

# AFLATOXINAS EM ALIMENTOS DESTINADOS A BOVINOS E EM AMOSTRAS DE LEITE DA REGIÃO DE LAVRAS, MINAS GERAIS – BRASIL

## Detection of aflatoxins in diary cattle feed and milk in Lavras, Minas Gerais - Brazil

Maria Marlúcia Gomes Pereira<sup>1</sup>, Eliana Pinheiro de Carvalho<sup>2</sup>, Guilherme Prado<sup>3</sup>, Carlos Alberto da Rocha Rosa<sup>4</sup>, Thaís Veloso<sup>5</sup>, Leandro Augusto Ferreira de Souza<sup>5</sup>, Jéssika Mara Martins Ribeiro<sup>6</sup>

### RESUMO

A aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) tem sido detectada em leite de animais alimentados com ração contaminada por aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), possuindo efeitos tóxicos e carcinogênicos muito próximos. Constitui-se um problema de Saúde Pública, pois sua toxicidade é preocupante, quando os indivíduos mais jovens estão entre os maiores consumidores de leite e estes são os mais sensíveis a seus efeitos. O objetivo deste trabalho foi determinar a presença de aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e de AFM<sub>1</sub> em amostras de leite cru e após pasteurização. Trabalhou-se inicialmente com 12 produtores de leite, permanecendo apenas 2 produtores que apresentavam valores significativos de aflatoxina M<sub>1</sub>. A coleta de leite foi realizada 24 h após a coleta do alimento. O método utilizado para a detecção de aflatoxinas no alimento foi a cromatografia em camada delgada. A determinação de AFM<sub>1</sub> em leite foi realizada empregando-se coluna de imunoafinidade para a purificação e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Não foram detectadas aflatoxinas nas amostras de ração. Entretanto, detectou-se AFM<sub>1</sub> em 19 (52,8%) das 36 amostras de leite cru, em valores que variaram de traços a 74,1 ng L<sup>-1</sup>. Em leite pasteurizado, a AFM<sub>1</sub> foi detectada em 13 (38,2%) das 34 amostras, em níveis que variaram desde traços a 58,9 ng L<sup>-1</sup>. Os valores encontrados de aflatoxina no leite estão dentro dos padrões tolerados pela legislação brasileira. As concentrações de aflatoxina nos leites cru e pasteurizado não diferiram entre si (p>0,05). O fato de não se ter detectado aflatoxinas na ração pode ser explicado pela sua ocorrência em baixas concentrações, isto é, inferiores ao limite de detecção do método utilizado (2 µg/Kg), o que não impediria o aparecimento da AFM<sub>1</sub> no leite e a detecção mediante metodologia mais sensível (2 ng/L).

**Termos para indexação:** aflatoxina M<sub>1</sub>, leite, alimento.

### ABSTRACT

The M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) aflatoxin has been detected in milk from animal fed with aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) contaminated ration, with close toxic and carcinogenic effects. This is a potential a health public problem, because young individuals are among the greater milk consumers and more sensible to their effects. This study was developed to determine the aflatoxins presence in ration and AFM<sub>1</sub> in raw and pasteurized milk. Twelve milk producers were used, and only two presented significant aflatoxin M<sub>1</sub> values in milk. Milk samples were taken 24 hours after the collection of the ration. The method used for the aflatoxins detection was a thin layer in silica 60 G chromatography. For determination of AFM<sub>1</sub> in milk, the immunoaffinity column method was used for purification, with subsequent detection by reverse phase HPLC. The aflatoxins were not detected in ration samples, with the quantification limit being 2 µg Kg<sup>-1</sup>. In milk samples, where the quantification limit was much lower (2 ng L<sup>-1</sup>), AFM<sub>1</sub> was detected in 19 (52,8%) from 36 raw milk samples in trace values of about 74.1 ng L<sup>-1</sup>. In pasteurized milk, the AFM<sub>1</sub> was detected in 13 (38,2%) from 34 samples, in trace values of about 58.9 ng L<sup>-1</sup>. The aflatoxin concentrations found are within tolerated standard according to Brazilian legislation. There was no difference among the aflatoxin concentration in raw and pasteurized milk.

**Index Terms:** aflatoxin M<sub>1</sub>, milk, feed.

(Recebido para publicação em 12 de Janeiro de 2004 e aprovado em 13 de agosto de 2004)

### INTRODUÇÃO

A estimativa da produção de leite no Brasil referente ao ano de 2003 foi de 21,30 bilhões de litros

(NOGUEIRA NETTO, 2003). O consumo *per capita* em litros/hab, 127,14. O consumo de lácteos no Brasil é considerado muito abaixo do recomendado pela OMS - Organização Mundial de Saúde.

1. Professora Adjunta do Departamento de Morf. Veterinária/CCA – Universidade Federal do Piauí – Teresina, PI – marlucia@ufpi.br

2. Professora Adjunta do Departamento de Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Lavras/ UFLA – Caixa Posta 3037 – Lavras, MG.

3. Pesquisador 3, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG.

4. Professor Titular do Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

5. Bolsista, CNPq, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG.

6. Médica Veterinária, bolsista CAPES, aluna de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

O preconizado por esse Órgão é de 175 litros de lácteos equivalente litros por habitante (CONSUMO..., 2002).

A contaminação de alimentos humanos e animais com fungos e produção de micotoxinas representam perdas econômicas bastante significativas, além de representar riscos à saúde.

A produção de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> pode ocorrer por 3 espécies de fungos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e, o mais raro, *Aspergillus nomius*. As três espécies são produtoras de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, entretanto, citações sobre a produção de aflatoxina G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> por cepas de *A. flavus* são bem recentes. A aflatoxina B<sub>1</sub> é considerada o mais potente hepatocarcinogênico para mamíferos (CREPPY, 2002).

O estudo sobre a presença de micotoxinas em leite apresenta relevante importância. A primeira pesquisa sobre micotoxinas teve início no ano de 1960. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas têm sido as mais pesquisadas em leite e seus derivados. A presença de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite se deve à presença aflatoxina B<sub>1</sub> no alimento destinado ao consumo animal. Seu efeito crônico que é evidenciado pelo aparecimento de carcinoma hepático é bastante preocupante.

As aflatoxinas são primariamente metabolizadas por um misto de funções oxidases (MFO) no fígado. Tais enzimas são responsáveis pelo metabolismo oxidativo de um grande número de xenobióticos (BIEHL e BUCK, 1987). A absorção gastrointestinal é a primeira etapa de entrada da aflatoxina M<sub>1</sub> na corrente sanguínea. Após a absorção gastrointestinal, esta é transportada pelo sangue, podendo se ligar as suas células ou proteínas plasmáticas (TAVEIRA e MÍDIO, 1999).

A taxa de conversão de AFB<sub>1</sub> em ração animal para AFM<sub>1</sub> no leite está em torno de 0,3 a 6,2% (CREPPY, 2002). Para Oliveira e Germano (1997), a imprecisão dos valores de conversão da AFB<sub>1</sub> em AFM<sub>1</sub> reforça a importância da realização de análises rotineiras no leite e em seus derivados como fator imprescindível para o controle da ocorrência de AFM<sub>1</sub>.

A ingestão diária aceitável de aflatoxina M<sub>1</sub> é de 6,8 ng/pessoa/dia na Europa; 3,5 ng/pessoa/dia na América Latina; 12 ng/pessoa/dia no Extremo Oriente e 0,7 ng/pessoa/dia na África (CREPPY, 2002).

Pesquisas realizadas no Brasil quanto à presença de AFM<sub>1</sub> em leite, apresentam valores variados para o leite cru e pasteurizado. Os valores encontrados apresentam-se entre 30 e 2920 ng/L (SABINO et al., 1988; SOUZA, 1997; PRADO et al., 1999). O Ministério da Saúde por meio da RDC nº 12/2002 estabele-

ce como tolerância máxima de AFM<sub>1</sub> 500 ng/L (BRASIL, 2002).

Face à importância da detecção deste metabólito em alimento, esta pesquisa visa quantificar a presença de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos destinados a bovinos e aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru e após pasteurização.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras de alimentos destinados a bovinos

Amostras de aproximadamente 1 Kg foram coletadas em fazendas da Região Sul de Minas Gerais, Brasil. Foram analisadas um total de 33 amostras, correspondendo a 18 amostras de ração, 2 de milho, 4 de farelo de soja, 6 de silagem de milho e 3 de capim.

Realizou-se a coleta das amostras 24 horas antes da coleta do leite, sendo as mesmas armazenadas em geladeira a +/- 7°C. Analisou-se apenas as amostras de alimento destinadas a bovinos às quais, as amostras de leite correspondente apresentaram detecção de AFM<sub>1</sub>.

### Determinação de aflatoxinas em amostras de alimentos destinados a bovinos

- **Preparo e determinação das soluções padrões de aflatoxinas**

Foi realizado segundo o método descrito pela AOAC (1998). A quantificação foi realizada por cromatografia em camada delgada empregando-se os padrões de AF B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> da Sigma Chemical Company. A concentração dos padrões foi determinada pelo método da AOAC (1998).

- **Preparo das amostras**

As amostras de silagem e capim foram previamente moídas e homogeneizadas em liquidificador, de modo a se obter partículas pequenas em torno de 1mm. As amostras de ração, milho e farelo de soja já trituradas, foram então passadas em peneira de aproximadamente 0,84 mm (20 mesh).

- **Extração das toxinas**

A metodologia utilizada para a quantificação das toxinas foi a descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) e o limite de detecção de 2µg/Kg.

Foram pesados 50 g das amostras, em duplicata, em Erlenmeyer de 500 mL. Adicionaram-se 270 mL de metanol e 30 mL de KCl 4%. Em seguida, o material foi agitado em shaker/agitador por 30 minutos e filtrado em papel de filtro comum e em papel de filtro Whatman nº 4 ou similar e foram recolhidos 150 mL.

- **Purificação do extrato**

Transferiu-se alíquotas de 150 mL do extrato para um béquer de 600 mL, ao qual adicionaram-se 150 mL de sulfato de cobre a 10% (farelo de soja, silagem de milho e capim) ou sulfato de amônio 30% (milho e ração) e 50 mL de celite para todas as amostras. Em seguida, foi filtrado em papel Whatman nº 4 ou similar e foram recolhidos 150 mL em uma proveta de 250 mL.

- **Partição líquido-líquido**

Transferiu-se a alíquota de 150 mL para um funil de separação de 500 mL com torneira de teflon e tampa de polietileno, contendo 150 mL de água destilada. Realizaram-se duas extrações com 10 mL de clorofórmio sob agitação vigorosa por 3 minutos. Após separação das fases, recolheu-se o extrato em um béquer de 25 mL, do qual se retirou 6 mL.

- **Concentração e diluição**

O extrato clorofórmio foi evaporado em banho-maria, sob atmosfera de nitrogênio, sendo posteriormente solubilizado conforme a amostra, com 100 a 500 µL de solução de benzeno:acetoneitrila (98:2). Em seguida, o extrato seco foi acondicionado em freezer.

- **Identificação e quantificação**

A identificação e a quantificação das aflatoxinas foram realizadas em placa de cromatografia de sílica gel 60G, cromatofolha 20x20 cm, sem indicador de fluorescência, 0,25 mm de espessura, em luz ultravioleta (366 nm).

### **Coleta das amostras de leite**

Foram coletadas 36 amostras de leite cru. As coletas foram realizadas inicialmente com 12 produtores e depois permaneceram apenas com dois produtores, os quais apresentaram valores significativos de AFM<sub>1</sub> nas primeiras análises.

### **Tratamento das amostras de leite**

As amostras de leite foram avaliadas quanto a quantidade de aflatoxina M<sub>1</sub> no leite cru e após o tratamento térmico. A temperatura utilizada foi 63 °C +/- 2 por 30 minutos.

### **Teste de recuperação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru**

A metodologia utilizada foi a descrita por Tuinstra et al. (1993), mediante a qual foram utilizadas co-

lunas de imunoafinidade para purificação das amostras e CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) para determinação da aflatoxina M<sub>1</sub>. As concentrações de AFM<sub>1</sub> utilizadas foram: 0,0, 40,0, 80,0 e 120,0 ng/L com duas repetições. O limite de quantificação do método é 6,0 ng/L e o de detecção 2 ng/L e traços correspondem ao intervalo entre 2 e 6 ng/L.

### **Determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite**

- **Preparo da solução padrão de aflatoxina M<sub>1</sub>**

Utilizou-se o padrão da Sigma Chemical Company dissolvido em benzeno:acetoneitrila (90:10) para obter uma concentração de aflatoxina M<sub>1</sub> em torno de 10 µg/mL (AOAC, 1998).

- **Purificação das amostras de leite em coluna de imunoafinidade**

As amostras foram aquecidas em banho-maria até atingir 37 °C +/- 1 °C. Após o aquecimento, centrifugaram-se 100 mL de cada amostra a 3578 g por 15 min. Filtrou-se a amostra em papel de filtro Whatman nº 4.

Retirou-se 50 mL da amostra para uma proveta ou Erlenmeyer. Uma alíquota de 10 mL de leite do sobrenadante foi transferida para uma seringa adaptada à coluna de imunoafinidade AFLA- M<sub>1</sub> (Vicam) eluindo-se sem aplicação de vácuo. Após a eluição de toda a amostra (não se deixou secar), a coluna foi lavada com 10 mL de água ultrapura colocando aos poucos ± 2 mL. Esgotou-se por completo toda a água empregando-se o vácuo. Foram transferidos para a coluna 4 mL de acetoneitrila ficando em contato com a coluna de 6 a 7 minutos, e então, recolheu-se o eluato para um frasco âmbar de 5 mL. O eluato foi evaporado até completa secura em banho-maria 50°C sob fluxo de nitrogênio.

Após a secagem, a amostra foi ressuspensa imediatamente em 200 µL da fase móvel de injeção (água:acetoneitrila 70:30). Agitou-se em seguida em agitador de tubos e filtrou-se em membrana de celulose regenerada de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro para um pequeno frasco âmbar com auxílio de uma seringa de insulina tipo longa.

- **Condições cromatográficas**

A separação e quantificação da AFM<sub>1</sub> foram conduzidas em um sistema de cromatografia Shimadzu com detector de fluorescência (excitação: 366 nm e emissão 428 nm), coluna de fase reversa C18 (250x4,6 mm) com partículas de 5 µm, guarda-coluna C18 (25x4,6 mm), loop de 20 µL (injeção 20 µL), fluxo 1,0 mL/minuto,

fase móvel: água: isopropanol:acetonitrila (80:12:8), filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  a vácuo. O tempo de retenção nessas condições foi de aproximadamente 10 minutos.

- **Preparo da curva de calibração da aflatoxina  $M_1$**

Foram injetadas alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  das soluções padrões de aflatoxina  $M_1$  com concentrações na faixa de 0,15 a 0,30 ng/mL, nas condições cromatográficas descritas em 4.5.3.

Construiu-se o gráfico da área versus massa de aflatoxina  $M_1$  injetada, e verificou-se a linearidade da curva de calibração, em que:  $r^2 \geq 0,99$ .

- **Determinação da aflatoxina  $M_1$  no extrato da amostra**

Foram injetadas alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra purificado, usando as mesmas condições cromatográficas utilizadas na elaboração da curva de calibração.

Identificou-se o pico da aflatoxina  $M_1$  da solução da amostra por comparação com o tempo de retenção obtido na injeção das soluções padrões da aflatoxina  $M_1$ .

- **Cálculo**

Com base na curva de calibração, calculou-se a massa de aflatoxina  $M_1$  pela equação da reta através de regressão linear do Programa Excel-E.

### **Análises estatísticas**

A análise estatística foi realizada mediante o teste não paramétrico. Utilizou-se o Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney, o qual foi realizado pela "aproximação normal" (CAMPOS, 1983).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em todas as 33 amostras de alimento animal analisadas não foi detectada a presença de aflatoxinas, no entanto, detectou-se a presença de  $AFM_1$  no leite. Os percentuais de conversão de  $AFB_1$  para  $AFM_1$  encontrados por alguns autores variam de 0,03% a 6,2% (CREPPY, 2002; TRUCKSESS et al., 1983). O maior teor de  $AFM_1$  encontrado foi de 74,1 ng/L (Tabela 1); considerando que este valor representa em torno de 1,2  $\mu\text{g}$  de  $AFB_1$ , ou seja, o valor de  $AFB_1$  presente no alimento está bem abaixo do limite de detecção do método utilizado.

Na Tabela 1 estão expressos os valores médios de  $AFM_1$  em leite cru e leite com tratamento térmico.

Após o tratamento térmico observou-se uma redução média de 15,6% da  $AFM_1$ , considerando as amostras em que foi detectada presença da  $AFM_1$  em quantidade  $\geq$  ao limite de quantificação; no entanto, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos.

No leite cru (Tabela 1) em 19 amostras (52,8%) foi detectada a presença da  $AFM_1$ , com os valores variando de traços a 74,1 ng/L; em 17 amostras (47,22%) não foi detectada aflatoxina. No leite pasteurizado a presença de aflatoxina foi detectada em 13 amostras (38,2%) e os seus valores variaram de traços a 58,9 ng/L; e em 21 amostras (61,76%) não foi detectada aflatoxina. Os valores obtidos estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação que estabelece como padrão 500 ng/L (BRASIL, 2002).

Os valores de recuperação pelo método de CLAE (4.4) apresentaram um percentual de 95,4%, 82,1% e 87,8%. A recuperação deve ser de no mínimo 70% para nível de aflatoxina  $M_1 > 50$  ng/L, o que demonstrou que o método e as condições empregadas estavam dentro dos padrões esperados. Prado et al. (1999) utilizando CLAE, encontraram valores de recuperação variando de 88,9% a 104,9%, e as médias de recuperação encontradas por Souza (1997) utilizando CCD em três métodos para purificação do extrato (cartucho de sílica gel, cartucho de florissil e colunas de florissil) estavam entre 60,0 e 127,4%, em que 58,0% destes valores estavam acima de 90,0%; 32,0% entre 71,0 e 90,0% e apenas 10,0% apresentaram-se com valores menores ou iguais a 70%. Os valores obtidos neste trabalho foram superiores ao mínimo estabelecido e aceitável (CEN, 1999).

Em produtos alimentícios e rações animais analisadas por Sabino et al. (1988) em um total de 974 amostras, 93,2% não apresentaram contaminação por aflatoxinas. Do total de amostras, as rações representavam 276 das quais, em 89,6% não foi detectada a presença de aflatoxinas.

Entre as várias pesquisas de  $AFB_1$  em alimentos destinados ao consumo animal no Brasil, observa-se uma grande variedade dos dados, ou seja, valores de 0 até 7400 ppb, o que demonstra a necessidade de uma vigilância constante para garantir a qualidade do alimento (SALAY e MERCADANTE, 2002).

Para Scussel e Rodriguez-Amaya (1984), a confiabilidade dos resultados analíticos na determinação de micotoxinas é preocupante, tendo em vista vários fatores, como a distribuição não uniforme das micotoxinas nos alimentos e rações animais, as baixas concentrações, em que os níveis encontrados estão em  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e ainda a presença de interferentes.

**TABELA 1** – Valores médios de aflatoxina AFM<sub>1</sub> em amostras de leite cru e pasteurizado da região de Lavras, Sul de Minas Gerais.

Amostras	Leite	
	Cru AFM <sub>1</sub> (ng/L)	Pasteurizado AFM <sub>1</sub> (ng/L)
1	traços	nd
2	traços	nd
3	nd	nd
4	35,0	36,9
5	22,4	23,8
6	nd	nd
7	nd	nd
8	nd	nd
9	nd	nd
10	6,2	traços
11	nd	nd
12	nd	nd
13	65,0	58,9
14	74,1	57,6
15	45,9	44,6
16	nd	nd
17	traços	nd
18	traços	nd
19	nd	traços
20	6,8	traços
21	nd	nd
22	nd	nd
23	nd	nd
24	nd	nd
25	nd	nd
26	nd	nd
27	nd	nd
28	traços	nd
29	8,3	7,1
30	nd	nd
31	27,2	18,8
32	28,4	24,6
33	26,8	-
34	48,5	-
35	26,5	16,1
36	26,5	25,9

**nd: não detectado; limite de detecção: 2 ng/L; limite de quantificação 6 ng/L; traços: entre 2 e <6 ng/L**

A estabilidade da aflatoxina no leite tem sido pesquisada e os resultados apresentam discordância entre os vários pesquisadores. Stoloff et al. (1975) e Egmond (1983) não observaram redução da AFM<sub>1</sub> após pasteurização do leite. Os primeiros autores trabalharam com leite artificialmente contaminado em tempo e temperatura de 62°C/30 minutos e o segundo, com leite naturalmente contaminado. Purchase et al. (1972) observaram uma redução de 32% da AFM<sub>1</sub> mediante uma temperatura de 62°C /30 minutos. A redução foi de 45 e 64% quando o leite foi submetido à temperatura de 72 e 80 °C por 45 segundos, respectivamente. A redução foi proporcional ao aumento da temperatura, mesmo quando ocorreu a redução do tempo de exposição ao tratamento.

No leite após a pasteurização, a taxa de redução encontrada por Kiermeier e Buchner (1977) foi de 6 a 13%. Resultado similar que constatou uma redução de 5 a 17%, com uma média de 7,62%, não havendo, no entanto, diferença significativa entre o leite cru e o pasteurizado; tais valores são próximos ou similares aos encontrados neste experimento.

### CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- a) Nas amostras de alimentos analisadas destinadas a bovinos não foi detectada a presença de AFB<sub>1</sub>.
- b) A presença de aflatoxina M<sub>1</sub> foi constatada em 52,8% das amostras de leite e todas encontravam-se dentro do limite máximo permitido pela legislação brasileira.
- c) As concentrações de AFM<sub>1</sub> nos leite cru e pasteurizado não diferiram entre si.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington, 1998. v. 2, cap. 49, p. 49-53.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 50, n. 12, p. 1058-73, Dec. 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVS. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 out. 2002.

CAMPOS, H. de. Testes de posição aplicáveis a duas amostras independentes. In: \_\_\_\_\_. **Estatística experimental não paramétrica**. 4. ed. Piracicaba: ESALQ, 1983. p. 113-139.

CONSUMO de lácteos no Brasil. Disponível em: <<http://www.fnp.com.br/foldia2/pecuaria/leiteb/200802.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2002.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, n. 1/2, p. 1-10, Jan. 2002.

EGMOND, H. P. van. Mycotoxins in dairy products. **Food Chemistry**, Barking, v. 11, p. 289-307, 1983.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDISATION. **CEN report: food analysis-biotoxins: criteria of analytical methods for mycotoxins**. [S.l.], 1999. 8 p.

KIEREMIER, F.; BUCHNER, M. Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> in whey and curd during cheese processing. **Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Freising, v. 164, n. 2, p. 82-86, 1977.

NOGUEIRA NETTO, V. Inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. In: \_\_\_\_\_. **Removendo obstáculos para o crescimento exploração de lácteos no Brasil**. São Paulo: Milkbuzz, 2003. cap. 5, p. 71-82.

OLIVEIRA, C. A. F. de.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 48, p. 22-25, mar./abr. 1997.

PRADO, G. et al. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite consumido na cidade de Belo Horizonte- Minas Gerais/Brasil- agosto/98 à abril/99. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 420-423, set./dez. 1999.

PURCHASE, I. F. H. et al. Reduction of aflatoxin M content of milk by processing. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 383-387, 1972.

SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B<sub>1</sub> em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, n. 1/2, p. 81-85, jan./jun. 1988.

- SALAY, E.; MERCADANTE, Z. M. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for private sector to control the level of contamination. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 87-92, Mar. 2002.
- SCUSSEL, V. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação comparativa de métodos analíticos para a triagem e quantificação de aflatoxinas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 206-216, 1984.
- SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some brasilian foods by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, n. 1, p. 22-26, Jan./Feb. 1989.
- SOUZA, S. V. C. **Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite**: metodologia e ocorrência no Estado de Minas Gerais. 1997. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.
- STOLOFF, L. et al. Stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 12, p. 1789-1793, Dec. 1975.
- TAVEIRA, J. de A.; MÍDIO, A. F. Aflatoxina M<sub>1</sub>- A micotoxina do leite. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 115-126, jan./jun. 1999.
- TRUCKSESS, M. W. et al. Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in blood and milk of cows given aflatoxin B<sub>1</sub>. **American Journal of Veterinary Research**, Washington, v. 44, n. 9, p. 1753-1756, 1983.
- TUINSTRRA, L. G. M.; ROOS, A. H.; TRIJP, J. M. P. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 76, n. 6, p. 1248-1254, Nov./Dec. 1993.