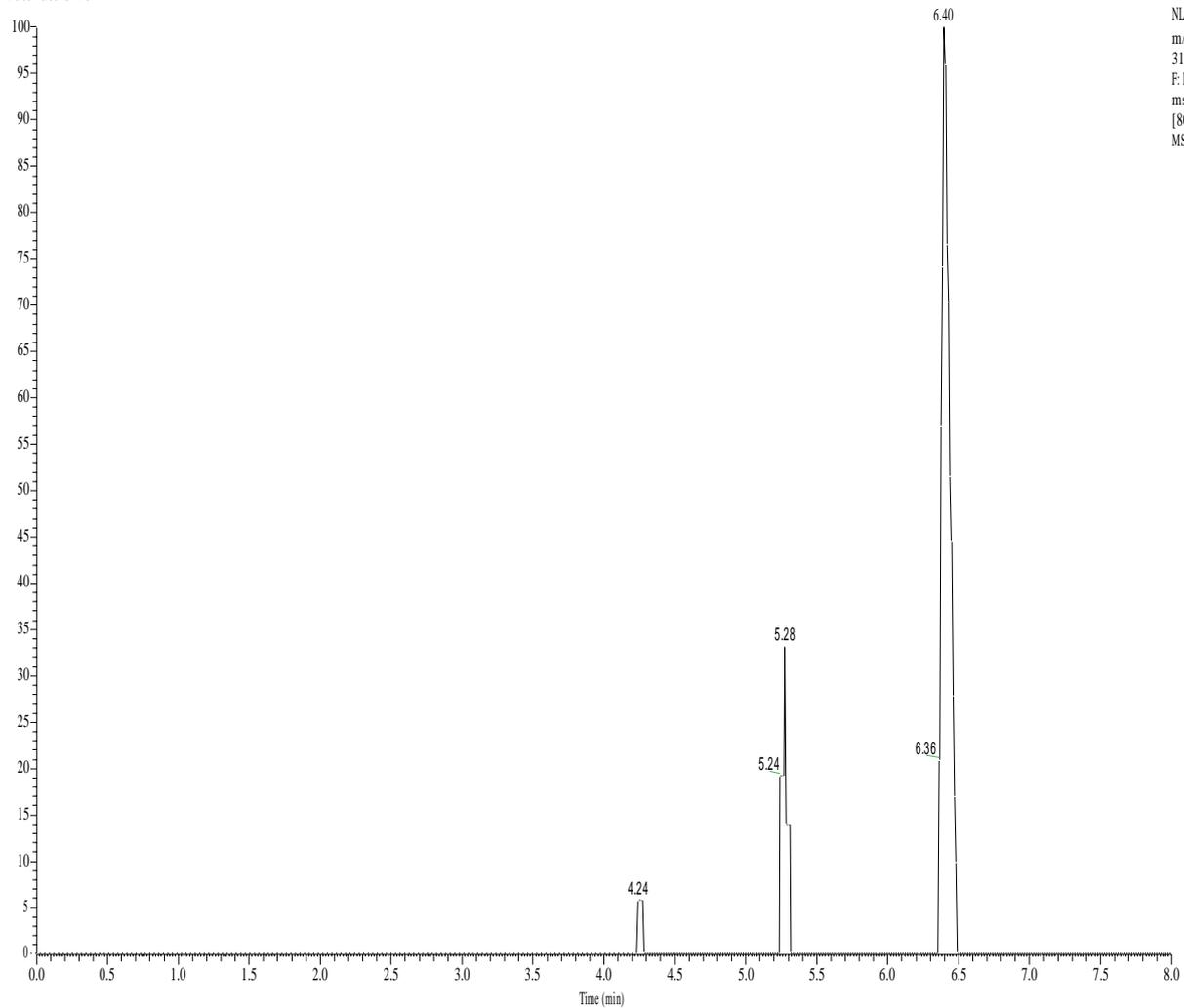


Espectro de massa



Com tempo de retenção

RT: 0.00 - 8.00 SM: 5B



NL: 1.93E5
m/z=
315.08473-315.08789
F: FTMS + p ESI Full
ms
[80.0000-500.0000]
MS Amostra_00386-3