

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

Leandro Rodrigues da Cunha

**MERCÚRIO EM LEITE DE MULHERES
RESIDENTES NO DISTRITO FEDERAL:
CONCENTRAÇÃO NOS PRIMEIROS 90 DIAS,
DIETA MATERNA E AVALIAÇÃO DA
EXPOSIÇÃO INFANTIL.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof. Eloisa Dutra Caldas

Co-orientadora: Teresa Helena Macedo da Costa

Brasília – Distrito Federal

2012

**MERCÚRIO EM LEITE DE MULHERES RESIDENTES EM
BRASILIA: CONCENTRAÇÃO NOS PRIMEIROS 90 DIAS,
DIETA MATERNA E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO
INFANTIL.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Prof^a. Dr^a Eloisa Dutra Caldas

Professora de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília

Presidente da banca

Prof. Dr José Garrofe Dórea

Professor do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Membro interno do programa.

Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

Professor do Instituto de Química da Universidade de Brasília

Membro externo ao programa.

Prof. Dr. Maurício Homem de Mello

Professor de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília

Membro suplente da banca examinadora.

À meus pais Antônio Carlos Rodrigues da Cunha e Marilene Moreira Rodrigues da Cunha (*in memoriam*) pelo amor incondicional em todos os momentos de minha vida. Obrigado por ser meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por iluminar meu caminho.

À meus irmãos André Rodrigues da Cunha e Pablo Rodrigues da Cunha e familiares por estarem sempre presentes me dando apoio e carinho.

À minha orientadora Eloisa Dutra Caldas pela oportunidade de executar esse projeto além sua dedicação, paciência e sobretudo, exigência pela busca do melhor caminho.

À minha co-orientadora Teresa Helena Macedo da Costa pelo seu tempo, esforço e pelas sábias sugestões no decorrer de todo o trabalho.

Ao professor Jurandir Rodrigues de Souza, do Departamento de Química, pelo suporte nas análises em seu laboratório.

Ao professor José Garrofe Dórea pela assistência na revisão final do trabalho e pela oportunidade de inserção na vida científica.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica e Ambiental da Universidade de Brasília pelo apoio prestado na análise das amostras.

À aluna de Iniciação Científica Camila São Bernardo, pelo suporte na análise dos dados de consumo alimentar..

Aos bancos de leite do Distrito Federal pela colaboração na captação de amostras

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo provimento da bolsa de estudos.

Aos meus colegas, em especial aos amigos do curso de Nutrição pelos momentos de descontração tão necessários nessa caminhada.

Agradeço especialmente à Kelly Lamounier Clausen pela convivência, companheirismo e paciência, sobretudo pelo suporte emocional. Minha companheira nos momentos de alegria e dificuldades. Muito obrigado por acreditar em meu potencial e nunca me deixar abater pelos obstáculos da vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1. INTRODUÇÃO.....	03
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1 Mercúrio e Meio Ambiente.....	05
2.2 Mercúrio em alimentos.....	08
2.3 Mercúrio em leite humano.....	10
2.4. Exposição humana a mercúrio e toxicologia.....	12
2.5 Análise de mercúrio em leite humano.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Amostras de leite humano.....	22
4.1.1 Amostras de leite materno do Grupo 1.....	22
4.1.2 Amostras de leite materno do Grupo 2.....	23
4.2 Análise de mercúrio total em leite humano.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Otimização da metodologia para análise de mercúrio total em leite humano.....	25
5.1.1 Digestão de amostras.....	25
5.2 Validação da metodologia para análise de mercúrio total em leite humano.....	27
5.2.1 Efeito matriz.....	27

5.2.2 Limites de detecção e quantificação.....	28
5.2.3 Exatidão e Repetitividade.....	29
5.3. Mercury concentration in breast milk during the first 90 days of lactation in central west region of Brazil	30
Abstract.....	31
Introduction.....	32
Material and Methods.....	33
Study population.....	33
Mercury analysis.....	34
Food Intake.....	35
Statistical analysis.....	35
Results.....	36
Discussion.....	39
Conclusion.....	41
Acknowledgements.....	42
References.....	43
5.4 Mercúrio total em leite humano de doadoras de bancos de leite do Distrito Federal.....	48
5. CONCLUSÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FS AO PROJETO COM AMOSTRAS DE LEITE DE NUTRIZES DO DF – GRUPO 1.....	68
APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	69
APÊNDICE 3 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FS AO PROJETO COM AMOSTRAS DE BANCO DE LEITES DO DF – GRUPO 2.....	71
APÊNDICE 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (AMOSTRAS DOS BANCOS DE LEITE).....	72
ANEXO 1 -RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AMOSTRAS DE LEITE HUMANO DOS BANCOS DE LEITE DO DISTRITO FEDERAL.....	73

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Concentrações de mercúrio em leite humano encontrados ao redor do mundo.....	12
Tabela 2 - Análise do material de referência certificado.....	20
Tabela 3 - Característica da população de amostras provenientes de bancos de leite do Distrito Federal.....	44
Tabela 4 – Concentração média de mercúrio em leite humano separado por regiões administrativas dos bancos de leite no Distrito Federal.....	45
Tabela 5 - Correlação entre características maternas e peso do bebê e concentração de mercúrio.....	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de deposição de mercúrio (US-EPA, 2004).....	06
Figura 2. Regiões administrativas do Distrito Federal onde foram coletadas as amostras de leite humano (n=100).....	16
Figura 3. Amostras digeridas com diferentes volumes de reagentes.....	17
Figura 4. Amostra de leite humano digerido com diferentes volumes de ácido nítrico 65% suprapuro.....	18
Figura 5. Curva de calibração em leite humano e água para avaliação do efeito matriz.....	19
Figura 6. Distribuição dos níveis de THg nas 100 amostras de leite dos bancos de leite do Distrito Federal.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFS – *Atomic Fluorescence Spectrometry*

CVAFS – *Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry*

DF – Distrito Federal

DHA - Ácido docosaexanóico

EPA - Ácido eicosapentaenoico

FFQ – *Food Frequency Questionnaire*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

Hg⁺⁺ - Mercúrio inorgânico

Hg⁰ – Mercúrio metálico

HNO₃ – Ácido Nítrico

IMC – Índice de Massa Corporal

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e

Tecnologia

IOM – *Institute of Medicine*

JECFA – *Joint Expert Committee on Food Additives*

Kg/m² - Quilogramas por metro quadrado

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MeHg – Metil-mercúrio

mg- Miligramas

mL – Mililitros

ng/mL – nanogramas por mililitro

nm – Nanômetros

°C – Graus Celsius

PTWI – *Provisional tolerable weekly intake*

R24H – Recordatório 24 horas

SnCl₂ – Cloreto de estanho

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

THg – Mercúrio total

UnB – Universidade de Brasília

UNEP - United Nations Environment Programme

W – *Watts*

WHO- *World Health Organization*

RESUMO

A exposição humana a mercúrio tem sido alvo de preocupação devido a seus potenciais efeitos tóxicos. Crianças podem ser expostas a mercúrio pelo leite materno, e a presença desse metal no leite pode ser influenciada pela alimentação materna. Este estudo teve como objetivos analisar as concentrações de mercúrio total (THg) em leite humano de mulheres residentes no Distrito Federal, correlacionar estes níveis com a dieta materna e avaliar os riscos da exposição infantil a mercúrio pelo consumo de leite humano. O estudo incluiu dois grupos de amostras de leite, sendo o primeiro de amostras coletadas de 18 mães entre os dias 15 e 90º de lactação (7-8 amostras/mãe) e o segundo de 100 amostras de leite humano coletadas de bancos de leite. As amostras de leite sofreram digestão ácida em microondas e THg foi analisado por espectrometria de fluorescência atômica. Dois recordatórios alimentares de 24H foram utilizados para estimar o consumo alimentar habitual e um questionário de frequência alimentar para avaliar a frequência de consumo de peixes pelas mães do primeiro grupo. Não houve alterações significantes nos níveis de THg no leite durante os 90 dias de lactação, com média total de $6,47 \pm 5,80$ ng/mL (n=142), variando de $<0,76$ a $22,7$ ng/mL entre as mães. Houve correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre concentração de THg e consumo materno de gordura, carboidrato e vegetais, mas não com o de peixes. A maior parte das crianças (77,8%) estiveram expostas a níveis de THg que levam a uma ingestão maior que aquela considerada segura (PTWI de $5\mu\text{g}/\text{kg pc}$) em algum momento durante os 90 dias de lactação. A concentração média de THg encontrada nas amostras de bancos de leite foi de $2,68 \pm 1,72$ ng/mL, com valores entre $<0,26$ e $7,2$ ng/mL. Cerca de 20% das amostras apresentaram níveis de THg acima de $3,9$ ng/mL, o que poderia representar uma exposição de bebês prematuros e de baixo peso acima da PTWI (considerando $2,5$ kg pc e 450 mL consumo diário de leite). Apesar dos resultados desse estudo mostrarem níveis altos de THg em algumas amostras de leite humano, este é um alimento completo e vital para bebês prematuros e de baixo peso, e os benefícios de seu consumo superam os potenciais riscos advindos da exposição a mercúrio.

Palavras chave: mercúrio total, leite humano, lactação, bancos de leite, dieta materna, exposição infantil a mercúrio.

ABSTRACT

Human exposure to mercury has been a health concern due to its potential toxic effects. Infants may be exposed to mercury through lactation, and the presence of this metal in breast milk may be affected by the maternal diet. The aims of this study were to determine total mercury levels (THg) in human milk from breastfeeding mothers residing in the Federal District, correlate these levels with the mothers' diets, and discuss the potential risks for the infants from the exposure to mercury. The study analyzed two groups of milk samples, the first collected from 18 mothers who were between the 15th and 90th day of breastfeeding (7-8 samples/mother), and the second comprised of 100 samples obtained from human milk banks. Milk samples were acid digested in a microwave and THg analyzed by fluorescence atomic spectrometry. Two 24-hour dietary recall questionnaires to assess the usual food consumption and a food frequency questionnaire to obtain fish consumption information were applied to the mothers of the first group. There were no significant changes in THg levels during the 90 days of lactation, with a mean concentration of 6.47 ± 5.80 ng/mL (n=142), ranging from <0.76 to 22.7 ng/mL among the mothers. There was a significant correlation ($p < 0.05$) between THg concentrations in milk and the mothers's consumption of fats, carbohydrates and vegetables, but not of fish. Most of the infants (77.8%) were exposed to THg levels that lead to an exceedance of the Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI, 5 μ g/kg bw) at least once during lactation. The mean THg level in the milk bank samples analyzed was 2.68 ± 1.72 ng/mL, ranging from <0.26 to 7.2 ng/mL. About 20% of these samples had THg levels higher than 3.9 ng/mL, which may represent exposure levels exceeding the PTWI for premature and low body weight infants (considering 2.5 kg bw and 450 mL daily milk consumption). Although the results of this study showed that mercury levels in some milk samples were high, human milk is nevertheless considered a complete food and vital for premature and low weight infants, and the benefits of its consumption outcome the potential risks from mercury exposure.

Keywords: total Mercury, human milk, lactation, milk banks, maternal diet, infant exposure to mercury.

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio pode ser encontrado na natureza nas formas elementar, orgânica e inorgânica, que possuem diferentes vias de exposição e mecanismos de toxicidade. O mercúrio elementar (Hg^0) é um metal líquido, volátil à temperatura ambiente, e a exposição ocupacional a seus vapores tóxicos na indústria ou mineração pode causar efeitos adversos graves, como fraqueza muscular, ansiedade, agressividade e demência (WHO, 2008; Syversen e Kaur., 2012).

A população geral está exposta ao mercúrio pelo consumo de alimentos, principalmente de peixes, onde o metal está presente na forma orgânica (metilmercúrio, MeHg) (UNEP, 2002; Malm et al., 1995; Kehrig et al., 1998). O MeHg é formado em ambiente aquático a partir da metilação por bactérias do mercúrio inorgânico (Hg^{++}) (King et al, 2000). Cerca de 90% do mercúrio orgânico ingerido na dieta é absorvido pelo trato gastrointestinal (Chapman & Chan, 2000). O MeHg atravessa a barreira placentária e hematoencefálica podendo comprometer o desenvolvimento neurológico dos fetos, causando danos muitas vezes irreversíveis (WHO, 2008; Grandjean et al., 1995).

Recém nascidos em estágio de lactação são expostos a mercúrio pelo consumo de leite humano e a presença desse metal no leite está condicionada a vários fatores, incluindo características sócio-demográficas, estilo de vida e dieta da mãe (García-Esquinas et al., 2011; Da Costa et al, 2004). Níveis de mercúrio total (THg) em leite humano tem sido relatado por vários autores, com concentrações médias normalmente entre 0,3 e 4 ng/mL (Miklavcic et al., 2011; Garcia-Esquinas et al., 2011; Gundacker et al, 2002; Behrooz et al., 2012; Al-Saleh et al, 2003). No Brasil, estudos realizados na Amazônica e região Centro-Oeste e indicam concentrações médias de mercúrio em torno de 5.7 ng/mL, acima da média mundial, (Barbosa & Dórea, 1998; da Costa et al.,

2004). Entre 38 e 50% do THg no leite humano encontra-se na forma de MeHg (Orkarsson et al., 1996; Miklavcic et al., 2011).

Apesar da ocorrência de mercúrio no leite humano, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que todos os bebês sejam amamentados exclusivamente até os 06 meses de idade, já que os benefícios da amamentação superam os riscos relacionados à presença do mercúrio (WHO, 2007). A lactação fornece proteção natural ao bebê contra várias doenças e os nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento (Lucas et al., 1990; WHO, 2002). Determinar os níveis de mercúrio em leite humano, os fatores que determinam estes níveis e avaliar os riscos da exposição a este metal tóxico é importante para medir o impacto na saúde da criança e avaliar a necessidade de medidas para minimizar este risco numa dada população.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mercúrio e ambiente

Mercúrio é um metal largamente distribuído na natureza que, dependendo do nível de exposição, pode ser altamente tóxico para o homem. Mercúrio é encontrado em diversas formas: elementar (também conhecida como metálica, Hg^0), inorgânico (ex: cloreto de mercúrio, Hg^{++}) e orgânico (metil mercúrio, MeHg). Cada uma dessas formas apresenta diferentes toxicidades, incluindo efeitos no sistema nervoso central, sistema digestivo, imune, hepático e renal (WHO, 2007).

O ciclo natural de deposição e transformação do mercúrio no ambiente envolve a evaporação natural da crosta terrestre (ocorrência natural), principalmente da atividade vulcânica, queimadas, aquecimento de rochas e processos biológicos, e a emissão do metal em sua forma metálica ou inorgânica por fábricas e indústrias (origem antropogênica) e da atividade mineradora. Na atmosfera, o mercúrio é oxidado para a forma inorgânica e depositado nos solos e água (Figura 1).

O MeHg é formado na natureza pelo processo de metilação da forma inorgânica por intermédio de bactérias aquáticas redutoras de sulfato (King et al, 2000). A eficiência desse processo depende basicamente da quantidade de mercúrio inorgânico disponível e do grau de atividade das bactérias, que necessitam de um ambiente com temperatura, pH e presença de agentes complexantes específicos (Ullrich et al., 2001). O MeHg tem característica lipofílica e pode ser absorvido pelo plâncton, que são consumidos por peixes e moluscos, promovendo seu aumento nos níveis tróficos maiores da cadeia alimentar (Polak-Juszczak, 2012).

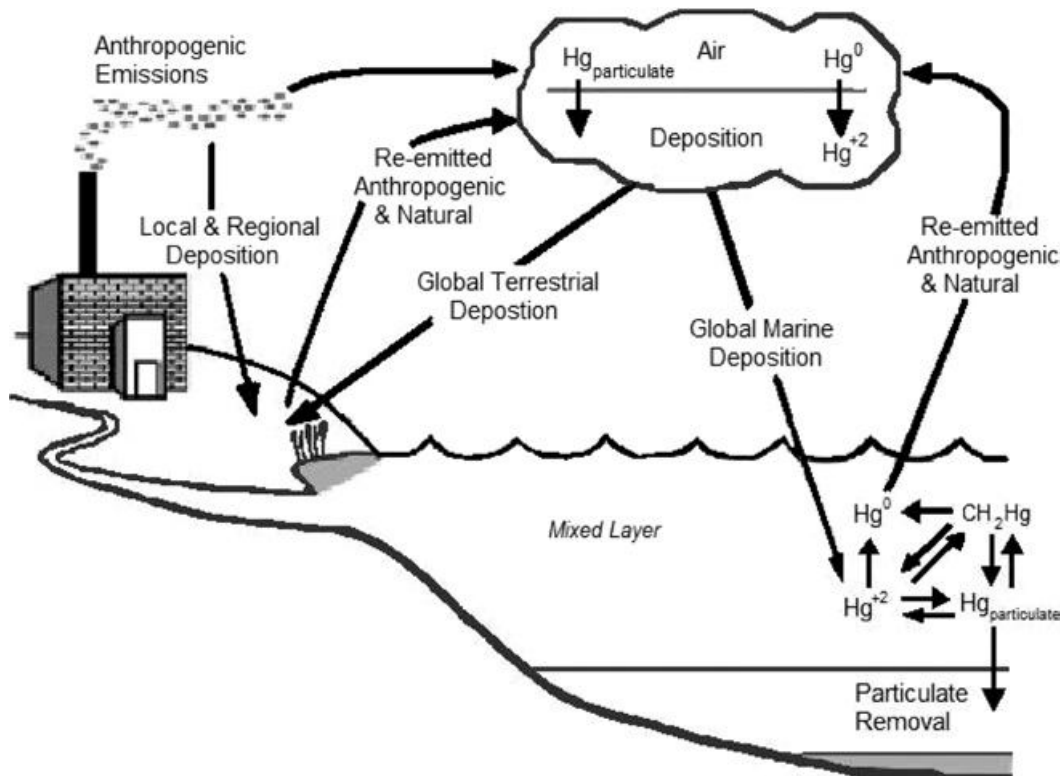


Figura 1. Ciclo de deposição de mercúrio (US-EPA, 2004)

A concentração de mercúrio no solo varia largamente no planeta. Gil et al. (2010) determinaram o conteúdo de mercúrio total (THg) em cinco diferentes tipos de solo calcário na Espanha (natural, terra seca, estufa, irrigado e solo de fazendas de arroz). A concentração de THg nos solos variou de 0,0094 a 1,585 mg/kg (média de 0,102 mg/kg), com solo de fazendas de arroz apresentando os maiores níveis. Em outros países, como Bélgica, França, China e Japão, as concentrações de THg em diferentes tipos de solo variaram entre 0,001 e 4,190 mg/kg (Tack et al., 2005 ; Fong et al., 2007 ; Grimaldi et al., 2008; Tomiyasu et al., 2003). Em área de proteção ambiental localizada na estação ecológica de Tripuí em Minas Gerais, as concentrações de THg encontradas no solo variaram entre 0,09 a 1,23 mg/kg (Palmieri et al., 2004).

A região Amazônica apresenta elevados níveis de mercúrio comparados a outras regiões do Brasil e do mundo, e até o final dos anos 90, achava-se que estes altos níveis eram devidos à intensa e extensa atividade garimpeira na região, que utiliza esse metal na extração de ouro. Lechler et al. (2000) coletaram sistematicamente amostras de água, sedimentos e peixes ao longo de 900 km do rio Madeira na Amazônia brasileira. Os resultados das análises mostraram que, apesar das concentrações de mercúrio estar acima da média global, elas refletiam a ocorrência natural desse metal na região. Os impactos da atividade humana estavam restritos apenas às áreas onde os garimpos de ouro estavam localizadas. Roulet & Lucotte (1998) concluíram que 97% do mercúrio presente no solo da região amazônica têm origem pré-antropogênica, semelhante ao que foi relatado por Fadini & Jardim (2001) em estudo realizado na bacia do rio Negro.

Do Valle et al. (2006) avaliaram os níveis de mercúrio em três diferentes tipos de solo da Amazônia não impactado pela atividade garimpeira. Os níveis variaram entre 25 e 764 mg/kg, sem diferença estatística entre solos da região industrial e solos afastados das fábricas. Níveis semelhantes foram encontrados por Roulet & Lucotte (1998) em solos da bacia do rio Tapajós (90 – 210 mg/kg), Lecher et al. (2000) nas bacias do rio Negro (48 - 212 mg/kg) e Jaú (61 -103 mg/kg) e Fadini & Jardim (2001) em solos do rio Negro (81-320 mg/kg).

Apesar dessa ocorrência natural, existe um aumento da mobilização antropogênica de mercúrio em ambientes terrestres e aquáticos, principalmente em países em desenvolvimento (UNEP, 2002), e os níveis no meio ambiente quase dobraram nos últimos 100 anos (Schuster et al. 2002). Muller et al. (2001) encontraram concentrações médias de mercúrio variando entre 7 e 51 mg/kg em três diferentes tipos de solos contaminados por mercúrio inorgânico em 1972 em uma região da Dinamarca. Birkett et al. (2001) encontraram níveis de THg variando entre 0,1 e 8,13 mg/kg em

solos de uma região da Inglaterra conhecida por intensa descarga de mercúrio inorgânico por uma indústria farmacêutica. No Brasil, Durão-Junior et al. (2009) avaliaram níveis de mercúrio em diferentes frações de solos e tanques de retenção de água de uma antiga mina de ouro na bacia do rio Descoberto em Minas Gerais onde houve extensa atividade garimpeira. Moradores dessa área relataram encontrar “bolinhas prateadas” no solo, que apresentaram concentrações de até 161 mg/kg THg. Em áreas de garimpo, a forma metálica do mercúrio é a mais predominante no solo, porém este estudo mostrou que o mercúrio, presente na região há mais de 50 anos, vem sofrendo constante processo de oxidação, e os níveis de mercúrio inorgânico chegaram a 100 mg/kg em algumas amostras.

2.2. Mercúrio em alimentos

O consumo de peixes é considerado a maior fonte de exposição humana a mercúrio, principalmente na sua forma orgânica. Cerca de 90% do THg encontrado nos peixes está presente como MeHg (Malm et al., 1995; Kehrig et al., 1998), e devido ao seu caráter lipofílico e seu potencial de bioacumulação na cadeia alimentar aquática, maiores níveis de MeH são encontrados em peixes predadores (piscívoros).

Lima et al. (2005) encontraram níveis de THg em peixes piscívoros da região amazônica variando de 0,3 µg/g até 2,68 µg/g, mais altos que os encontrados em peixes não piscívoros (0,016 – 0,406 µg/g). Os níveis médios de encontrados por Dórea et al. (1998) no Rio Madeira foram de 0,8 e 0,18 µg/g para peixes predadores e não predadores, respectivamente. Mais recentemente, Vieira et al. (2011) encontraram concentrações médias de THg em fígado ($0,45 \pm 0,27 \mu\text{g/g}$) e músculo ($0,26 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$) de peixes piscívoros em regiões de garimpo da região amazônica maiores que as encontradas em fígado de peixes piscívoros em áreas também da região amazônica mas

longe dos garimpos ($0,3 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$). Na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul, níveis de mercúrio encontrados em crocodilos por Vieira et al. (2010) variaram de 0,02 até $0,36 \mu\text{g/g}$, com pelo 70% na forma de MeHg.

Mercúrio pode estar presente em outros alimentos em concentrações semelhantes às encontradas em peixe. Níveis de THg em vegetais e frutas (incluindo repolho, mandioca, cará, batata doce, manga e caju) cultivados em duas regiões de garimpo às margens do rio Tapajós foram avaliados por Egler et al. (2006). A concentração média encontrada nas amostras coletadas na região de São Francisco foi de $2,55 \pm 3,08 \mu\text{g/g}$, estatisticamente maior que aquela encontrada na região de Creporizinho ($0,12 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$). Segundo os autores, a maior concentração em São Francisco se deve provavelmente ao processo de cianidação utilizado para extração de ouro na região que forma complexos solúveis de mercúrio mais molibizados no ambiente e mais absorvidos pelas plantas que o mercúrio metálico. Níveis mais baixos de mercúrio foram encontrados nas raízes das plantas (São Francisco: $0,41 \mu\text{g/g} \pm 0,30$; Creporizinho: $0,26 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$) (Egler et al., 2006). Shi et al. (2005) analisaram 15 amostras de arroz irrigado de 15 províncias chinesas e encontraram valores entre 6,3 e $39,3 \text{ng/g}$, sendo 7-44 % na forma de MeHg. Estudos conduzidos em áreas de mineração ou de alta poluição na China reportaram concentrações de THg em arroz irrigado entre 2,53 e 1120ng/g , sendo que entre 1,4 e 93% do mercúrio presente na forma de MeHg (Feng et al., 2010).

Num estudo de dieta total, Fávoro et al. (1997) avaliaram os níveis de mercúrio nas dietas de Manaus, Santa Catarina e Mato Grosso, analisando os alimentos típicos consumidos em cada região, incluindo cereais, peixes, vegetais e frutas. Níveis de THg nas dietas de Manaus e Mato Grosso foram similares ($87 \mu\text{g/kg}$), mas superiores às queles

encontrados na dieta de Santa Catarina (19 - 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$), caracterizada pelo menor consumo de peixe.

2.3. Mercúrio em leite humano

Crianças em estágio de lactação estão sujeitas a exposição de mercúrio tanto na forma orgânica quanto em sua forma inorgânica (Bjornberg et al, 2005). Oskarsson et al (1996) encontraram que cerca de 50% desse metal está na forma orgânica (MeHg) no leite humano, enquanto Miklavcic et al. (2011) estimaram em 38% esta razão.

Os níveis de mercúrio em leite humano estão relacionados principalmente com variáveis sócio-demográficas, estilo de vida e dieta materna. Norouzi et al. (2010) encontraram correlação estatisticamente significativa entre o peso das mães, número de amálgamas dentários e idade da mãe com os níveis de mercúrio em leite. García-Esquinas et al. (2011) coletaram 100 amostras de leite na terceira semana de lactação de mulheres residentes na Espanha e obtiveram dados de consumo alimentar por meio de um Questionário de Frequência Alimentar (FFQ). Os autores relataram concentração média de mercúrio de 0,53 ng/mL (0,03-2,63ng/mL), com níveis levemente maiores em mulheres expostas a fontes conhecidas desse metal (amálgamas dentários e consumo de peixe), porém esse aumento não foi estatisticamente significativo.

Behrooz et al. (2012) coletaram 80 amostras de leite de mulheres não ocupacionalmente expostas de duas regiões urbanas e uma região rural do Iran. Níveis mais elevados de THg foram encontrados nas amostras de mães da área rural ($0,86\pm 0,26$ ng/g) comparado àquelas de mães de áreas urbanas ($0,12\pm 0,06$ e $0,15\pm 0,06$ ng/g). Na Arábia Saudita, Al-Saleh et al. (2003) encontraram, em média, 3,1 ng/g THg nas 362 amostras de leite humano em leite humano. As mulheres participantes do estudo não tinham exposição ocupacional ao mercúrio, e os autores, reforçando os benefícios da

amamentação, recomendaram que não fosse medido esforços para prevenir a exposição de crianças durante a lactação.

Yalçın et al. (2010) avaliaram como hábitos alimentares, tabagismo, anemia, níveis de zinco e ferro no leite humano, selênio, zinco e cobre séricos se relacionavam com níveis de mercúrio em leite humano de 44 mulheres saudáveis na Turquia. Foi avaliada também a relação com o crescimento e desenvolvimento da criança durante o aleitamento materno exclusivo e o segundo ano de vida. Os resultados mostraram que mães em condição de anemia e mulheres tabagistas apresentam maiores concentrações de mercúrio no leite. Não foi encontrada relação entre concentração de mercúrio em leite com o crescimento e desenvolvimento das crianças.

No Brasil, Dorea e Barbosa (1998) avaliaram os níveis de mercúrio em leite humano ao longo do rio Madeira, na bacia Amazônica, área com importante atividade garimpeira. As concentrações de mercúrio em leite variaram entre 0 e 24,8 ng/g, com média de 5,8 ng/g (n=47). Os autores encontraram correlação positiva e estatisticamente significativa entre a concentração de mercúrio no cabelo das crianças e de suas respectivas mães, porém não entre mercúrio no cabelo e em leite humano das mães.

Da Costa et al. (2004) encontraram em uma população considerada como de baixo consumo de peixe (Brasília) níveis de mercúrio em leite humano (média de 5,73 ng/g) similares aos encontrados na região amazônica. Os autores sugerem correlação entre número de amálgamas dentários da mãe com concentração de mercúrio encontrado no leite, mas ressaltam que a vaporização de mercúrio proveniente de amálgamas dentários é mínima e não está certo se causa malefícios ao feto e recém nascido.

A Tabela 1 mostra as concentrações médias de mercúrio em leite humano encontradas no Brasil, e em estudos conduzidos em outros países nos últimos 10 anos.

Os níveis encontrados no Brasil são maiores que aqueles descritos para a Europa e para o Oriente Médio. Amostras de colostro provenientes da Malásia apresentaram a maior média entre os estudos.

Tabela 1 – Concentrações de mercúrio total em leite humano encontradas ao redor do mundo.

País	Período da lactação	No. de amostras	Media, µg/L	Faixa µg/L	Referência
Brasil (Amazônia)	0.5 – 15 meses	47	5.8 ± 5.9	0 – 24.8	Barbosa e Dorea, 1998
Brasil (Brasília)	± 21º dia	20	5.73-5.46	1.8 - 23.07	Da Costa et al, 2004
Áustria	2 - 14º dia	116	1.59 ± 1.21	-	Gundacker et al, 2002
Eslovênia	-	284	0.3		Miklavcic et al , 2011
Espanha	3ª semana	100	0.53	0.45 - 0.62	Esquinas-Garcia et al (2011)
Arábia Saudita	-	362	3.10± 4,05	<LOD – 47.2	Al-Saleh et al. 2003
Turquia	10 – 20º dias	44	3.42 ± 1.66	0.35 - 6.9	Yalçin et al, 2010
Iran	-	80	0.39 ± 0.1	nd - 5.86	Behrooz et al, 2012
Malásia	4º dia	38	7.23 ± 1.16	-	Norouzi et al, 2012

2.4. Exposição humana a mercúrio e toxicologia

O sistema neurológico é o principal alvo da toxicidade do mercúrio, e os sintomas decorrentes da exposição podem levar de semanas até alguns meses para aparecerem, dependendo da dose e do período de exposição (Clarksson, 2002). Esses sintomas incluem tremores, eretismo, insônia, perda de memória, alterações neuromusculares, dores de cabeça e deficiências cognitivas e motoras. Os efeitos

apresentam intensidades diversas e podem se tornar mais severos e irreversíveis. Parestesia, dormência e sensação de agulhas no corpo são os primeiros sinais de envenenamento podendo evoluir para ataxia cerebelar, disartria e perda da capacidade auditiva (WHO, 2008).

A exposição humana à forma metálica do mercúrio ocorre principalmente via inalação dos vapores de mercúrio durante processos industriais em eventos acidentais e ocupacionais (WHO, 2008; Akyildiz et al. 2012; Salthammer et al. 2011; Counter & Buchan, 2004). A população geral pode se expor a vapores de mercúrio advindo de amálgamas dentários, que contém aproximadamente 50% de mercúrio, entre outros metais como cobre e prata, e são utilizadas há mais de 150 em restaurações dentárias (da Costa et al, 2004; Norouzi et al. 2012). O mercúrio pode evaporar na cavidade bucal, ser inalado e absorvido pelos pulmões (Clarkson, 2002). Al-Saleh et al (2012) mostraram que baixa exposição a mercúrio devido a presença de amalgama dentário afeta a função renal de crianças de 5 a 15 anos, num mecanismo que provavelmente envolve estresse oxidativo.

Os compostos orgânicos de mercúrio foram sintetizados pela primeira vez no ano de 1860 em Londres, quando dois cientistas foram a óbito em decorrência de envenenamento pelo metal. No início do século XIX, pesquisadores descobriram potentes propriedades fungicidas associadas ao uso de compostos de mercúrio em lavouras, principalmente no plantio de cereais. O extenso uso desses fungicidas promoveu sérios acidentes. No Iraque em 1970-1971, grãos de trigo contaminados com mercúrio foram utilizados para a fabricação de farinha e mais de 6.000 pessoas foram admitidas em hospitais com sintomas de intoxicação (Clarkson, 1998). Estudos epidemiológicos retrospectivos sugerem que mais de 40.000 indivíduos possam ter sido contaminados (WHO, 2008)

A capacidade de bioacumulação do MeHg nos organismos aquáticos ficou evidente em um acidente ocorrido no Japão na década de 1950. Pesquisadores notaram que eventualmente pescadores e suas famílias na baía de Miamata sofriam de uma doença neurológica apresentando sinais de desorientação, alterações visuais e dormência nas extremidades. As investigações apontaram para uma fábrica que utilizava compostos inorgânicos de mercúrio como catalisador, e derramava seus dejetos nas águas da baía, contaminando os peixes consumidos pela população. Foram registrados mais de 12.500 casos de intoxicação e mais de 900 pessoas foram a óbito neste evento, que ficou conhecido como “Desastre de Miamata” (Clarkson, 2002).

Cerca de 5% do THg ingerido é encontrado no sangue e a concentração nas células vermelhas é 20 vezes superior à no plasma sanguíneo (ATSDR, 1999). Quase todo MeHg é absorvido pelo trato gastrointestinal (90%) e distribuído no organismo, em um processo que dura aproximadamente 30 horas (ATSDR, 1999). O MeHg atravessa a barreira placentária e os níveis no cérebro de bebês é proporcional à concentração encontrada no sangue materno (Clarkson, 2002). No organismo, MeHg é metabolizado a mercúrio inorgânico e não há evidências de formação de nenhuma forma orgânica do metal nos tecidos (Goyer & Clarkson, 2001). Aproximadamente 10% do mercúrio inorgânico (Hg^{++} ou sais) é absorvido pelo sistema digestivo, podendo sofrer redução no fígado pela ação da enzima glutathione peroxidase e exalada em forma de vapor pelos pulmões (ATSDR, 1999). A meia vida do mercúrio inorgânico no homem é de 60 dias (Hursh et al., 1978), e a urina é o melhor biomarcador de exposição a mercúrio inorgânico (Risher e De Rosa, 1997).

Os níveis de mercúrio em cabelo é um bom biomarcador da exposição crônica ao metal e pelo menos 70% do THg presente no cabelo está na forma orgânica (Malm et al., 2010). O mercúrio é incorporado ao cabelo durante seu crescimento e a

concentração de mercúrio no cabelo de crianças é proporcional aos níveis sanguíneos maternos (Tian et al., 2010). A quantidade, o tipo de peixe consumido e a sazonalidade parecem alterar a dinâmica de excreção capilar de mercúrio (Malm et al., 2010). Além dos sintomas neurológicos, Rasanen e Mutanen (1995) sugerem que a ingestão de mercúrio proveniente do consumo de peixes está associado com aumento do risco de infarto agudo do miocárdio e com o números de mortes por doenças cardiovasculares. Em crianças, a exposição intrauterina ao mercúrio pode trazer malefícios à saúde do bebê mesmo que a mãe não apresente sintomas de intoxicação, fato observado por Harada et al. (2011) que acompanhou o desenvolvimento da doença de Minamata no Japão. A exposição via leite humano durante a amamentação também podem levar ao comprometimento do sistema nervoso (Rice et al, 2000; WHO, 2002; Grandjean et al., 2007).

Outra forma orgânica do mercúrio, o etilmercúrio tem sido utilizado como agente bactericida em vacinas para crianças, também conhecido como thimerosal, conservante com cerca de 50% de mercúrio. A exposição de crianças a etilmercurio durante a vacinação juntamente com a ingestão de mercúrio pelo aleitamento materno e fórmulas infantis pode significar um risco para a saúde dessa população (Pichichero et al., 2009; Dorea et al., 2010; Marques et al., 2007). Os potenciais efeitos nocivos do etilmercúrio são baseados na semelhança toxicológica desse composto com o MeHg (Clarkson, 2002)

Os acidentes ocorridos na baía de Minamata no Japão e no Iraque motivaram pesquisadores a desenvolver estudos epidemiológicos em larga escala a fim de estudar os efeitos tóxicos do mercúrio pela exposição uterina. O *Seychelles Child Development Study* (SCDS) conduzido nas ilhas Seychelles no oceano Índico é um estudo longitudinal e prospectivo que examinou a exposição de fetos a MeHg pelo consumo de

peixes por parte das mães (Davidson et al., 1996). O estudo acompanhou e realizou uma bateria de exames em 779 crianças de 6 a 107 meses de idade. Não foram encontrados comprometimento no desenvolvimento neurológico de crianças de 66 meses após exposição pré e pós natal a mercúrio mesmo com o elevado consumo de peixes pelas mães. Estudos realizados nas ilhas Faroe, no Atlântico Norte apontaram um déficit da capacidade cardiovascular de crianças de 7 a 14 anos cujas mães tinha alta ingestão de MeHg pelo consumo de carne de baleia e outros peixes (Grandjean et al., 1997). Outros trabalhos utilizando dados obtidos nos estudos conduzidos na Nova Zelândia, ilhas Seychelles e Faroe mostraram associação positiva entre exposição precoce a esse metal com comprometimento da função neurológica de crianças e perda de pontos no coeficiente de inteligência (Axelrad et al., 2007; Cohen et al., 2005). Todavia, Thurston et al. (2007) utilizando dados do programa de desenvolvimento infantil das ilhas Seychelles (SCDS) observaram que o aumento da pressão arterial em crianças está relacionado com o índice de massa corporal e pressão arterial da mãe durante a gestação e não necessariamente com a exposição pré-natal à MeHg.

Os estudos conduzidos nas ilhas Seicheles e Faroe foram avaliados pelo JECFA (*FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives*), e serviram de base para o estabelecimento da ingestão semanal máxima (*Provisional Tolerable Weekly Intake*, PTWI) para MeHg de 3,3 µg/kg/pc para a população geral e de 1,6 µg/kg para mulheres em idade reprodutiva (WHO, 2004). Adicionalmente, foi estabelecido uma PTWI de 5 µg/kg/pc para THg, parâmetro que foi substituído em 2010 para 4 µg/kg/pc para mercúrio inorgânico, que considera a exposição por meio do consumo de alimentos em geral sem considerar peixes (WHO, 2010).

Passos et al. (2002) examinaram a influência do consumo de alimentos tradicionais da região amazônica e exposição a mercúrio. Amostras de cabelo de 26

mulheres adultas de uma comunidade com consumo regular de peixe foram coletadas mensalmente por 12 meses e analisadas. Os resultados indicaram que mulheres que apresentavam maior consumo de frutas tinham exposição menor a mercúrio, e os autores sugerem que, possivelmente, substâncias fitoquímicas presentes nas frutas podem alterar a absorção, excreção, transporte e metabolismo do mercúrio. Todavia, os autores concluem que são necessários mais estudos com populações maiores e o controle de outras variáveis para melhor elucidar esses achados. Chapman e Chan (2000) apontam o selênio e a vitamina C como possíveis nutrientes protetores na absorção e excreção de mercúrio e sugerem que são necessários mais estudos sobre a toxicocinética do mercúrio em humanos, pois grande parte foi conduzida em modelo animal.

A meia-vida do mercúrio em mulheres em estágio de lactação é de aproximadamente 42 dias, enquanto que em mulheres que não estão amamentando é de 75 dias, indicando uma maior mobilização desse metal em mulheres lactantes (Greenwood et al., 1978). Os riscos e benefícios do consumo de peixe durante a gravidez e lactação dependem em grande parte da quantidade e tipo de peixe consumido pela mãe. Em 2006, o Instituto de Medicina dos Estados Unidos recomendou que mulheres em idade reprodutiva evitassem o consumo de peixes predadores (IOM, 2007). Entretanto o mesmo documento estimula o consumo semanal de 100 a 400 g, principalmente peixes que contém concentrações mais altas de EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosaexanóico), como salmão (4,1 mg/g de EPA; 14,3 mg/g de DHA), truta (2,6 mg/g de EPA; 6,7 mg/g de DHA) e sardinha (4,7 mg/g de EPA; 4,1 mg/g de DHA) (Martin et al 2006). Esses ácidos graxos apresentam diversos efeitos benéficos à saúde da mãe e do bebê, inclusive contribuindo para melhor desenvolvimento do processo cognitivo (Richardson et al., 2005)

Estimar os níveis de ingestão de mercúrio pela dieta é fundamental para avaliar os potenciais riscos desta exposição para a saúde humana (Jardim & Caldas, 2009). A estimativa da ingestão de mercúrio pelo bebê pelo consumo de leite humano é calculada multiplicando a concentração de mercúrio no leite pelo volume de leite consumido dividido pelo peso do bebê (Equação 1):

$$\text{Ingestão} = \frac{[\text{THg} \times \text{Consumo de leite humano}]}{\text{Peso corpóreo}} \quad (1)$$

O risco desta exposição pode ser avaliado quando se compara a ingestão calculada com a ingestão semanal máxima recomendada, a PTWI (5 µg/kg pc, ou 0,71 µg/kg pc/dia, para THg). O risco pode ser expresso em % do PTWI (Eq. 2) e ele pode ser importante quando este percentual ultrapassa 100 (Jardim & Caldas, 2009).

$$\% \text{ PTWI} = \frac{\text{Ingestão}}{\text{PTWI}} \quad (2)$$

Da Costa et al. (2005) estimaram a exposição a mercúrio dos bebês pelo consumo de leite materno em Brasília, considerando como 4kg o peso médio de bebês com 21 dias de vida e 150g de leite/kg de peso corpóreo o volume médio consumido diariamente. A concentração média de THg em leite humano encontrada nesse estudo foi 5,73 ng/g e 56,6% dos bebês apresentaram ingestão de mercúrio que ultrapassou o PTWI. No Irã, a média de ingestão de mercúrio diária encontrada por Behrooz et al. (2011) foi de 0,064 µg/kg pc (cerca de 9% PTWI), e apenas 3,7% das amostras de leite tinham concentrações de mercúrio acima do recomendado pela OMS (0,5µg/g).

2.5 Análise de mercúrio em leite humano

A análise de metais em amostras biológicas necessita, na maioria das vezes, de uma etapa de digestão da matéria orgânica. Para esta etapa, Garcia-Esquinas et al. (2011) liofilizaram amostras de leite e as mesmas permaneceram durante 5 horas na presença de ácido nítrico (HNO_3) e água oxigenada (H_2O_2). Gundacker et al. (2002) liofilizaram as amostras de leite humano a $48\text{ }^\circ\text{C}$ e digeriram com 5mL de ácido nítrico por 10 minutos a $175\text{ }^\circ\text{C}$. Miklavcic et al. (2011) utilizaram no processo de digestão ácido nítrico 65%, ácido perclórico e ácido sulfúrico, seguido de aquecimento a $220\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos.

Depois de digerida, as técnicas mais utilizadas para quantificar o mercúrio são a espectrofotometria de absorção atômica (AAS) e a espectrometria de fluorescência atômica (AFS). A AAS foi utilizada por vários autores para determinação de mercúrio total em leite humano, com limites de detecção ou quantificação entre 0,06 e 0,43 ng/mL (Esquínas-Garcia et al., 2011; Drexler et al., 1998; da Costa et al., 2005; Al-Saleh et al., 2003).

A AFS é um método sensível e seletivo para análise de vários elementos de relevância médica e científica, entre eles o mercúrio e oferece grandes vantagens em termos de linearidade e níveis de detecção. A fluorescência atômica é um processo espectrométrico baseado na absorção de radiação de comprimento de onda específico da espécie atômica em estado vapor, subsequente emissão da radiação no mesmo comprimento de onda, e detecção da radiação emitida (Cai, 2000). A configuração básica de um instrumento de AFS consiste de uma fonte de radiação, um atomizador, um sistema de seleção de comprimento de onda, um detector de sinal e um sistema eletrônico de leitura deste sinal (Figura 2). A fonte de luz mais utilizada para análise de

mercúrio é a lâmpada em arco de mercúrio, que tem sido usada em instrumentos comerciais com filtro de 254 nm para análise de mercúrio (Cai, 2000).

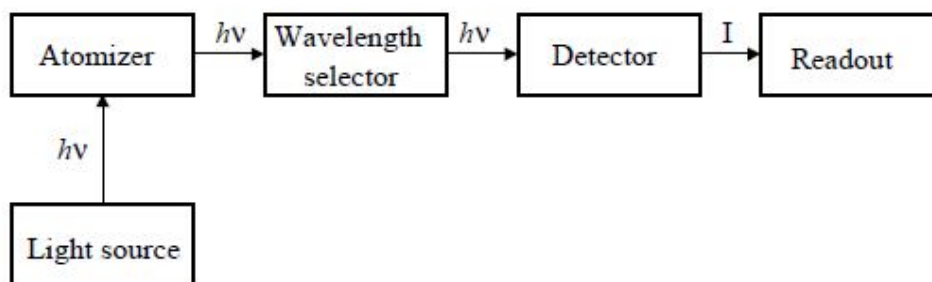


Figura 2: Diagrama básico de um equipamento de fluorescência atômica (Cai, 2000)

Vários autores utilizaram a CVAFS para análise de mercúrio em leite humano, com limites de detecção variando entre 0,03 e 0,07 ng/mL (Bjorberg et al., 2005; Miklavcic et al., 2011).

O mercúrio é um elemento metálico com baixa pressão de vapor (0,0016 mbar), característica que permite geração de vapor sem a necessidade de uma fonte externa de calor. Na técnica de espectrometria de fluorescência atômica de vapor frio (CVAFS, *Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrophotometry*) os compostos de mercúrio são normalmente convertidos a íons Hg^{+2} com uma mistura fortemente ácida e o Hg^{+2} é reduzido a Hg^0 através de uso de NaBH_4 ou SnCl_2 (Micaroni et al., 2000). Os vapores de mercúrio formados a 20°C são arrastados por um gás inerte para uma célula onde absorve radiação no comprimento de onda de 253,7 nm e o sinal de fluorescência emitido pelo mercúrio é proporcional à concentração do metal presente na amostras (Cai, 2000).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a exposição de crianças e recém-nascidos a mercúrio pelo consumo de leite humano e ao longo do período de lactação

Objetivos específicos

- 1) Otimizar e validar a metodologia de análise de THg em leite humano por espectrofotometria de fluorescência atômica
- 2) Analisar os níveis de THg ao longo de 90 dias de lactação, e correlacionar com a dieta materna
- 3) Avaliar os riscos da exposição dos bebês a THg durante os 90 dias de lactação
- 4) Analisar os níveis de de THg em amostras de leite humano coletadas em bancos de leite do Distrito Federal e os riscos do consumo deste leite por bebês prematuros e de baixo peso.

4. METODOLOGIA

4.1. Amostras de leite humano

Neste estudo, dois grupos de amostras de leite foram analisados quanto ao teor de mercúrio total (THg). Em ambos os casos, os projetos tiveram aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (Anexos 1 e 2) e as mães doadoras assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndices 1 e 2).

4.1.1 Amostras de leite materno do Grupo 1

As amostras de leite humano deste grupo foram provenientes de um estudo conduzido pelo Laboratório de Bioquímica da Nutrição da Universidade de Brasília cujo objetivo consistia em avaliar níveis de EPA e DHA em leite humano de mulheres submetidas a um protocolo de atividade física e oferta de uma porção de peixe (salmão) no 75º dia de lactação. As mães foram recrutadas em clínicas particulares de Brasília entre 2002 e 2005 e acompanhadas durante 90 dias de lactação. No total, 63 mães entraram no estudo, 31 desistiram no início, 32 mães aceitaram doar amostras de leite durante 90 dias de lactação, mas apenas 18 completaram o projeto. Para atender aos objetivos principais do estudo original as participantes deveriam ter idade 20 e 40 anos de idade, cursado pelo menos o ensino médio, possuir índice de massa corporal pré-gestacional entre 20 e 30 kg/m², ser saudáveis, não tabagistas, primíparas, com crianças saudáveis nascidas a termo (38-41 semanas de gestação) com aleitamento materno exclusivo. Os pesos e alturas das mães foram aferidos utilizando o protocolo de Lohman e o peso ao nascer das crianças foi obtido do prontuário médico da mãe. O peso das crianças foi aferido por profissionais treinados nos dias 30, 60 e 90 após o nascimento utilizando uma balança pediátrica Sohlene com escala de 10g.

As amostras de leite foram coletadas pelas próprias participantes em frascos de vidro fornecidos pelo pesquisador. As mães foram previamente instruídas sobre como higienizar a mama antes da coleta. As amostras foram armazenadas em freezer doméstico na residência da mãe até a data do recolhimento pelo pesquisador que as transferiu para o Laboratório de Bioquímica da Nutrição, onde permaneceram congeladas a -25°C até a análise.

4.1.2 Amostras de leite materno do Grupo 2

As amostras de leite humano deste grupo se inserem no âmbito de um projeto do Laboratório de Toxicologia que tem como objetivo analisar resíduos e contaminantes tóxicos em amostras de leite de bancos de leite do Distrito Federal (DF). A rede de bancos de leite do DF é composta atualmente por 16 Bancos de Leite Humano, sendo 12 da rede pública e 4 da rede privada, além de mais 2 pontos de coleta. Previamente, foi realizada reunião com os representantes dos bancos de leite para explanação dos objetivos do projeto e esclarecimento de eventuais dúvidas, e dois deles optaram por não participar do projeto. Todos os bancos de leite se localizam nos hospitais regionais da Secretaria de Saúde do Distrito Federal. No Distrito Federal, existe parceria entre a rede dos bancos de leite e o Corpo Militar de Bombeiros na coleta de leite humano

As amostras de leite (cerca de 20 mL) foram coletadas de duas maneiras: 1) a mãe retirava uma amostra em tubo falcon fornecido pelo pesquisador e entregava diretamente ao bombeiro responsável; 2) após a coleta pelos bombeiros, as amostras eram encaminhadas para os bancos de leite e após o descongelamento funcionários do hospital transferiam uma alíquota para o tubo falcon fornecido pelo pesquisador. As amostras foram levadas ao Laboratório de Toxicologia onde permaneceram a -25°C até a data da análise. As amostras foram coletadas no período entre maio de 2011 e

fevereiro de 2012. Dados das mães foram obtidas nas fichas individuais da doadora no banco de leite, como idade, endereço, telefone, data do parto, peso do bebê ao nascer e data da coleta da amostra na residência. Adicionalmente, as doadoras foram contatadas por telefone, quando esta informação estava disponível, para verificação ou complementação de alguns dados.

No âmbito do projeto, foram coletadas 244 amostras de leite, das quais 100 foram analisadas neste estudo. A Figura 3 mostra a localização dos oito bancos de leite de onde originaram essas 100 amostras.



Figura 3. Regiões administrativas do Distrito Federal onde foram coletadas as amostras de leite humano (n=100)

3.2. Análise de mercúrio total (THg) em leite humano

Para o processo de digestão, 1 mL da amostra foi transferido para um recipiente de teflon e diferentes volumes de nítrico suprapuro 65% e água oxigenada suprapuro 30% (Merck, USA) foram testados para encontrar a melhor condição de digestão das amostras de leite para posterior análise. A amostra foi digerida em um sistema de

digestão fechado com o aparelho Microwave DGT-100 (Provecto Systems, Brazil). O programa de digestão foi otimizado em 790W (5 minutos), 500W (5 minutos), 0W (5 minutos) 790W (5 minutos) e 700W (5 minutos). A amostra digerida foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e seu volume completado com água nanopura (Ultrapure Water System, Barnstead). THg foi analisado por espectrometria de fluorescência atômica (AFS) no equipamento PSA 10.023 Merlin system (PS Analytical, Kemsig, Sevenoaks, UK), utilizando como solução redutora o cloreto estano 2%, preparada semanalmente. Duas alíquotas de cada amostra foram submetidas ao processo de digestão e análise. As curvas analíticas foram preparadas diariamente, com soluções padrão de 0,01µg/L; 0,025µg/L; 0,05 µg/L; 0,1 µg/L e 0,2µg/L, preparadas a partir de uma solução padrão de mercúrio de 1000mg/L (Merck, Germany). Material de referência certificado (BCR®-150; Institute for Reference Material and Measurements, Belgium) foi utilizado para avaliar a repetitividade e exatidão do método analítico utilizado. Esse material contém 9,4 ng/g de mercúrio, com incerteza (desvio padrão) aceitável de até 1,7ng/g.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da metodologia para análise de mercúrio total em leite humano.

5.1.1 Digestão de amostras

Para esse teste, alíquotas de uma mesma amostra de leite humano enriquecidas com diferentes níveis de mercúrio foram digeridas com diferentes volumes de ácido nítrico 65% e água oxigenada 30%. Os resultados estão mostrados na Figura 4.

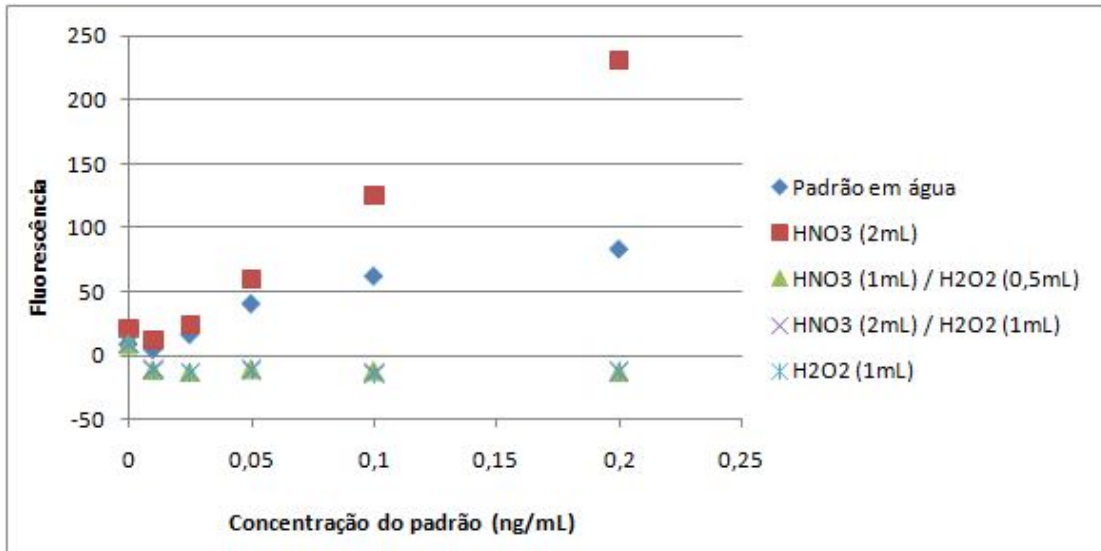


Figura 4. Amostras digeridas com diferentes volumes de reagentes.

Pode-se observar que o sinal de fluorescência é suprimido quando a solução de digestão inclui água oxigenada. Por ser um agente oxidante, a presença em excesso desse reagente possivelmente comprometeu a redução do mercúrio pelo cloreto estano (II) e posterior detecção no espectrofotômetro. Bjorberg et al (2005) e Miklavcic et al (2011) utilizando a mesma técnica de análise de mercúrio (CVAFS) também optaram por não utilizar peróxido de oxigênio (H₂O₂) para a digestão das amostras de leite humano

Posteriormente, a digestão da amostra de leite foi testada com diferentes volumes de ácido nítrico 65%. Os resultados mostraram que a amostra ficou mais límpida e cristalina quando digerida com 2mL de HNO₃ (Figura 5), mostrando uma digestão eficiente. Esse volume de ácido nítrico foi então escolhido para digestão das amostras do estudo.

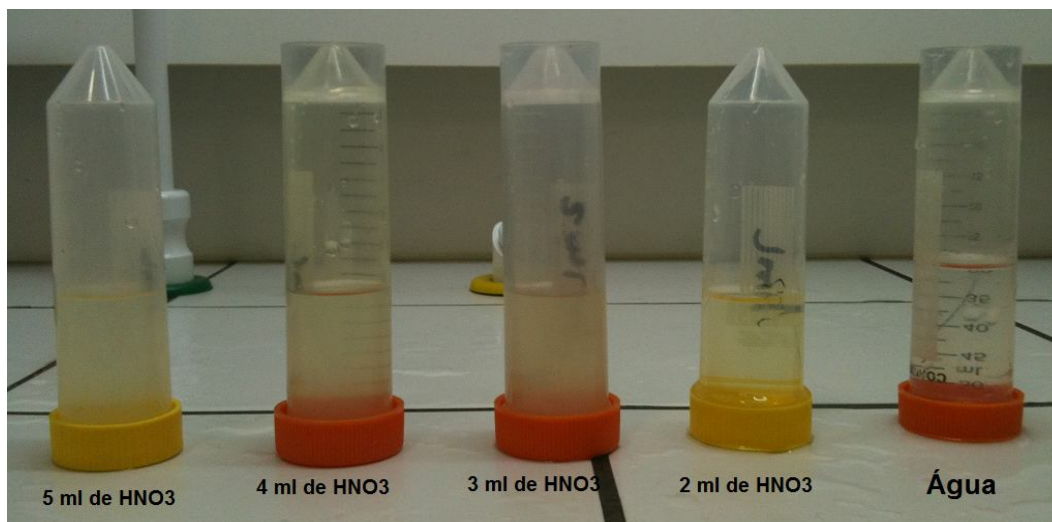


Figura 5. Amostra de leite humano digerido com diferentes volume de ácido nítrico 65% suprapuro.

5.2 Validação da metodologia para análise de mercúrio total em leite humano

5.2.1 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado para averiguar as possíveis interferências que a matriz leite humano causa na análise de mercúrio por AFS. Para isso foi feito uma curva analítica com concentrações de soluções padrão de $0,01\mu\text{g/L}$; $0,025\mu\text{g/L}$; $0,05\mu\text{g/L}$; $0,1\mu\text{g/L}$ e $0,2\mu\text{g/L}$ em água e leite humano digerido. Teste F de Fisher mostrou que as variancias residuais das curvas em solvente e em matriz são homogêneas, e foram combinadas para avaliar o efeito matriz usando o teste t, que não mostrou diferença significativa entre as inclinações das duas curvas (Bruce et al., 1998). Dessa maneira pode-se afirmar que as retas apresentadas na Figura 6 são paralelas, a matriz não tem efeito na precisão do método nessa faixa de concentração e que os possíveis interferentes presentes na amostra de leite digerida afetam o sinal obtido no detector de maneira constante ao longo da faixa de concentração estudada. A fluorescência é maior nas amostras de leite devido à maior concentração de mercúrio em relação à água. Desta

maneira, como a presença da matriz não interfere na análise, a quantificação do mercúrio na amostra foi feita contra uma curva analítica preparada em água.

As curvas analíticas foram traçadas diariamente para cada grupo de amostras analisadas, com coeficientes de regressão (R^2) sempre superiores a 0.99.

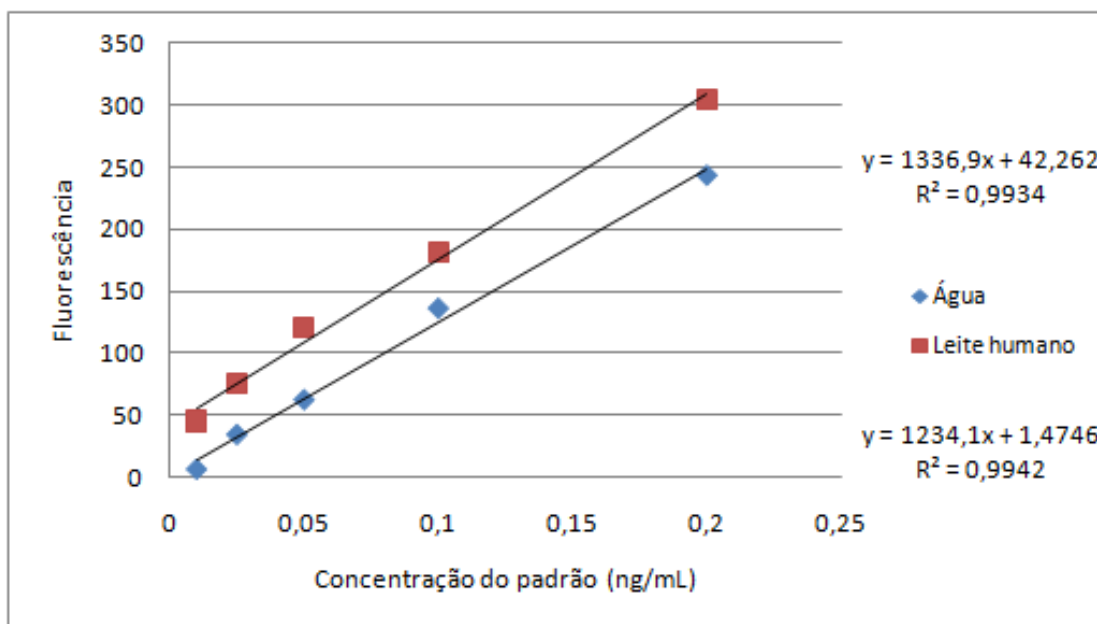


Figura 6. Curva analítica em leite humano e água para avaliação do efeito matriz

5.2.2 Limites de detecção e quantificação

Nesse trabalho os limites de quantificação e detecção foram obtidos em função da resposta de fluorescência de 1 mL de água nanopura (branco) digerida em 2 mL de ácido nítrico (n=10). A média de fluorescência encontrada (B) e desvio padrão (sd) das leituras foi de 10,2 e 0,789 u.i.f (Unidade de Intensidade de Fluorescência) respectivamente. O limite de detecção (LOD) e de quantificação foram estimados a partir da fluorescência mínima de detecção ($B + 3sd=12,6$ u.i.f) e quantificação ($B +$

8sd= 16,5 u.i.f) em uma curva analítica feita no mesmo dia. O LOD e LOQ assim estabelecidos foram 0,26 ng/mL e 0,76 ng/mL, respectivamente.

5.2.3 Exatidão e repetitividade

A performance do método otimizado foi avaliada pela análise do material de referência certificado (BCR®-150). Sete alíquotas deste material (aproximadamente 0,1g) foram submetidas ao processo de digestão com 2 mL de ácido nítrico 65% e analisadas quanto ao teor de THg. A incerteza estimada (desvio padrão) foi de 0,94 ng/g (n=7), menor que a incerteza considerada aceitável pelo fornecedor do material de referência (1,7 ng/g), com exatidão média de 99,67% e repetitividade (coeficiente de variação) de 10,08 % (INMETRO, 2010). Os resultados (Tabela 02) mostram que o método apresenta exatidão e repetitividade aceitáveis.

Tabela 2. Análise de THg no material de referência certificado leite em pó BCR® 150 (9,4 ± 1,7 ng/g THg)

Replicata	Peso (g)	Concentração obtida (ng/g)	Exatidão (%)
1	0,109	9,97	106,1
2	0,113	9,21	97,95
3	0,103	9,20	97,9
4	0,116	11,0	116,6
5	0,109	9,12	97,0
6	0,117	10,1	107,2
7	0,113	7,98	84,9
Média		9,5	101,1
Desvio padrão		0,94	10,03
Coefficiente de variação		9,93%	9,93%

5.3 Mercury concentration in breast milk and exposure assessment for the first 90 days of lactation in a Midwestern region of Brazil

Leandro Rodrigues da Cunha, Teresa Helena Macedo da Costa^b, Eloisa Dutra Caldas^{c,*}

^a Health Science Graduate Course, Faculty of Health Science, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

^b Department of Nutrition, Faculty of Health Science, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

^c Pharmaceutical Sciences, Faculty of Health Science, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

*Corresponding author: Laboratory of Toxicology, Pharmaceutical Sciences, Faculty of Health Science, University of Brasilia, Campus Darci Ribeiro, 70919-970, Brasilia, Brazil.

Tel/FAX: +55-61-3107-1875; E-mail: eloisa@unb.br;

Abstract

Breast milk samples from 18 mothers were collected between the 15th and 90th day of lactation, digested with nitric acid in a microwave, and total mercury (THg) levels quantified by atomic fluorescence spectrometry. Participants responded to a 24-hour dietary recall questionnaire on the 74th and 76th of day of lactation, and to a Food Frequency Questionnaire querying frequency of fish intake over the previous 90 days. Usual intake was estimated using the PC-SIDE software. Mean THg levels for each mother ranged from <0.76 to 22.7 ng/mL during the period, and the mean level for all samples (n=142) was 6.47±5.80 ng/mL. THg levels did not change significantly in most cases over the period under study, but exposure increased for most infants on the 90th day of lactation, with intakes exceeding the THg Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) at least one time during the period for 77.8% of the infants. The mothers consumed mostly food from the fat and grain groups, with a significant correlation between consumption and milk THg (p=0.006 and 0.007). A significant correlation was also found between vegetable consumption and carbohydrate intake and THg (p= 0.015 and 0.045, respectively). No correlation was found between maternal daily fish consumption frequency and THg levels. Although this study showed that mercury intake by infants during lactation may exceed the toxicologically safe exposure level (PTWI), we do believe that the benefits of lactation for both the mother and the infant outweigh the eventual risks that this exposure may represent.

Key words

Mercury; food consumption, breast milk; infant exposure.

1. Introduction

Breast milk is the most complete food in the human diet, providing almost all the necessary nutrients for the baby and protection against a variety of diseases, including diarrhea, acute respiratory infections, and otitis (Leon-Cava et al., 2002). Exclusive breastfeeding during the first six months of life can reduce child mortality rates (Jones et al., 2003) and chances of developing diabetes, hypertension and cardiovascular disease in adulthood (Pettitt, 1997; Wilson, 1998; Martin, 2005). However, milk is an excretion pathway in mammals, and may contain toxic compounds to which the mother has been exposed, mainly from dietary sources (Solomon and Weiss, 2002).

Mercury is a neurotoxic element widely present in the environment from natural and anthropogenic sources (WHO, 2008). Mercury concentrations in the water, sediment, and biota of the Brazilian Amazon are above global levels, largely due to natural sources and natural biogeochemical processes (Lechera et al., 2000). Fish are considered the main vehicle of dietary exposure to mercury, with mean total mercury (THg) levels in predator fish from the Amazon region ranging from 0.1 to 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in most studies (Berzas Nevado, 2010). Similar levels were found in predator cutlass fish (*Trichiurus lepturus*) captured on the Brazilian coast (Seixas et al., 2012), but lower levels were found in farmed tilapia (up to 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Botaro et al., 2012) and in sea catfish (*Cathorops spixii*) from estuaries in Southern Brazil (up to 0.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Azevedo et al., 2011). At least 90% of THg found in fish is present as methyl mercury (MeHg) (Malm et al., 1995; Kehrig et al., 1998).

Many studies conducted worldwide have shown that chronic exposure to MeHg, mainly during gestation and lactation, may impair fetus and infant neurodevelopment (Grandjean et al., 1997, Jensen et al., 2005; Castoldi et al., 2008). A provisional tolerable weekly intake (PTWI) for MeHg of 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw for women of child-bearing age, of 3.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw for the general population, including children, and a PTWI for THg of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw were established by the JECFA (WHO, 2004).

The consumption of fish has many beneficial effects on human health, being a source of high quality protein, B vitamins, minerals and long chain polyunsaturated fatty acids, including pre-formed omega-3 fatty acids (IOM, 2005). Fish intake is linked to lower risk of coronary heart disease, and to better offspring neurodevelopment during pregnancy and lactation (IOM, 2005; Daniels et al 2004). However, exposure of the

mother to MeHg could deprive the child of the benefits of fish borne nutrients (Fox et al., 2012).

Mean levels of mercury in breast milk worldwide are mostly within the range of 0.5 to 7 ng/mL (Gundacker et al., 2002; Al-Saleh et al., 2003; da Costa et al., 2005; Yalcin et al., 2010; Garcia-Esquinas et al., 2011). Factors that affect these levels include the mother's area of residence, active/passive smoking, anemia, and diet (Grandjean et al., 1995, Gundacker et al., 2002; Yaçın et al., 2010; Garcia-Esquinas et al., 2011). In most studies, milk samples were collected from each mother on a single occasion during lactation.

The objectives of this work were to study mercury excretion in breast milk over a 90-day lactation period and correlate the mercury levels in the breast milk with maternal food consumption for a low fish-eating population in Midwestern Brazil.

2. Material and methods

2.1 Study population

The study population was a sub-sample from a previous study which aimed to evaluate EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid) levels in breast milk samples of mothers who received a fish portion for consumption, and who were enrolled in an exercise protocol. The women were contacted through private maternity clinics in Brasilia, Brazil in 2002 and 2005 during their pre-natal follow-up. Sixty-three mothers agreed to enter the study, but 31 decided very early not to proceed. Of the 32 mothers who agreed to donate milk samples according to the project's protocol (during 90 days of lactation, 8 sampling days), only 18 completed the project (at least 4 sampling days). Inclusion criteria were: age between 20 and 40 years, body mass index before pregnancy between 20 and 30 kg/m², healthy, non-smokers, primiparous, breastfeeding exclusively, with a healthy infant born at term (38-41 weeks of gestation), and at least high school level of education. Maternal body weights and heights were measured at the residence according to the standardized protocol (Lohman, 1988). Infant weights at birth were obtained from the clinic's records. Infant weights (naked) were measured at 30, 60 and 90 days by a trained person using a paediatric Sohlene scale (nearest 10 g). Whenever the weight of any infant at any time was not available, it was estimated by adding the weight at birth and the mean weight gain for the period obtained for the other infants of the same sex.

The study was approved by the Ethics Committee on Human Studies from the University of Brasilia (Proj.120/09) and all participants signed the consenting form.

2.2. Breast milk samples

Breast milk samples (approx. 2 mL) were collected on the 15, 30, 45, 60, 74, 75, 76 and 90th day of lactation by hand expression into verified metal free glass vials on the morning prior (fore milk) and after (hind milk) breastfeeding. The participants were instructed to wash both hands and to clean the nipple with filtered water before collecting the samples. Samples were kept frozen in the mother's home freezer and transported in thermal boxes to the laboratory within a maximum of 15 days after collection, where they were maintained at -26°C until analysis.

Each mother was asked to annotate the time spent breastfeeding at each sampling point. The volume consumed by the infant was estimated assuming a milk flow of 13.5 mL/min (Mills and Tyler, 1992). The data were adjusted to not exceed 1100 mL/day for children up to 30 days of age and 1300 mL afterwards, according to the expected milk volume increase through lactation (da Costa et al., 2010; Mills and Tyler, 1992). When this information was not available, the volume was estimated based on the mean volume estimated for the other infants of the same sex, at each collection time.

2.3. Mercury analysis

Prior to analysis, the samples were defrosted at ambient temperature and the 2 samples from each mother for each day were combined and thoroughly homogenized. A 1 mL aliquot of the homogenized milk sample was transferred to a Teflon vessel, 2 mL of suprapur nitric acid 65% (Merck, USA) added, the system closed, and introduced into a Microwave DGT-100 (Provecto Systems, Brazil) for digestion. The digest was transferred to a 25 mL volumetric flask and diluted with nanopure water (Ultrapure Water System, Barnstead). Total mercury (THg) in the breast milk was quantified by atomic fluorescence spectrometry in a PSA 10.023 Merlin system (PS Analytical, Kemsig, Sevenoaks, UK) using a 2% stannous chloride solution as a reduction agent. Duplicate aliquots of each homogenized sample were digested and analyzed. A 1000mg/L mercury standard solution (Merck, Germany) was used to daily prepare standard curves in water in the range of 0.01 to 0.2 µg /L (5 points). The correlation

coefficient for each curve was always greater than 0.99. The performance of the method was verified with certified skim milk powder reference material containing 9.4 ± 1.7 ng/g THg (BCR®-150; Institute for Reference Material and Measurements, Belgium). The uncertainty estimated (0.94 ng/g, n=7) was within the acceptable limit provided by the manufacturer, with a coefficient of variation of 9.9 %. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were estimated based on the instrument response of a blank solution (B, n=10). LOD ($10 * B + 3sd$) was 0.26 ng/mL and LOQ ($10 * B + 8sd$) was 0.76 ng/mL.

2.4. Food intake

Participants of the study responded to a 24-hour dietary recall questionnaire on the 74th, 75th and 76th day of lactation. All data were carefully revised with each participant to ensure detailed and accurate dietary information. On the 75th day, a 200g ready-to-eat salmon portion (359 kcal, 17.5 g fat, 47.2 g protein, 0 g carbohydrate, 0.58 mg EPA and 1.9 mg DHA) was given to each mother to be consumed during lunch. The dietary data were transferred to the Nutrition Data Systems for Research software (NDSR; Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, USA). The usual intake was estimated after a within-person variability correction was applied on the data from the 74th and 76th day. The software PC-SIDE (Iowa State University, version 1.0) was used to transform and back-transform the dietary data based on Nusser et al (1996). A food frequency questionnaire (FFQ) was applied on the 90th day postpartum to obtain fish consumption information of the past 3 months, and daily fish consumption frequency was estimated. Discrete values for the frequency of consumption was 0.011 (1 day out of 90 days), 0.033 (1 day out of 30 days), and 0.143 (1 day out of 7 days).

2.5. Statistical analysis

Data were plotted on Microsoft Office EXCEL software (version 2007; Microsoft Corp, Redmond, WA, USA). SPSS version 20 was used for the non-parametric Spearman correlation tests between variables, and the significance level was set at $P < 0.05$. Multilevel mixed linear model analysis using SAS 9.2 was used to evaluate the behavior of mercury levels in breast milk over time.

3. Results

3.1. Mercury levels in human milk and infant exposure

The participants of the study were 20-39 years of age and, on average, gained 15.3 kg during pregnancy. The infants weighed, on average, 3.3 kg at birth, gaining 2.5 kg during the first 3 months of life (Table 1). Half the infants were male.

Table 1. Maternal and infant characteristics

	Mean \pm sd	Range
<i>Maternal (n=17).</i>		
Age (years)	27.3 \pm 5.0	20 - 39
Height (m)	1.63 \pm 0.06	1.54 - 1.75
Weight, <i>post-gestation</i> (kg)	80.4 \pm 8.8	69.6 - 100.1
Weight gain during gestation, kg	15.3 \pm 4.8	7.0 - 24.1
<i>Infant, 50% male</i>		
Weight at birth, kg (n=18)	3.3 \pm 0.4	2.8 - 3.9
Weight gain (0-90 days), kg (n=14)	2.5 \pm 0.7	1.6 – 3.5
Breastfeed volume, mL		
30 days (n=17)	935 \pm 203	500-1100
60 days (n=15)	1103 \pm 171	660-1300
90 days (n=13)	1261 \pm 73	1053-1300

Total mean mercury (THg) levels over the entire period (day 15 to day 90 post partum) for each mother ranged from <LOQ to 22.7 ng/mL, and the mean level for all samples (n=142) was 6.47 \pm 6.04 ng/mL (highest level of 25.5 ng/mL). Figure 1 shows the box plot of the data and the mean THg levels for the study period. Multilevel mixed linear model analysis showed that although there was a slight tendency for THg levels to increase during the period, this was not significant, mainly due to the high internal heterogeneity of the mercury levels for each mother. There was a significant correlation between maternal weight postpartum and THg at 15 days (p=0.018), and a marginal correlation (p=0.052) between maternal weight gain and THg at 15 days, but not between the weight after 15-90 days and the respective THg levels. No significant correlation was found between the infant weight at any time and the respective THg

levels, nor with infant weight gain during the first 90 days of life.

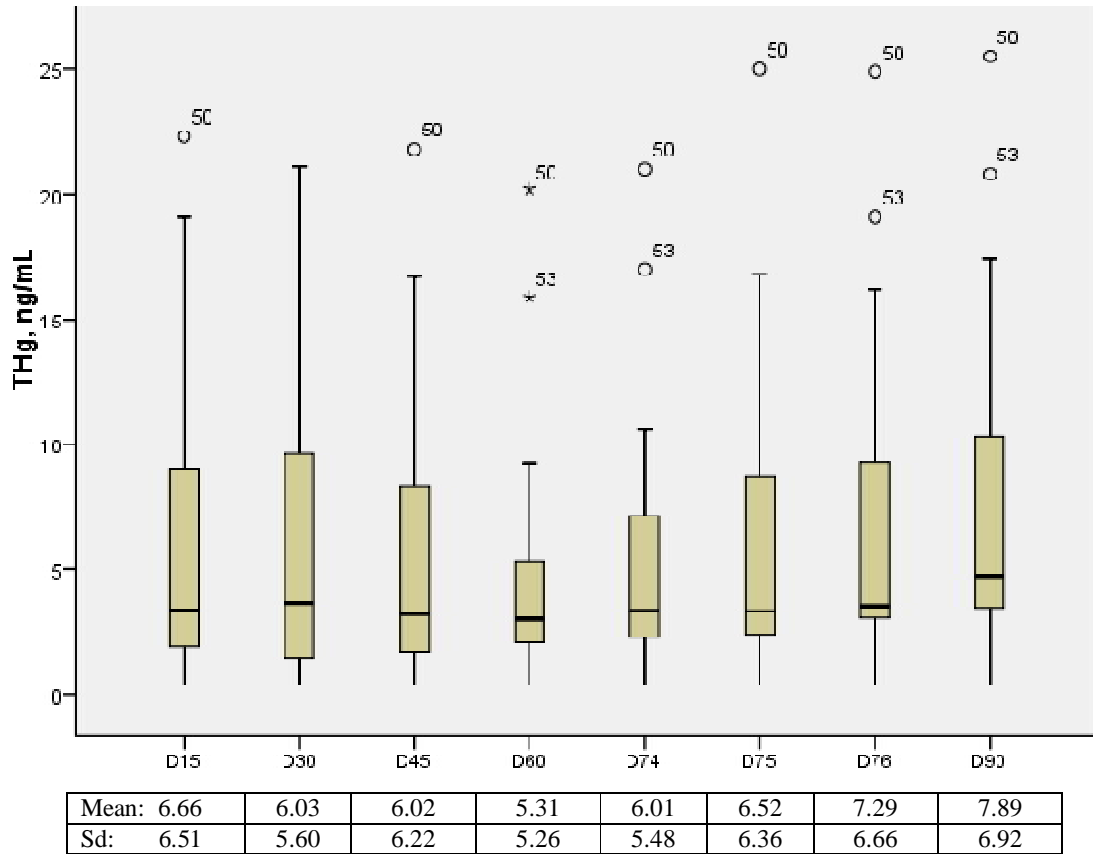


Figure 1. Breast milk total mercury concentration (THg) in the first 90 days of lactation in Brasilia, Brazil. Numbers of the outliers correspond to the mother's identification (ID): * severe outlier; ° moderate outlier

Figure 2 shows the daily exposure levels to THg of the infants of the 18 participating mothers during the first 3 months of lactation, expressed as % PTWI (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/week). Most (77.8%) had intakes exceeding the PTWI (> 100 %) at least once during the period. Seven infants had intakes exceeding the PTWI at 30, 60 and 90 day of lactation (between 140 and 813 % PTWI).

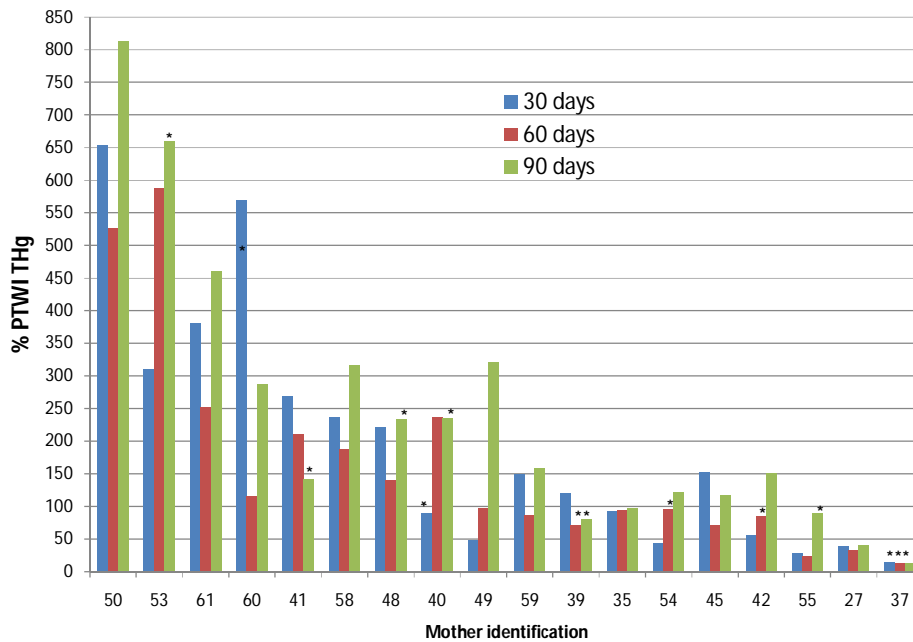


Figure 2. Infant daily exposure level to total mercury (THg) during breastfeeding, expressed in % of PTWI. *body weight and/or milk volume based on mean body weight gain during the period, and mean milk volume for infants of the same sex.

3.2. Maternal food consumption and nutrient intake

Dietary information is shown in Table 2. The mothers consumed mostly food from the fat and grain groups (over 7.5 portions/day), with a significant correlation between consumption and milk THg ($p=0.006$ and 0.007 , respectively). A significant correlation was also found between vegetable consumption and THg ($p= 0.015$). Carbohydrate, protein and fat intakes during lactation were appropriate for all mothers (IOM, 2005). Among macro and micronutrients, significant correlation was found only between mercury levels and carbohydrate intake ($p=0.045$).

The intake of DHA and EPA was low, reflecting low fish consumption by the studied population. FFQ data showed that one mother consumed no fish during the period of the study, eight mothers (47%) consumed fish at least once every three

months, 2 consumed 1-2 meals with fish per month. Two mothers consumed fish three times per week, and 4 mothers usually consume 1-2 meal per week containing fish. The mean daily fish consumption frequency was 0.1, with no correlation with THg levels in breast milk (Tables 2).

Table 2. Usual food group consumption and macro and micro nutrient intake of 17 participants and their correlation with total mercury milk levels.

	Mean	sd	Correlation	<i>p</i>*
Fat, servings	7.9	2.7	0.595	0.006
Grains, servings	7.5	0.85	0.586	0.007
Fruits, servings	4.02	1.7	-0.185	0.222
Vegetable, servings	2.5	0.7	0.554	0.015
Energy, kcal	2643	123	-0.194	0.228
Carbohydrate, g	334.4	40.0	0.424	0.045
Fat, g	105.8	8.5	0.093	0.361
Protein, g	93.5	4.3	0.068	0.398
Phosphorus, mg	1396	221	0.110	0.337
Zinc, mg	11.5	2.8	0.037	0.444
Copper, mg	2.1	1.1	-0.012	0.481
Vitamin C, mg	156.7	19.9	-0.199	0.222
DHA, mg	0.06	0.04	-0.03	0.455
EPA, mg	0.03	0.03	-0.106	0.343
Fish frequency, times/day	0.100	0.14	-0.027	0.914

sd= standard deviation; DHA= docosahexaenoic acid; EPA = eicosapentaenoic acid; * one tail

4. Discussion

THg levels in breast milk for mothers living in Brasilia (Midwestern Brazil) were similar ($p>0.05$) to those found previously in the city (5.73 ± 5.43 ng/g; da Costa et al., 2005) and in studies conducted in the Brazilian Amazon region (5.8 ± 5.9 ng/g; Barbosa & Dorea, 1998; Boishio & Henschel, 2000). These levels are higher than those

found in Turkey (3.42 ± 1.66 $\mu\text{g/L}$; Yalcin et al., 2010), Saudi Arabia (3.1 ± 4.0 $\mu\text{g/L}$; Al-Saleh et al., 2003), Austria (1.59 ± 1.21 $\mu\text{g/L}$; Gundacker et al., 2002), Spain (range between 0.45 and 0.62 $\mu\text{g/L}$; Garcia-Esquina et al., 2011) and Slovenia (mean of 0.3 ng/g, median of 0.2 ng/g; Miklavcic et al., 2011). Higher THg levels found in Brazil are probably due to the fact that the Brazilian ecosystem is naturally rich in mercury in comparison with other countries. About 50% of the THg levels in breast milk were found as MeHg by Orkarsson et al. (1996), while Miklavcic et al. (2011) found these to be, on average, 38% (P10=3%, P90=70%), a much lower rate than that found in mothers' hair (89%), and in cord blood (94%).

In this study, mercury levels in breast milk of most mothers did not show significant changes during the 15-90 day postpartum period. According to Dorea (2004), breast milk Hg concentrations are likely to be correlated with protein concentration, and may be higher in colostrums, which was not available in the present study. Indeed, Drexler and Schaller (1998) in Germany found higher levels of mercury in colostrums (mean of 1.37 ± 2.14 $\mu\text{g/L}$) than in 60-day postpartum milk (0.64 ± 1.46 $\mu\text{g/L}$). In Sweden, Björnberg et al. (2005) also found that THg in breast milk decreased significantly between 4 days (0.06–2.1 $\mu\text{g/L}$) and 6 weeks postpartum (0.07–0.37 $\mu\text{g/L}$), but remained unchanged thereafter (up to 13 weeks).

Various nutritional factors have been shown to modulate the toxicokinetics and dynamics of MeHg. In an extensive review of this topic, Chapman & Chan (2000) reported that wheat bran fiber alters MeHg demethylation by intestinal flora in mice, affecting mercury reabsorption and excretion. Passos et al. (2007) found, that for the same number of fish meals, Amazon riparians consuming fruit more frequently had significantly lower blood and hair-Hg concentrations, suggesting a possible protective effect of the fruit. Our study found a significant positive correlation between breast milk THg and the consumption of grain, fat and vegetable group portions (but not with fruit), in addition to carbohydrate intake. Gundacker et al. (2002) also found an association with cereal consumption. Mean background levels of mercury in cereals, grains and vegetables are mainly between 1 and 6 $\mu\text{g/kg}$ (Kwon et al., 2009; Meng et al., 2010; Chen et al., 2011). About half of the mercury found in rice grain, a staple food in Brazil, was shown to be present as MeHg in China (Meng et al., 2010). Gundacker et al. (2002) found that mothers with lower body weights (< 60kg) had significantly higher breast

milk mercury levels than the others, while our study showed a positive correlation between maternal body weights and mercury levels.

THg levels in breast milk were not associated with fish consumption in our low fish-eating population, similar to what was found in Austria with a population that consumes fish occasionally (Gundacker et al., 2002). Significant correlations, however, were found in high fish-eating populations, such as on the Faroe Islands (Grandjean et al., 1995), in Germany (Drexler and Schaller, 1998), and in Iran (Behroz et al., 2012). A study with a high fish-eating population in the Brazilian Amazon region showed that infant hair Hg was not significantly correlated with breast milk Hg but was with maternal hair Hg, indicating that the placenta plays a greater role in Hg transfer than milk, even in cases of prolonged breastfeeding (1.5 years) (Barbosa & Dorea, 1998). Sakamoto et al. (2002) reported that blood Hg levels in infants at 3 months of age were significantly lower than those at birth. Thus, exposure to mercury, especially high during gestation (Grandjean et al., 1998), indeed decreases during breastfeeding.

In the Faroe Islands cohort study, breastfeeding was not associated with deficits in neuropsychological performance measured for 7-year-old children who had a relatively high prenatal exposure to mercury (Jensen et al., 2005). Myers et al. (2009) found several associations between postnatal MeHg biomarkers and Seychelles children's developmental endpoints. However, no consistent pattern of association emerged to support a causal relationship.

The nutritional benefits of fish consumption need to be weighed against the possibility of adverse effects due to mercury exposure in high fish-eating populations (WHO, 2004). Grotto, et. al. (2010) found an association between mercury levels in blood and hair and oxidative stress in Amazon communities, but they also found a beneficial effect from fish consumption regarding the same end-point. In the United States, government authorities recommend that women of child-bearing age, nursing mothers, and young children do not consume fish with high mercury content, and not consume more than 340 g of other fish per week (US FDA, 2004). Lando et al. (2012) found that the targeted groups of women were aware of the FDA/EPA guidelines, however the mothers and their children may not be receiving the health benefits of eating a sufficient amount of fish, as nearly all of them consumed much less low-mercury fish per week than what is recommended. Our studied population also did not eat the recommended amount of fish, although the reasons are probably not related to

the awareness of possible mercury contamination, as there are no national guidelines regarding this issue in Brasil.

This study had some strengths and limitations that should be discussed. The main strength regards the number of samples taken from each mother during the period of the study, which allowed us to confirm that mercury excretion in milk 15 to 90 days postpartum does not change significantly in most cases. In this study, we were able to estimate individual volumes of milk consumed by the infants, leading to a more realistic estimation of the mercury intake during the period. In most published studies, this intake was calculated using a constant milk volume taken for all children.

A limitation of this study was the relatively low number of women that agreed to fully participate in the study. This was probably because the study involved the completion of many tasks, including registering the time spent breastfeeding, collecting milk samples at specific points in time, and completing dietary diaries. We also highlight that the women who participated in this study belonged to a specific strata of the population (primiparous, aged 20 to 40 years, body mass index before pregnancy between 20 and 30 kg/m², and at least high school level of education) and cannot be taken as representative of the entire population of the Federal District.

5. Conclusion

Mercury is a widespread element in nature and human exposure is inevitable. Mercury levels in breast milk in the low fish-eating population investigated in this study was correlated with fat, grains and vegetables, frequent ingredients in their diet, but not with fish. Although some studies have shown that *in utero* exposure to MeHg may impair fetus neurodevelopment, this adverse effect has not been proven in infants as a consequence of exposure during lactation. This study has shown that mercury intake by infants during lactation may exceed the toxicological safe exposure level (PTWI). However, we do believe that the benefits of lactation outweigh the eventual risks that this exposure may represent.

Acknowledgements

We would like to thank the CNPq (National Technological and Scientific Development Council) for providing a master's scholarship to L. R. Cunha. We would also like to thank Dr Alisia L Curriquiry for providing access to PC-Side used in the dietary

analysis, and Prof. Jurandir R. de Souza for his support during mercury analysis at the Laboratory of Analytical and Environmental Chemistry. We greatly appreciate the suggestions and comments provided by Prof. Jose G. Dorea and the help of Prof. Eduardo Freitas da Silva with the statistical analysis.

References

- Al-Saleh K, Shinwari N, Mashhour A. Heavy metal concentrations in the breast milk of Saudi women. *Biol.Trace Elem. Res.* 2003; 96:21-37.
- Azevedo JS, Braga ES, Favaro DT, Perretti AR, Rezende CE, Souza CM. Total mercury in sediments and in Brazilian Ariidae catfish from two estuaries under different anthropogenic influence. *Mar Pollut Bull.* 2011; 62(12):2724-31
- Barbosa AC, Dórea JG. Indices of mercury contamination during breast feeding in the Amazon Basin, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1998; 6:71–79..
- Behrooz RD, Esmaili-Sari A, Peer FE, Amini M. Mercury concentration in the breast milk of Iranian women. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 147:36-43.
- Berzas Nevado J.J., Rodriguez Martin-Doimeadios R.C., Guzman Bernardo F.J., Jimenez Moreno M., Herculano A.M., and do Nascimento J.L., et al. Mercury in the Tapajos River basin, Brazilian Amazon: a review. *Environ Int* 2010; 36(6): 593–608
- Björnberg KA, Vahter M, Berglung B, Niklasson B, Blennow M, Englung GS. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. *Environ Health Perspect.* 2005; 113:1381–1385.
- Boischio AA, Henshel DS. Linear regression models of methyl mercury exposure during prenatal and early postnatal life among riverside people along the upper Madeira river, Amazon. *Environ Res.* 2000 (Section A); 83:150 - 161.
- Botaro D, Torres JP, Schramm KW, Malm O. Mercury levels in feed and muscle of farmed tilapia. *Am J Indust Med.* 2012. doi: 10.1002/ajim.22021.
- Castoldi AF, Johansson C, Onishchenko N, Coccini T, Roda E, Vahter M. *et al.* Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008; 51: 201-214.
- Chapman L, Chan HM. The Influence of Nutrition on Methyl Mercury Intoxication. *Environ Health Perspect* 2000; 108(suppl 1):29-36.

- Chen C, Qian Y, Chen Q, Li C. Assessment of daily intake of toxic elements due to consumption of vegetables, fruits, meat, and seafood by inhabitants of xiamen, china. *J Food Sci.* 2011;76(8):T181-188.
- Daniels, J.L., Longnecker, M.P., Rowland, A.S., Golding, J., 2004. ALSPAC Study Team University of Bristol Institute of Child Health. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. *Epidemiology* 15 (4), 394–402.
- da Costa SL, Malm O, Dorea JG. Breast-milk mercury concentrations and amalgam surface in mothers from Brasília, Brazil. *Biological Trace Element Research* 2005; 106:145-151.
- da Costa THM, Haisma H, Wells JCK, Mander AP, Whitehead RG, and Bluck8 LJC. How much human milk do infants consume? Data from 12 countries using a standardized stable isotope methodology. *J Nutr.* 2010;140: 2027-2032.
- Dorea JG. Mercury and lead during breast-feeding. *Brit J Nut.* 2004; 92: 21–40.
- Drexler H, Schaller KH. The mercury concentration in breast milk resulting from amalgam fillings and dietary habits. *Envirom Res.* 1998;77: 124-129
- Fox DA, Grandjean P, de Groot D, Paule MG. Developmental origins of adult diseases and neurotoxicity: Epidemiological and experimental studies. *Neurotoxicology.* 2012 Jan 10. [Epub ahead of print]
- García-Esquinas E, Pérez-Gómez B, Fernández MA, Pérez-Meixeira AM, Gil E, de Paz C, Iriso A, Sanz JC, Astray J, Cisneros M, de Santos A, Asensio A, García-Sagredo JM, et al. Mercury, lead and cadmium in human milk in relation to diet, lifestyle habits and sociodemographic variables in Madrid (Spain). *Chemosphere* 2011; 85:268–276
- Grandjean P, Weihe P, Needham LL, Burse VW, Patterson DG Jr, Sampson EJ, Jørgensen PJ, Vahter M. Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic, and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environ Res.* 1995; 71:29-38.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sørensen N, Dahl R, Jørgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol.* 1997;19:417-28.
- Grotto D, Valentini J, Fillion M, Passos CJ, Garcia SC, Mergler D, Barbosa Jr F. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ.* 2010; 408:806-811.

- Gundacker C, Pietschnig B, Wittmann KJ, Lischka A, Salzer H, Hohenauer L, Schuster E. Lead and Mercury in Breast Milk. *Pediatrics*. 2002; 110:873-878.
- IOM. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients), Institute of Medicine. 2005. Site: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10490
- Jensen TK, Grandjean P, Jørgensen EB, White RF, Debes F, Weihe P. Effects of breast feeding on neuropsychological development in a community with methylmercury exposure from seafood. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2005;15:423-30.
- Jones G, Steketee RW, Black RE, Bhutta ZA, Morris SS; Bellagio Child Survival Study Group. How many child deaths can we prevent this year? *The Lancet* 2003; 362:65-71.
- Kehrig HA, Malm O, Akagi H, Guimaraes JRD, Torres JP.M. Methylmercury in Fish and Hair Samples from the Balbina Reservoir, Brazilian Amazon. *Environ Res* 1998; 77:84-90.
- Kwon YM, Lee HS, Yoo DC, Kim CH, Kim GS, Kim JA, Lee YN, Kim YS, Kang KM, No KM, Paek OJ, Seo JH, Choi H, Park SK, Choi DM, Kim DS, Choi DW. Dietary exposure and risk assessment of mercury from the Korean total diet study. *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(21-22):1484-1492
- Lando AM, Fein SB, Choinière CJ. Awareness of methylmercury in fish and fish consumption among pregnant and postpartum women and women of childbearing age in the United States. *Environ Res*. 2012;116:85-92.
- Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric Standardization Reference Manual. Champaign, IL: Human Kinetics; 1988.
- Lechlera PJ, Millerb JR, Lacerdac LD, Vinsond D, Bonzongoe J-C, Lyonsd WB, Warwicka JJ. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *The Science of the Total Environment*. 2000; 260: 87-96.
- Leon-Cava N, Lutter C, Ross J, Martin L. Quantifying the Benefits of Breastfeeding: A Summary of the Evidence. Food and Nutrition Program (HPN) of the Division of Health Promotion and Protection (HPP) of the Pan American Health Organization (PAHO). 2002. Available at <http://www.paho.org/English/AD/FCH/BOB-Main.htm>

- Malm O, Branches FJP, Akagi H, Castro MB, Pfeiffer WC, Haradac M, Bastosa WR, Katob H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. *Sci Total Environ* 1995; 175:141-150.
- Martin RM, Ben-Shlomo Y, Gunnell D, Elwood P, Yarnell JW, Davey Smith G. Breast feeding and cardiovascular disease risk factors, incidence and mortality: the Caerphilly study. *J Epidemiol Community Health*. 2005;59:121-9.
- Meng B, Feng X, Qiu G, Cai Y, Wang D, Li P, Shang L, Sommar J. Distribution patterns of inorganic mercury and methylmercury in tissues of rice (*Oryza sativa* L.) plants and possible bioaccumulation pathways. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(8):4951-4958.
- Miklavcic A, Cuderman P, Mazej D, Tratnik JS, Krsnik M, Planinsek P, Osredkar J, Horvat, M. Biomarkers of low-level mercury exposure through fish consumption in pregnant and lactating Slovenian women. *Environ.Res*. 2011; 111:1201–1207.
- Mills A, Tyler H. Food and nutrient intakes of British infants aged 6-12 months. HMSO, London, 1992.
- Myers GJ, Thurston SW, Pearson AT, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Cernichiari E, Clarkson TW. Postnatal exposure to methyl mercury from fish consumption: a review and new data from the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology*. 2009;30(3):338-49
- Nusser SM, Carriquiry AL, Dodd KW *et al*. A semiparametric transformation approach to estimating usual daily intake distributions. *J Am Stat Assoc* 1996;91:1440-49.
- Oskarsson A, Schültz A, Skerfving S, Hallén IP, Ohlin B, Lagerkvist BJ. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch Environ Health*. 1996;51(3):234-41.
- Passos CJS, Mergler D, Fillion M, Lemire M, Mertens F, Guimarães JRD, Philibert A. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ Res*. 2007; 105:183-193.
- Pettitt DJ, Forman MR, Hanson RL, Knowler WC, Bennett PH. Breastfeeding and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Pima Indians. *Lancet*. 1997; 350:166-168.
- Sakamoto M, Kubota M, Matsumoto S, Nakano A, Akag H. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. *Environ. Res*. 2002;90:185-189.

- Seixas TG, Moreira I, Malm O, Kehrig HA. Mercury and Selenium in a Top-Predator Fish, *Trichiurus lepturus* (Linnaeus, 1758), from the Tropical Brazilian Coast, Rio de Janeiro. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2012 May 22. [Epub ahead of print]
- US FDA. What You Need to Know About Mercury in Fish and Shellfish. US Food and Drugs Administration; US Environmental Protection Agency. 2004. Available at <http://www.fda.gov/downloads/Food/ResourcesForYou/Consumers/UCM182158.pdf>
- Yalçın SS, Yurdakök K, Yalçın S, Engür-Karasimav D, Coşkun T. Maternal and environmental determinants of breast-milk mercury concentrations. *Turk J Ped*. 2010; 52: 1-9
- Wilson AC, Forsyth JS, , Greene SA, Irvine L, Hau C, Howie PW. Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in Dundee infant feeding study. *BMJ*, 1998; 316:21-25.
- World Health Organization (WHO). WHO Technical Report Series. Methylmercury. Sixty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, Switzerland, 2004. Available from http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_922.pdf
- World Health Organization (WHO). Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Issued by UNEP DTIE Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, Geneva, Switzerland, 2008. Available from <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf>

5.4. Mercúrio total em leite humano de doadoras de bancos de leite do Distrito Federal.

As características das doadoras e das 100 amostras de leite incluídas neste estudo estão mostradas na Tabela 3. As doadoras tinham entre 16 e 47 anos e estavam entre o 1º e o 10º mês de lactação no momento da doação. Dados de hemoglobina e hematócrito da mãe, acidez e crematócrito do leite, e peso do bebê também foram coletados. De acordo com a OMS (2001) mulheres com valores de hemoglobina abaixo de 12 g/dL de sangue são classificadas como anêmicas, o que é o caso de 8 das 34 mulheres com este dado. Os níveis normais de hematócrito (acima de 33% glóbulos vermelhos no sangue) não foram atingidos por três destas mães, duas das quais também tiveram hemoglobina baixa. Almeida et al. (2006) avaliaram a densidade calórica (crematócrito) de leite humano disponível em bancos de leite do Distrito Federal, a média encontrada foi de 529 ± 85 kcal/L, valores semelhantes ao encontrado nesse estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Característica da população de amostras provenientes de bancos de leite do Distrito Federal

Parâmetro	Média	Dp	Faixa
Idade, anos (n=100)	29,46	6,02	16-47
Lactação, meses (n=100)	2,84	2,19	1-10
Peso do bebê (n=53)	3,17	0,47	2,4-4,8
Hemoglobina, g/dL (n=34)	12,66	1,05	10,5-14,9
Hematócrito, % (n=31)	36,6	5,7	12,2-43,9
Acidez leite, pH (n=55)	3,71	2,4	1-16,7
Crematócrito leite, kcal/L (n=52)	557	111	392-980

Em média, os níveis de THg nas 100 amostras de leite humano analisadas foi de $2,68 \pm 1,72$ ng/mL, com valores entre $<0,26$ ng/mL(1 amostra) e 7,2 ng/mL. A distribuição da concentração nas amostras do banco de leite analisadas está mostrada na Figura 6. Os valores individuais de cada amostra estão mostrados no Anexo 1.

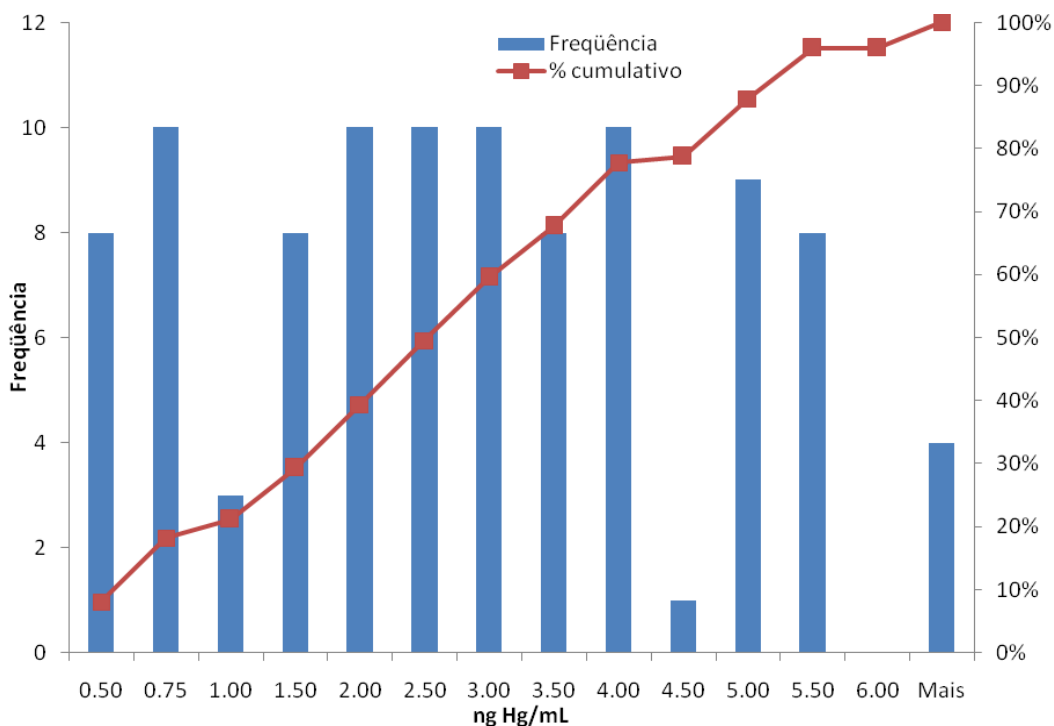


Figura 6. Distribuição dos níveis de THg nas 100 amostras de leite dos bancos de leite do Distrito Federal

A concentração média de THg encontrada em amostras de banco de leite (Grupo 2) foram inferiores às médias encontradas nas amostras do Grupo 1 (6.47 ± 5.8 ng/mL; 4.3. *Mercury concentration in breast milk and exposure assessment for the first 90 days of lactation in a Midwestern region of Brazil*). Apesar das amostras dos dois grupos terem sido coletadas em épocas diferentes (2002-2005 e 2011/2012, nos Grupos 1 e 2, respectivamente), não identificamos fatores que possam justificar estes resultados. Não

existem evidências de que o ambiente no Distrito Federal ou no Brasil tenha se alterado de maneira importante nos últimos 10 anos que levasse a um menor nível ambiental de mercúrio e presença nos alimentos. Apesar de as amostras do Grupo 1 terem sido analisadas 7-10 anos depois da coleta, as mesmas ficaram armazenadas a -25 °C sem descongelamento durante todo o período, e análise de frascos vazios utilizados na coleta dessas amostras não indicaram presença de mercúrio que impactasse nos níveis encontrados nas amostras.

A Tabela 4 mostra os níveis de THg de acordo com a região onde o banco de leite responsável pela coleta da amostra está localizado no DF. Teste ANOVA não detectou diferença estatística ($p= 0,411$) entre os valores encontrados nas regiões administrativas. É importante ressaltar que uma moradora de uma região pode ser doadora do banco de leite de outra região.

Tabela 4 – Concentração média de mercúrio em leite humano separado por regiões administrativas dos bancos de leite no Distrito Federal

Região administrativa	Média \pm dp, ng/mL
Asa sul (n=16)	1.94 \pm 0.96
Paranoá (n= 10)	2.09 \pm 1.69
Brazlândia (n= 11)	2.61 \pm 1.76
Taguatinga (n = 22)	2.61 \pm 1.59
Santa Maria (n = 7)	2.70 \pm 1.9
Asa norte (n=10)	2.86 \pm 1.84
Sobradinho (n=14)	3.35 \pm 2.01
Planaltina (n= 10)	3.76 \pm 1.78

Neste estudo, investigamos se existe alguma correlação entre as características da mãe, de seu bebê e do leite doado com os níveis de THg no leite (Tabela 5). Uma

correlação negativa significativa ($r^2 = -0,299$; $p=0,013$) foi encontrada somente entre a acidez do leite e THg. Como no caso das amostras do Grupo 1, não foi encontrada correlação significativa entre concentração de THg no leite com idade da mãe, peso do bebê ao nascer e período de lactação no momento da coleta.

Tabela 5. Correlação entre características maternas e peso do bebê com concentração de THg

	Correlação	P
Idade mãe (n=100)	0.062	0.269
Período de lactação (n=100)	-0.123	0.111
Hemoglobina mãe (n=34)	0.049	0.392
Hematócrito mãe (n=31)	0.104	0.289
Peso do bebê (n=53)	0.044	0.376
Acidez do leite (n= 55)	-0.299	0.013
Creatinina do leite (n=52)	0.072	0.307

O leite dos estoques de bancos de leite é consumido por bebês prematuros (abaixo de 36 semanas) e/ou de baixo peso (abaixo de 2,5 kg; OMS, 2010), e por recém nascidos cujo volume de leite produzido pela mãe não é suficiente para atender a demanda do bebê. Considerando um volume médio de leite humano consumido por crianças prematuras de 180 mL/kg/dia (Schanler, 1999) e o peso corpóreo de 2,5 kg, encontramos que a concentração máxima de THg que um leite pode conter para que a ingestão (Eq. 1) não ultrapasse o PTWI (5 $\mu\text{g}/\text{kg pc}$ ou 0,71 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{dia}$; WHO, 2004) é de 3.9 ng/mL. Nesse estudo, 20% das amostras dos bancos de leite do Distrito Federal analisadas apresentam níveis de THg acima deste valor, o que indica que o consumo do leite dessas mães doadoras pode representar um risco para a saúde dos bebês. É importante ressaltar, porém, que o consumo deste leite é vital para a recuperação do estado nutricional e da saúde dos bebês prematuros e de baixo peso, benefícios que superam os potenciais riscos advindos da exposição a mercúrio.

CONCLUSÃO

Nesse estudo, a metodologia analítica para análise de THg em leite humano por Espectrometria de Fluorescência Atômica por Vapor Frio (CVAFS) foi otimizada e satisfatoriamente validada. O método apresentou um limite de detecção (LOD) de 0,26 ng/mL, e a menor concentração de THg que pode ser determinada com uma precisão e exatidão aceitável (LOQ) corresponde a 0,76 ng/mL.

As concentrações médias de THg encontradas nos dois grupos de amostras de leite humano de mulheres residentes no Distrito Federal analisados estão acima do encontrado na média mundial, mas próximos de estudos realizados em Brasília e na região amazônica. Estes níveis refletem a ocorrência natural do mercúrio no ecossistema brasileiro, ou seja, a exposição a esse metal é inevitável. As amostras provenientes de bancos de leite coletadas em 2011/2012 apresentaram níveis menores que os encontrados nas amostras de leite coletadas de mães entre 2002 e 2005, porém não se conseguiu identificar razões para esta diferença.

Os resultados deste estudo mostraram que os níveis de mercúrio em leite humano não se alteraram de maneira significativa entre os dias 15 e 90 de lactação, indicando uma excreção constante deste metal pela mãe durante o período. Foi encontrada correlação positiva entre níveis de mercúrio e consumo de grãos, gorduras e vegetais, alimentos comuns na dieta no Distrito Federal e no Brasil, mas não com consumo de peixe, pouco consumido pela população em estudo. O consumo de uma porção de salmão no 74º dia de lactação aparentemente não alterou significativamente os níveis de mercúrio encontrados posteriormente no leite, mesmo que em algumas mães nota-se discreto aumento.

Apesar da ingestão de mercúrio ter ultrapassado o parâmetro toxicologicamente seguro (PTWI) ao longo da lactação para a maioria das crianças que potencialmente consumiram o leite materno, deve-se avaliar os riscos e os benefícios da amamentação. O leite humano é a principal fonte de macro e micronutrientes e seu consumo exclusivo deve ser incentivado para crianças até os seis meses de idade e como forma complementar até os dois anos. As fontes de exposição a mercúrio na dieta identificadas neste estudo são principalmente os grãos, gorduras e vegetais, e o Distrito Federal não é uma região com evidente contaminação antropogênica por mercúrio. Desta maneira, nenhuma ação de gestão para diminuir a exposição materna é recomendada e o risco da presença de mercúrio no leite não supera os benefícios da amamentação.

4. REFERENCIAS

- Al-Saleh K, Shinwari N, Mashhour A. Heavy metal concentrations in the breast milk of Saudi women. *Biol.Trace Elem. Res.* 2003; 96:21-37.
- A Summary of the Evidence. Food and Nutrition Program (HPN) of the Division of Health Promotion and Protection (HPP) of the Pan American Health Organization (PAHO), 2002. Available at <http://www.paho.org/English/AD/FCH/BOB-Main.htm>
- Almeida SG, Dórea JG. Quality control of banked milk in Brasilia, Brazil. *J Hum Lact.* 2006 Aug;22(3):335-9.
- Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A, Mohamed Gel D, Rabah A. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *Int J Hyg Environ Health.* 2011 Mar;214(2):79-101. Epub 2010 Nov 18.
- Ashe K. Elevated Mercury Concentrations in Humans of Madre de Dios, Peru. *PLoS One.* 2012;7(3):e33305. Epub 2012 Mar 16.

- Agency for Toxic Substances and Disease Toxicological profile of mercury. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, 1999. pp. 235-262, 410-476.
- Akyildiz BN, Kondolot M, Kurtoğlu S, Konuşkan B. Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets byneutron activation analysis. *J Trace Elem Med Biol.* 1997 (3):129-36.
- Axelrad DA, Bellinger DC, Ryan LM, Woodruff TJ. Dose-response relationship of prenatal mercury exposure and IQ: an integrative analysis of epidemiologic data. *Environ Health Perspect.* 2007 Apr;115(4):609-15. Epub 2007 Jan 11.
- Azevedo JS, Braga ES, Favaro DT, Perretti AR, Rezende CE, Souza CM. Total mercury in sediments and in Brazilian Ariidae catfish from two estuaries under different anthropogenic influence. *Mar Pollut Bull.* 2011; 62(12):2724-31
- Barbosa AC, Dórea JG. Indices of mercury contamination during breast feeding in the Amazon Basin. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1998 Oct;6(2):71-9.
- Barghi M, Behrooz RD, Esmaili-Sari A, Ghasempouri SM. Mercury Exposure Assessment in Iranian Pregnant Women's Hair with Respect to Diet, Amalgam Filling, and Lactation. *Biol Trace Elem Res.* 2012 Mar 15
- Behrooz RD, Esmaili-Sari A, Peer FE, Amini M. Mercury concentration in the breast milk of Iranian women. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 147:36-43.
- Berzas Nevado J.J., Rodriguez Martín-Doimeadios R.C., Guzman Bernardo F.J., Jimenez Moreno M., Herculano A.M., and do Nascimento J.L., et al. Mercury in the Tapajos River basin, Brazilian Amazon: a review. *Environ Int* 2010; 36(6): 593–608

- Birkett JW, Noreng JM, Lester JN. Spatial distribution of mercury in the sediments and riparian environment of the River Yare, Norfolk, UK. *Environ Pollut.* 2002;116(1):65-74.
- Björnberg KA, Vahter M, Berglung B, Niklasson B, Blennow M, Englung GS. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. *Environ Health Perspect.* 2005; 113:1381–1385.
- Boischio AA, Henshel DS. Linear regression models of methyl mercury exposure during prenatal and early postnatal life among riverside people along the upper Madeira river, Amazon. *Environ Res.* 2000 (Section A); 83:150 - 161.
- Bose-O'Reilly S, McCarty KM, Steckling N, Lettmeier B. Mercury exposure and children's health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2010 Sep;40(8):186-215.
- Botaro D, Torres JP, Schramm KW, Malm O. Mercury levels in feed and muscle of farmed tilapia. *Am J Indust Med.* 2012. doi: 10.1002/ajim.22021.
- Britton C, McCormick FM, Renfrew MJ, Wade A, King SE. Support for breastfeeding mothers (Review). in *The Cochrane Library* 2007, Issue 4
- Bruce P, Minkinen P, Riekkola ML. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. *Mikrochim. Acta* 128, 93-106 (1998)
- Cai Y. Atomic Fluorescence in Environmental Analysis in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry.* R.A. Meyers (Ed.) pp. 2270–2292, 2000
- Carta P, Flore C, Alinovi R, Ibba A, Tocco MG, Aru G, Carta R, Girei E, Mutti A, Lucchini R, Randaccio FS. Sub-clinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of mercury exposure through fish consumption. *Neurotoxicology.* 2003 Aug;24(4-5):617-23.
- Castaño A, Sánchez-Rodríguez JE, Cañas A, Esteban M, Navarro C, Rodríguez-García AC, Arribas M, Díaz G, Jiménez-Guerrero JA. Mercury, lead and cadmium levels in

- the urine of 170 Spanish adults: a pilot human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215(2):191-5. Epub 2011 Oct 2.
- Castoldi AF, Johansson C, Onishchenko N, Coccini T, Roda E, Vahter M. et al. Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008; 51: 201-214.
- Chapman L, Chan HM. The Influence of Nutrition on Methyl Mercury Intoxication. *Environ Health Perspect* 2000; 108(suppl 1):29-36.
- Chen C, Qian Y, Chen Q, Li C. Assessment of daily intake of toxic elements due to consumption of vegetables, fruits, meat, and seafood by inhabitants of xiamen, china. *J Food Sci*. 2011;76(8):T181-188.
- Cohen JT, Bellinger DC, Connor WE, Shaywitz BA. A quantitative analysis of prenatal intake of n-3 polyunsaturated fatty acids and cognitive development. *Am J Prev Med*. 2005 Nov;29(4):366-74.
- Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;198(2):209-30.
- da Costa SL, Malm O, Dorea JG. Breast-milk mercury concentrations and amalgam surface in mothers from Brasília, Brazil. *Biological Trace Element Research* 2005; 106:145-151.
- da Costa THM, Haisma H, Wells JCK, Mander AP, Whitehead RG, and Bluck8 LJC. How much human milk do infants consume? Data from 12 countries using a standardized stable isotope methodology. *J Nutr*. 2010;140: 2027-2032.

- do Valle CM, Santana GP, Augusti R, Egreja Filho FB, Windmüller CC. Speciation and quantification of mercury in Oxisol, Ultisol, and Spodosol from Amazon (Manaus, Brazil). *Chemosphere*. 2005 Feb;58(6):779-92.
- Daniels, J.L., Longnecker, M.P., Rowland, A.S., Golding, J., 2004. ALSPAC Study Team University of Bristol Institute of Child Health. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. *Epidemiology* 15 (4), 394–402.
- Dórea JG, Bezerra VL, Fajon V, Horvat M. Speciation of methyl- and ethyl-mercury in hair of breastfed infants acutely exposed to thimerosal-containing vaccines. *Clin Chim Acta*. 2011;412(17-18):1563-6. Dorea JG. Mercury and lead during breast-feeding. *Brit J Nut*. 2004; 92: 21–40.
- Drexler H, Schaller KH. The mercury concentration in breast milk resulting from amalgam fillings and dietary habits. *Environ Res*. 1998;77: 124-129
- Durão Júnior WA, Palmieri HE, Trindade MC, de Aquino Branco OE, Filho CA, Fleming PM, da Silva JB, Windmüller CC. Speciation, distribution, and transport of mercury in contaminated soils from Descoberto, Minas Gerais, Brazil. *J Environ Monit*. 2009;1056-63. Epub 2009 Mar 9.
- Egler SG, Rodrigues-Filho S, Villas-Bôas RC, Beinhoff C. Evaluation of mercury pollution in cultivated and wild plants from two small communities of the Tapajós gold mining reserve, Pará State, Brazil. *Sci Total Environ*. 2006 368(1):424-33.
- Fadini, P. S, Jardim, W.F. (2001). Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? *The Science of the Total Environment* 275: 71-82.

- Fávaro DI, Hui ML, Cozzolino SM, Maihara VA, Armelin MJ, Vasconcellos MB, Yuyama LK, Boaventura GT, Tramonte VL. Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets by neutron activation analysis. *J Trace Elem Med Biol.* 1997 (3):129-36.
- Fong BM, Siu TS, Lee JS, Tam S. Determination of mercury in whole blood and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2007 Jun;31(5):281-7
- Fox DA, Grandjean P, de Groot D, Paule MG. Developmental origins of adult diseases and neurotoxicity: Epidemiological and experimental studies. *Neurotoxicology.* 2012; 33(4): 810-816.
- García-Esquinas E, Pérez-Gómez B, Fernández MA, Pérez-Meixeira AM, Gil E, de Paz C, Iriso A, Sanz JC, Astray J, Cisneros M, de Santos A, Asensio A, García-Sagredo JM, et al. Mercury, lead and cadmium in human milk in relation to diet, lifestyle habits and sociodemographic variables in Madrid (Spain). *Chemosphere* 2011; 85:268–276
- Gibicar D, Logar M, Horvat N, Marn-Pernat A, Ponikvar R, Horvat M. Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra(n-propyl)borate as derivatizing agent. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388(2):329-40.
- Gil C, Ramos-Miras J, Roca-Pérez L, Boluda R. Determination and assessment of mercury content in calcareous soils. *Chemosphere.* 2010 ;78(4):409-15
- Goyer RA, Clarkson, TW. Toxic Effects of Metals. Cassarett & Doull's Toxicologi. The Basic Science of Poisons. Curtis D. Klaassen ed. Sixth Edition. McGraw-Hill, 2001.
- Grandjean P, Weihe P, Needham LL, Burse VW, Patterson DG Jr, Sampson EJ, Jørgensen PJ, Vahter M. Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic,

- and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environ Res.* 1995; 71:29-38.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sørensen N, Dahl R, Jørgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol.* 1997;19:417-28.
- Grandjean P, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P. Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *J Pediatr.* 2004;144(2):169-76.
- Grandjean P. Methylmercury toxicity and functional programming. *Reprod Toxicol.* 2007;23(3):414-20.
- Greenwood MR, Clarkson TW, Doherty RA, Gates AH, Amin-Zaki L, Elhassani S, Majeed MA. Blood clearance half-times in lactating and nonlactating members of a population exposed to methylmercury. *Environ Res.* 1978;16(1-3):48-54.
- Grimaldi C., Guedron S., and Grimaldi M., 2008. Mercury distribution in tropical soil profiles related to origin of mercury and soil processes. *Science of the Total Environment*, 401, pp 121-129
- Grotto D, Valentini J, Fillion M, Passos CJ, Garcia SC, Mergler D, Barbosa Jr F. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ.* 2010; 408:806-811.
- Gundacker C, Pietschnig B, Wittmann KJ, Lischka A, Salzer H, Hohenauer L, Schuster E. Lead and Mercury in Breast Milk. *Pediatrics.* 2002; 110:873-878.
- Gundacker C, Fröhlich S, Graf-Rohrmeister K, Eibenberger B, Jessenig V, Gicic D, Prinz S, Wittmann KJ, Zeisler H, Vallant B, Pollak A, Husslein P. Perinatal lead and mercury exposure in Austria. *Sci Total Environ.* 2010;408(23):5744-9.

- Hursh JB, Cherian MG, Clarkson TW, Vostal JJ, Mallie RV. Clearance of mercury (HG-197, HG-203) vapor inhaled by human subjects. *Arch Environ Health*. 1976; 31(6):302-9.
- Institute of Medicine (IOM). *Seafood Choices: Balancing Benefits and Risks*, 2007
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. Documento de caráter orientativo – revisão 03. 2010. 20p.
- IOM. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)*, Institute of Medicine. 2005. Site: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10490
- Jardim ANO, Caldas, ED. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*, 2009; 32:1898 - 1909.
- Jarosinska D, Gee D. Children's environmental health and the precautionary principle. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210(5):541-6. Jensen TK, Grandjean P, Jørgensen EB, White RF, Debes F, Weihe P. Effects of breast feeding on neuropsychological development in a community with methylmercury exposure from seafood. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2005;15:423-30.
- Jones G, Steketee RW, Black RE, Bhutta ZA, Morris SS; Bellagio Child Survival Study Group. How many child deaths can we prevent this year? *The Lancet* 2003; 362:65-71.
- Kehrig HA, Malm O, Akagi H, Guimaraes JRD, Torres JP.M. Methylmercury in Fish and Hair Samples from the Balbina Reservoir, Brazilian Amazon. *Environ Res* 1998; 77:84-90.

- King JK, Kostka JE, Frischer ME, Saunders FM. Sulfate reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2000 ;66(6):2430-7
- Kwon YM, Lee HS, Yoo DC, Kim CH, Kim GS, Kim JA, Lee YN, Kim YS, Kang KM, No KM, Paek OJ, Seo JH, Choi H, Park SK, Choi DM, Kim DS, Choi DW. Dietary exposure and risk assessment of mercury from the Korean total diet study. *J Toxicol Environ Health A.* 2009;72(21-22):1484-1492
- LaKind JS, Brent RL, Dourson ML, Kacew S, Koren G, Sonawane B, Tarzian AJ, Uhl K. Human milk biomonitoring data: interpretation and risk assessment issues. *Human milk biomonitoring data: interpretation and risk assessment issues*
- Lando AM, Fein SB, Choinière CJ. Awareness of methylmercury in fish and fish consumption among pregnant and postpartum women and women of childbearing age in the United States. *Environ Res.* 2012;116:85-92.
- Lechlera PJ, Millerb JR, Lacerdac LD, Vinsond D, Bonzongoe J-C, Lyonsd WB, Warwick JJ. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *The Science of the Total Environment.* 2000; 260: 87-96.
- Lima AP, Sarkis JE, Shihomatsu HM, Müller RC. Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do PiriáMunicipality, ParáState, Brazil. *Environ Res.* 2005 Mar;97(3):236-44
- Liu R, Wang Y, Shan C, Ling M, Shan H. Release of Mercury from Intertidal Sediment to Atmosphere in Summer and Winter. *Chin. Geogra. Sci.* 2010 20(2) 099–105
- Lohman TG, Roche AF, Martorell R. *Anthropometric Standardization Reference Manual.* Champaign, IL: Human Kinetics; 1988.

- Lucas A, Brooke OG, Morley R, Cole TJ, Bamford MF. Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study. *BMJ*. 1990;300(6728):837-40
- Malm O, Branches FJP, Akagi H, Castro MB, Pfeiffer WC, Haradac M, Bastosa WR, Katob H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. *Sci Total Environ* 1995; 175:141-150.
- Mandel D, Lubetzky R, Dollberg S, Barak S, Mimouni FB. Fat and energy contents of expressed human breast milk in prolonged lactation. *Pediatrics*. 2005 Sep;116(3):e432-5.
- Martin RM, Ben-Shlomo Y, Gunnell D, Elwood P, Yarnell JW, Davey Smith G. Breast feeding and cardiovascular disease risk factors, incidence and mortality: the Caerphilly study. *J Epidemiol Community Health*. 2005;59:121-9.
- Martin, CA et al . Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 19, n. 6, Dec. 2006
- Mason RP, Fitzgerald WF, Morel FMM. The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 58, No. 15, p p. 3191-3198, 1994
- Maurice-Bourgoin L, Quiroga I, Chincheros J, Courau P. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. *Sci Total Environ*. 2000 Oct 9;260(1-3):73-86.
- Meng B, Feng X, Qiu G, Cai Y, Wang D, Li P, Shang L, Sommar J. Distribution patterns of inorganic mercury and methylmercury in tissues of rice (*Oryza sativa* L.) plants and possible bioaccumulation pathways. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(8):4951-4958.

- Miklavcic A, Cuderman P, Mazej D, Tratnik JS, Kršnik M, Planinsek P, Osredkar J, Horvat, M. Biomarkers of low-level mercury exposure through fish consumption in pregnant and lactating Slovenian women. *Environ.Res.* 2011; 111:1201–1207.
- Mills A, Tyler H. Food and nutrient intakes of British infants aged 6-12 months. HMSO, London, 1992.
- Müller AK, Westergaard K, Christensen S, Sørensen SJ. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001 Jun;36(1):11-19.
- Myers GJ, Thurston SW, Pearson AT, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Cernichiari E, Clarkson TW. Postnatal exposure to methyl mercury from fish consumption: a review and new data from the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology.* 2009;30(3):338-49
- Neville MC, Allen JC, Archer PC, Casey CE, Seacat J, Keller RP, Lutes V, Rasbach J, Neifert M. Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis. *Am J Clin Nutr.* 1991 Jul;54(1):81-92.
- Nusser SM, Carriquiry AL, Dodd KW et al. A semiparametric transformation approach to estimating usual daily intake distributions. *J Am Stat Assoc* 1996;91:1440-49.
- Oliveira RC, Dórea JG, Bernardi JV, Bastos WR, Almeida R, Manzatto AG. Fish consumption by traditional subsistence villagers of the Rio Madeira (Amazon): impact on hair mercury. *Ann Hum Biol.* 2010 Sep-Oct;37(5):629-42.
- Oskarsson A, Schültz A, Skerfving S, Hallén IP, Ohlin B, Lagerkvist BJ. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch Environ Health.* 1996;51(3):234-41.

- Palmieri HE, Nalini HA Jr, Leonel LV, Windmüller CC, Santos RC, de Brito W. Quantification and speciation of mercury in soils from the Tripuí Ecological Station, Minas Gerais, Brazil. *Sci Total Environ.* 2006 Sep 1;368(1):69-78.
- Passos CJS, Mergler D, Fillion M, Lemire M, Mertens F, Guimarães JRD, Philibert A. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ Res.* 2007; 105:183-193.
- Pettitt DJ, Forman MR, Hanson RL, Knowler WC, Bennett PH. Breastfeeding and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Pima Indians. *Lancet.* 1997; 350:166-168.
- Pichichero ME, Gentile A, Giglio N, Alonso MM, Fernandez Mentaberri MV, Zareba G, Clarkson T, Gotelli C, Gotelli M, Yan L, Treanor J. Mercury levels in premature and low birth weight newborn infants after receipt of thimerosal-containing vaccines. *J Pediatr.* 2009 Oct;155(4):495-9. Epub 2009 Jun 26.
- Pinheiro MC, Crespo-López ME, Vieira JL, Oikawa T, Guimarães GA, Araújo CC, Amoras WW, Ribeiro DR, Herculano AM, do Nascimento JL, Silveira LC. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. *Environ Int.* 2007 Jan;33(1):56-61. Epub 2006 Aug 22.
- Polak-Juszczak L. Bioaccumulation of mercury in the trophic chain of flatfish from the Baltic Sea. *Chemosphere.* 2012 Jun 14.
- Ramirez GB, Cruz MC, Pagulayan O, Ostrea E, Dalisay C. The Tagum study I: analysis and clinical correlates of mercury in maternal and cord blood, breast milk, meconium, and infants' hair. *Pediatrics.* 2000 Oct;106(4):774-81.

- Räsänen L, Mutanen M. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation*. 1995 92(8):2355-6.
- Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 2000 Jun;108 Suppl 3:511-33.
- Risher JF, De Rosa CT. Inorganic: the other mercury. *J Environ Health*. 2007 Nov;70(4):9-16
- Sakamoto M, Kubota M, Matsumoto S, Nakano A, Akag H. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. *Environ. Res*. 2002;90:185-189.
- Salthammer T, Uhde E, Omelan A, Lüdecke A, Moriske HJ. Estimating human indoor exposure to elemental mercury from broken compact fluorescent lamps (CFLs). *Indoor Air*. 2011 Dec 2011
- Schuster PF, Krabbenhoft DP, Naftz DL, Cecil LD, Olson ML, Dewild JF, Susong DD, Green JR, Abbott ML. Atmospheric mercury deposition during the last 270 years: a glacial ice core record of natural and anthropogenic sources. *Environ Sci Technol*. 2002 Jun 1;36(11):2303-10
- Seixas TG, Moreira I, Malm O, Kehrig HA. Mercury and Selenium in a Top-Predator Fish, *Trichiurus lepturus* (Linnaeus, 1758), from the Tropical Brazilian Coast, Rio de Janeiro. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2012 May 22. [Epub ahead of print]
- Syversen T, Kaur P. The toxicology of mercury and its compounds. *J Trace Elem Med Biol*. 2012 Jun 2

Tack FM, Vanhaesebroeck T, Verloo MG, Van Rompaey K, Van Ranst E. Mercury baseline levels in Flemish soils (Belgium). *Environ Pollut*. 2005 Mar;134

Tian W, Egeland GM, Sobol I, Chan HM. Mercury hair concentrations and dietary exposure among Inuit preschool children in Nunavut, Canada. *Environ Int*. 2011 Jan;37(1):42-8. Epub 2010 Jul 31.

Thurston SW, Bovet P, Myers GJ, Davidson PW, Georger LA, Shamlaye C, Clarkson TW. Does prenatal methylmercury exposure from fish consumption affect blood pressure in childhood? *Neurotoxicology*. 2007 Sep;28(5):924-30. Epub 2007 Jun 16.

Tomiyasu T, Okada M, Imura R, Sakamoto H. Vertical variations in the concentration of mercury in soils around Sakurajima Volcano, Southern Kyushu, Japan. *Sci Total Environ*. 2003;304(1-3):221-30

Ullrich, Susanne M., Tanton, Trevor W. and Abdrashitova, Svetlana A. (2001) Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31, (3), 241-293.

United Nations Environment Programme (UNEP). Global Mercury Assessment. December, 2002

United States Environmental Protection Agency (EPA). Results of the Lake Michigan Mass Balance Study: Atrazine Data Report, 2001

US FDA. What You Need to Know About Mercury in Fish and Shellfish. US Food and Drugs Administration; US Environmental Protection Agency. 2004. Available at <http://www.fda.gov/downloads/Food/ResourcesForYou/Consumers/UCM182158.pdf>

Vahter M, Akesson A, Lind B, Björs U, Schütz A, Berglund M. Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environ Res*. 2000 Oct;84(2):186-94.

van Wijngaarden E, Beck C, Shamlaye CF, Cernichiari E, Davidson PW, Myers GJ, Clarkson TW. Benchmark concentrations for methyl mercury obtained from the 9-year follow-up of the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology*. 2006 Sep;27(5):702-9. Epub 2006 Jun 2.

Vieira LM, Nunes Vda S, Amaral MC, Oliveira AC, Hauser-Davis RA, Campos RC. Mercury and methyl mercury ratios in caimans (*Caiman crocodilus yacare*) from the Pantanal area, Brazil. *J Environ Monit*. 2011 Feb;13(2):280-7. Epub 2010 Nov 22.

Wilson AC, Forsyth JS, Greene SA, Irvine L, Hau C, Howie PW. Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in Dundee infant feeding study. *BMJ*, 1998; 316:21-25.

World Health Organization (WHO). Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Issued by UNEP DTIE Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, Geneva, Switzerland, 2008.

World Health Organization (WHO). Iron Deficiency Anaemia Assessment, Prevention, and Control A guide for programme managers, 2001

World Health Organization (WHO). Children's health and environment: a review of evidence, Environmental issue report no 29, 2002

World Health Organization (WHO). WHO Technical Report Series. Methylmercury. Sixty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, Switzerland, 2004.

World Health Organization (WHO). Exposure to mercury: a major public health concern, 2007

World Health Organization (WHO). Mercury: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels. Environmental Burden of Disease Series, No. 16, 2008

Yalçin SS, Yurdakök K, Yalçin S, Engür-Karasimav D, Coşkun T. Maternal and environmental determinants of breast-milk mercury concentrations. Turk J Ped. 2010; 52: 1-9

Yorifuji T, Tsuda T, Inoue S, Takao S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of Minamata, Japan. Environ Int. 2011 Jul;37(5):907-13. Epub 2011 Apr 5.

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética da FS ao projeto com amostras de leite de
nutrizes do DF – Grupo 1



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: 120/09

Título do Projeto: “Chumbo, mercúrio e cádmio em leite de nutrizes no Distrito Federal correlações com a dieta materna e a composição do leite”.

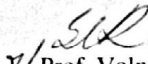
Pesquisador Responsável: Leandro Rodrigues da Cunha

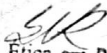
Data de Entrada: 14/10/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 120/09 com o título: “Chumbo, mercúrio e cádmio em leite de nutrizes no Distrito Federal correlações com a dieta materna e a composição do leite”, analisado na 10ª Reunião Ordinária, realizada no dia 10 de novembro de 2009.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 08 de abril de 2010.


Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB


Comitê de Ética em Pesquisa
com Seres Humanos - CEP/FS

APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, da pesquisa *Determinação da concentração de chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e cádmio (Cd) em leite humano de nutrizes assistidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB)*.

. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assinie ao final deste documento.

Informações sobre a pesquisa:

O leite humano é fundamental para a saúde do bebê fornecendo todos os nutrientes necessários para seu crescimento e desenvolvimento e deve ser o único alimento oferecido até os seis meses de idade. O motivo que nos leva a estudar esse tema é a preocupação em avaliar a exposição aos metais tóxicos cádmio, chumbo e mercúrio a qual os bebês estão expostos durante o processo de amamentação, portanto o objetivo desse projeto é determinar as concentrações desses metais em leite humano.

O procedimento de coleta de amostra será realizado por profissional responsável e obedecendo as seguintes etapas: 1) orientação para correta limpeza da mamas onde será retirado o leite; 2) armazenamento da amostra de leite em frasco próprio; 3) tampar, identificar com data e horário da retirada e armazenamento da amostra dentro da geladeira para conservação e mantimento da temperatura. Para a pesquisa, a própria lactente irá coletar aproximadamente 05mL de leite nos dias 15, 30, 45, 60, 75 e 90 da lactação.

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento, bastando para isso comunicar sua decisão a um dos responsáveis pelo projeto.

A sua participação é voluntária e sua recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão e você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. A produção desse documento será realizado em duas vias, das quais ficará com a participante e a outra em posse do Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília (UnB). Os resultados obtidos serão parte integrante da tese de mestrado do aluno Leandro Rodrigues da Cunha e poderão ser divulgados em artigos científicos e meios de comunicação.

**ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética da FS ao projeto com amostras de Banco
de Leites do DF – Grupo 2**



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **027/11**

Título do Projeto: “Avaliação da exposição de crianças à micotoxinas e metais pesados através do consumo de leite materno”.


Pesquisadora Responsável: Patrícia Diniz Andrade

Data de Entrada: 01/04/11

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **027/11** com o título: “Avaliação da exposição de crianças à micotoxinas e metais pesados através do consumo de leite materno”, analisado na 3ª Reunião Ordinária, realizada no dia 12 de abril de 2011.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 13 de abril de 2011.


Prof. Natália Monsore
Coordenador do CEP-FS/UnB

APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa realizada na Universidade de Brasília em parceria com a Rede de Bancos de Leite do Distrito Federal. O objetivo deste estudo é avaliar a presença de micotoxinas e metais no leite materno.

A participação no estudo inclui o consentimento da doação de parte de uma amostra de leite coletada para a Rede de Banco de Leite do Distrito Federal e o fornecimento de dados tais como: idade, data do parto, data da coleta da amostra e endereço. O material coletado durante a pesquisa ficará sob a responsabilidade de Patrícia Diniz Andrade, no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília.

Os resultados obtidos auxiliarão no desenvolvimento de ações preventivas relacionadas ao controle da presença destas substâncias nos alimentos e serão publicados em artigos científicos.

- **O presente trabalho não representa nenhum risco à sua saúde.**
- **Sua participação será sigilosa, ou seja, em nenhum momento da pesquisa seu nome será divulgado.**
- **Você poderá optar por não fornecer algum dado solicitado;**
- **Sua participação não é obrigatória, podendo desistir de participar da pesquisa a qualquer momento.**

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone da pesquisadora principal e do Comitê de Ética em Pesquisa, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Caso você concorde em participar, favor assinar o termo de consentimento abaixo.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome da voluntária:

Data: ____/____/____

Na última semana, você consumiu amendoim, paçoca ou outros produtos de amendoim? ____ Sim ____ Não

Na última semana, você consumiu castanha-do-pará ou outros produtos derivados da castanha? ____ Sim ____ Não

Assinatura: _____

Nome da pesquisadora responsável: Patrícia Diniz Andrade

Assinatura: _____

Contatos: Patrícia Diniz Andrade - 0XX61 – 31072117/82270751 ou no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos na UnB – 0XX61-31071947

**APÊNDICE 3 - Resultados individuais das amostras de leite humano dos bancos de
leite do Distrito Federal**

Amostra	THg, ng/mL	Amostra	THg, ng/mL	Amostra	THg, ng/mL
1	5,14	35	1,58	69	4,71
2	1,45	36	2,47	70	3,27
3	3,77	37	0,67	71	1,64
4	0,69	38	3,26	72	0,59
5	2,36	39	0,45	73	2,69
6	0,39	40	3,98	74	0,77
7	5,15	41	1,48	75	4,68
8	6,14	42	3,64	76	0,39
9	2,19	43	2,63	77	2,16
10	2,82	44	3,20	78	2,69
11	5,15	45	2,90	79	3,41
12	1,62	46	1,11	80	1,10
13	3,03	47	2,28	81	2,44
14	0,67	48	0,58	82	1,95
15	4,52	49	3,03	83	< LOD
16	6,76	50	1,00	84	4,95
17	4,59	51	0,60	85	1,99
18	1,41	52	2,15	86	1,22
19	0,39	53	2,70	87	3,98
20	3,60	54	1,32	88	0,36
21	0,43	55	0,73	89	6,10
22	5,35	56	0,32	90	4,81
23	2,10	57	2,92	91	2,80
24	0,72	58	4,31	92	0,47
25	3,49	58	3,54	93	3,66
27	1,14	60	0,63	94	1,62
27	4,70	61	2,06	95	1,87
28	5,36	62	3,77	96	0,89
29	1,71	63	4,65	97	5,20
30	2,91	64	1,63	98	5,10
31	0,60	65	2,95	99	1,87
32	5,02	66	7,22	100	3,59
33	2,12	67	4,74		
34	3,22	68	3,74		