

Otimização de metodologia por CCD para determinação de aflatoxina M₁ em leite de cabra e investigação de sua ocorrência no Estado da Bahia

Optimization of methodology by TLC for determining aflatoxin M₁ in goat's milk and investigation of its occurrence in the State of Bahia

RIALA6/1039

Mariana B. BOTURA¹, Monica M.S. SIMAS¹, Myrna SABINO², Maria José M. BATATINHA^{1*}

* Endereço para correspondência: Escola de Medicina Veterinária /UFBA. Av. Adhemar de Barros, 500, 40170-110, Ondina, Salvador-Bahia; e-mail: mjmb@ufba.br

¹ Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia

² Instituto Adolfo Lutz-SP

Recebido: 26/09/2005 – Aceito para publicação: 28/12/2005

RESUMO

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um produto da biotransformação da aflatoxina B₁, a qual é excretada no leite de animais que ingerem alimentos contaminados. Os objetivos deste trabalho foram otimizar o método por cromatografia em camada delgada (CCD) para análise de AFM₁ em leite de cabra e avaliar sua ocorrência no Estado da Bahia. Foram coletadas 100 amostras de leite em cinco propriedades, localizadas na região do Recôncavo Baiano, durante o período de novembro de 2000 a agosto de 2002. A AFM₁ foi determinada no leite por meio de método de CCD conforme Sabino et al. (1989) modificado com a utilização de acetato de chumbo na fase de purificação para promover a precipitação de proteínas do substrato, possibilitando a visualização da AFM₁ na placa cromatográfica. Os limites de detecção e quantificação obtidos pela técnica modificada foram de 0,2 e 0,5 µg/L, respectivamente, com percentual de recuperação de 89,6% e coeficiente de variação igual a zero. Estes resultados revelaram que esta metodologia mostrou-se eficiente para a determinação de AFM₁ em leite caprino. Em todas as amostras analisadas não foi detectada a presença de AFM₁, demonstrando a boa qualidade deste produto quanto à contaminação por esta toxina.

Palavras-Chave: aflatoxina M₁, leite caprino, metodologia por CCD, ocorrência.

ABSTRACT

Aflatoxin M₁ (AFM₁) is a biotransformation product from aflatoxin B₁, which is excreted in milk from animals that ingest contaminated foodstuff. The objectives of this study were to improve the thin layer chromatography (TLC) technique for analyzing AFM₁ in goat milk, and to evaluate its occurrence in samples from State of Bahia. One hundred raw milk samples were collected from five farms, located at the Recôncavo Baiano, during the period from November 2000 to August 2002. Milk samples were analyzed for determining aflatoxin M₁ by means of TLC technique (Sabino et al. 1989) with some modifications. For that, lead acetate was employed during the purification process in order to precipitate proteins found in substrate, and allowed the visualization of AFM₁ on chromatography plate. By means of modified TLC technique the detection and quantification limits of aflatoxin M₁ were of 0.2 and 0.5 µg/L, respectively. The percentage of recoveries average and coefficient of variation for AFM₁ detection were 89.6 e 0%, respectively. These results revealed that this technique was efficient for determining AFM₁ in goat milk. AFM₁ was not detected in any of the analyzed samples, demonstrating the good quality of these products regarding to contamination by this toxin.

Key Words. aflatoxin M₁, goat milk, TLC technique, occurrence.

INTRODUÇÃO

O efetivo de caprinos leiteiros do Brasil representa o oitavo maior rebanho do mundo¹. Atualmente, a produção nacional de leite de cabra é estimada em 7.920.000 litros, sendo que 45,4% desta produção concentram-se na região Nordeste². Devido ao seu alto valor nutricional, excelente digestibilidade e baixo potencial alergênico, o leite de cabra vem sendo bastante utilizado na alimentação humana, especialmente de crianças, idosos e indivíduos portadores de alergia ao leite bovino³.

O leite de cabra é composto principalmente de gordura, proteínas, açúcares, vitaminas e sais minerais. Sua composição média é comparável à do leite de vaca, apresentando um teor de gordura e proteínas ligeiramente mais elevado. As cinco principais proteínas do leite de cabra são β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, κ -caseína, β -caseína, α ₂-caseína, as quais têm grande semelhança com seus homólogos no leite de vaca, embora algumas variações na composição e seqüências de aminoácidos destas proteínas têm sido observadas. O leite de ambas as espécies contem níveis similares de β -lactoglobulina, enquanto que o leite caprino apresenta um nível bastante reduzido de α ₁ caseína e aproximadamente o dobro da quantidade de α ₂-caseína e α -lactoalbumina encontrada no leite bovino⁴.

O êxito comercial da produção de leite, a nível nacional e internacional, está diretamente relacionado ao monitoramento da qualidade do produto. Nesse sentido, dentre outros agravantes, a presença de resíduos de micotoxinas, particularmente aflatoxinas no leite, representa um dos mais sérios problemas no controle de qualidade alimentar, consistindo em fonte potencial de risco à saúde pública⁵.

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um produto da biotransformação da aflatoxina B₁ (AFB₁), excretada no leite de mamíferos que ingerem alimentos contaminados por esta toxina⁶. Apesar deste metabólito apresentar menor toxicidade quando comparado com o seu precursor, também tem sido referido como agente mutagênico e carcinogênico⁷.

A ocorrência de AFM₁ tem sido observada em leite de búfalos⁸, caprinos^{9,10}, bovinos^{11,12}, ovinos¹³ e humano¹⁴. No Brasil, os estudos têm demonstrado a presença desta toxina principalmente no leite de bovinos^{15,16} e humano¹⁷, e até o momento, nenhum relato científico sobre o monitoramento de AFM₁ em leite caprino tem sido descrito.

A análise de AFM₁ em leite é geralmente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)^{18,19}, sendo o método de cromatografia em camada delgada (CCD) também recomendado para laboratórios que não dispõem deste equipamento^{20,21}. Entretanto, os relatos científicos sobre a determinação desta toxina em leite de cabra, empregando este último método são escassos^{22,8}.

O presente trabalho teve como objetivos otimizar o método de cromatografia em camada delgada (CCD) para análise de AFM₁ em leite de cabra, e verificar a ocorrência desta toxina em leite caprino no estado da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram realizadas quatro coletas de leite em cinco propriedades de caprinos leiteiros, localizadas no Recôncavo Baiano (municípios de Amélia Rodrigues, Camaçari, Feira de Santana e Simões Filho), durante o período de novembro/2000 a julho/2002. A escolha das propriedades foi estabelecida em função da maior concentração de caprinos leiteiros encontrada nesta região, enquanto que o período das coletas foi determinado de acordo com as condições de manejo relacionadas às épocas de produção de leite dos animais, sendo portanto realizadas em novembro/2000, fevereiro/2001, fevereiro/2002 e julho/2002. Em cada propriedade e por coleta, foram obtidas quatro amostras individuais (150 mL cada) dos animais de maior produção de leite e uma amostra (1L) constituída do *pool* de leite de todos os animais em lactação, perfazendo um total de 100 amostras.

Todas as coletas foram realizadas no período da tarde, durante a segunda ordenha do dia. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro, envoltos em papel alumínio, e em seguida transportadas para o laboratório de Toxicologia da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, sendo mantidas sob congelamento, à temperatura de -20°C, até o momento da análise.

Questionários foram aplicados para obtenção de informações sobre o manejo do rebanho, origem e composição da ração, duração e condições de estocagem da ração e utilização de antifúngicos nas propriedades.

Preparação da solução padrão de AFM₁

O padrão de AFM₁ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi diluído em benzeno: acetonitrila (9:1), conforme a metodologia 971.22 descrita pela AOAC²³.

Otimização do método analítico

A otimização do método de CCD para análise de AFM₁ em leite descrito por Sabino et al.²⁴ foi realizada na fase de purificação do extrato, na qual, foi incluída uma etapa de precipitação de proteínas. Para tanto, após a extração com metanol e obtenção do filtrado, aproximadamente 5 mL de uma solução saturada de acetato de chumbo, foi lentamente adicionada a este filtrado, até a completa precipitação das proteínas, procedendo-se em seguida, a centrifugação (3000 x g) durante 10 minutos. Nesta modificação do método, as quantidades da amostra de leite e dos solventes empregadas na fase de extração foram proporcionalmente reduzidas à metade (Figura 1).

A eficiência do método proposto foi avaliada através da obtenção de seus limites de detecção, quantificação, percentual de recuperação e coeficiente de variação. O limite de detecção corresponde à concentração mínima da substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero, enquanto o limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada

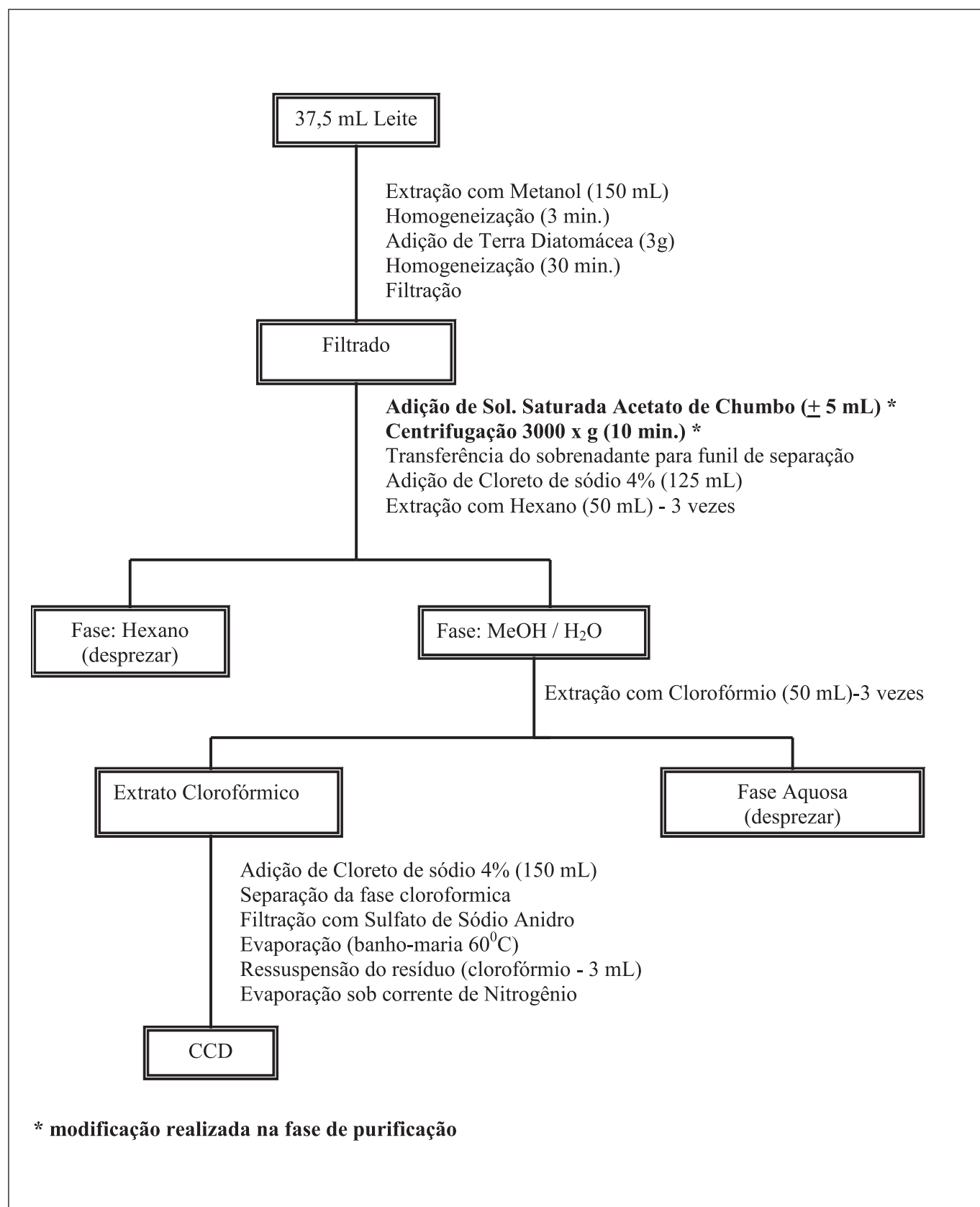


Figura 1. Esquema de extração e purificação da amostra de leite de cabra pelo método SABINO et al. (1989) modificado para a determinação de AFM₁

com um nível aceitável de precisão e exatidão²⁵. Para a determinação dos limites de detecção, quantificação e percentual de recuperação do método, amostras, em que não foram detectadas AFM₁, foram artificialmente contaminadas sequencialmente com níveis de 0,2; 0,3 e 0,5 µg/L de AFM₁. Para cada nível de contaminação foram realizadas três repetições. O percentual de recuperação foi obtido pela diferença entre o valor real (valor inicial adicionado na amostra – 0,5µg/L) e o valor observado na análise, ou seja, valor da leitura do extrato desta amostra na cromatofolha, conferindo a exatidão do método. A precisão da metodologia foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) obtido em condições de repetibilidade.

Análise de AFM₁ em leite caprino

Das 100 amostras de leite coletadas, 80 foram analisadas pelo método de CCD segundo Sabino et al.²⁴ e 20 avaliadas por este mesmo método acrescido das modificações descritas no item anterior. Para a detecção e a quantificação da AFM₁, as cromatofolhas de sílica gel G 60 (Art.1.05553, Merk, Alemanha) foram submetidas a um desenvolvimento unidimensional, ao abrigo da luz, utilizando-se como fase móvel a mistura clorofórmio-acetona-álcool isopropílico (85:10:5).

Estas cromatofolhas foram examinadas em câmara escura sob luz ultravioleta de ondas longas (366nm), e a quantificação da AFM₁, efetuada através da comparação visual das intensidades de fluorescência entre os pontos da solução padrão (1, 3, 5 e 7 µL) e aqueles referentes ao extrato da amostra.

A confirmação da identidade química da AFM₁ foi realizada através da reação com ácido sulfúrico (método 975.37 AOAC²³) e por cromatografia em camada delgada bidimensional, utilizando-se clorofórmio – acetona – álcool isopropílico (85:10:5) e éter-metanol - hexano - água (85: 4: 5:1), como primeira e segunda fases móveis, respectivamente.

Dados climáticos

As informações climáticas referentes à temperatura mínima, média e máxima, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar dos municípios estudados foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Meteorologia do Estado da Bahia (INMET-BA).

Análise estatística

A avaliação das variáveis climáticas das microrregiões estudadas e a sua influência sobre a presença de AFM₁ nas amostras de leite de cabra foi realizada através da Análise de Variância Univariada utilizando-se o programa estatístico SPSS (versão 10.1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do método de Sabino et al.²⁴ para a análise de AFM₁ em leite de cabra, mostrou resultados não satisfatórios, uma vez que, os extratos obtidos apresentavam muitos interferentes, que dificultavam a visualização da AFM₁ após a

contaminação da amostra para a obtenção do percentual de recuperação, ou quando a solução padrão de AFM₁ era aplicada sobre o extrato na placa cromatográfica (Figura 2). Os relatos de utilização deste método têm sido referidos para análise de AFM₁ em leite de vaca^{24,26}; no entanto, nenhuma referência sobre sua adequação para a análise desta toxina em leite de cabra tem sido descrita.

Estes resultados sugerem que as diferenças na composição química entre o leite caprino e bovino podem interferir na eficiência do método analítico. O leite de cabra apresenta teor de gordura e proteína ligeiramente mais elevado quando comparado com o leite de vaca, contendo um nível bastante reduzido de α_{s1} caseína e aproximadamente o dobro da quantidade de β -caseína e α -lactoalbumina encontrada no leite bovino. Devido a estas diferenças, a sedimentação por centrifugação da caseína do leite caprino é menor do que em leite de vaca. Além disso, diferenças na composição e seqüências de aminoácidos, que compõe estas proteínas, entre os dois tipos de leite têm sido verificadas⁴.

A otimização do método através da utilização de acetato de chumbo associado à centrifugação do extrato metanólico do leite, objetivando a precipitação das proteínas contidas no mesmo, resultou na obtenção de extratos mais limpos que permitiram uma melhor visualização da toxina sob a luz ultravioleta (Figura 3), quando comparados aos resultados obtidos com a utilização do método original (Figura 2). A utilização de acetato de chumbo para precipitação de proteínas tem sido recomendada em diferentes metodologias para a análise de aflatoxina em leite^{20,27}. Entretanto, Sylos e Rodriguez-Amaya²⁸ relataram que o uso deste produto a 20% não foi eficiente na remoção de constituintes indesejáveis em leite de vaca, uma vez que, os extratos obtidos apresentavam manchas com caudas e interferentes, quando aplicados sobre placas de CCD.

A redução das quantidades do substrato (leite) e solventes empregados na modificação do método durante a fase de extração pode também contribuir para a redução dos custos da análise de AFM₁ em leite de cabra.

As modificações realizadas no método descrito por Sabino et al.²⁴, ainda permitiram a obtenção de um bom percentual de recuperação da toxina (89,6%), com coeficiente de variação igual à zero. Estes resultados indicam que a otimização do método mostrou-se adequada para a determinação de AFM₁ em leite caprino, uma vez que atendem aos critérios adotados pela CE²⁹ e Horwitz et al.³⁰, que estabelecem valores de 60 a 120% como percentuais de recuperação aceitáveis e 25% como valor máximo de coeficiente de variação para níveis de contaminação entre 0,01 a 0,5 µg/L.

Os limites de detecção e quantificação, do método modificado para a determinação de AFM₁ em leite de cabra, foram de 0,2 e 0,5 µg/L, respectivamente. O limite de detecção do método descrito por Sabino et al.²⁴ foi de 0,5 µg/L para a análise de AFM₁ em leite de vaca. No entanto, os autores não fazem referência sobre o limite de quantificação, percentual de

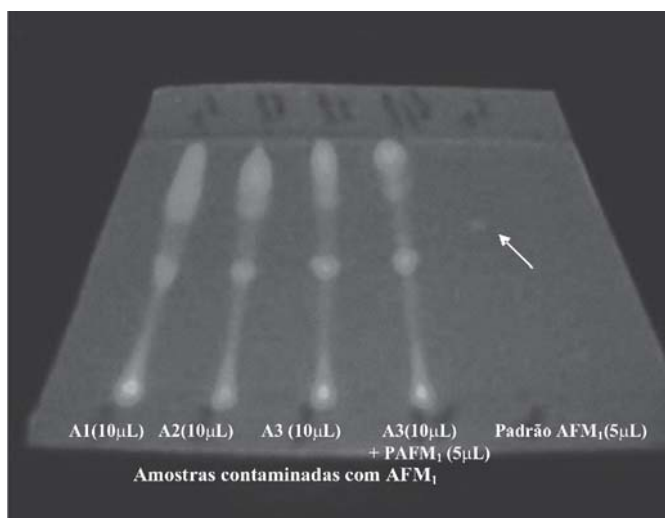


Figura 2. Cromatograma obtido por CCD de amostras de leite caprino contaminadas artificialmente com AFM₁ (0,5mg/L) e analisadas pelo método descrito por Sabino *et al.* (1989)

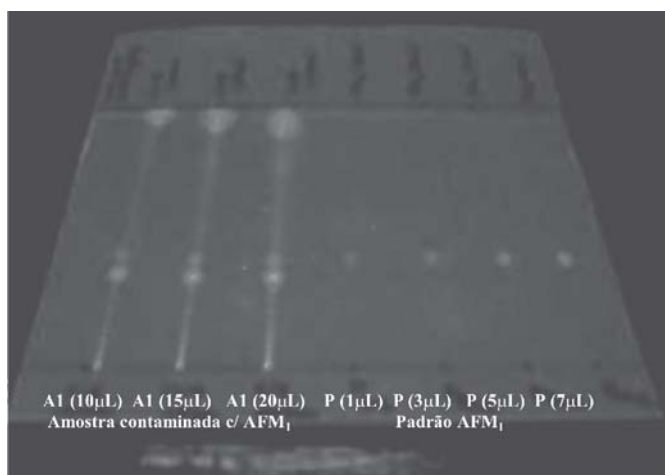


Figura 3. Cromatograma obtido por CCD de amostras de leite caprino contaminadas artificialmente com AFM₁ (0,5mg/L) e analisadas pelo método descrito por Sabino *et al.* (1989) modificado

recuperação e coeficiente de variação. Limites de quantificação de 0,02 e 0,3 µg/L foram obtidos, respectivamente, pela associação de colunas de imunoafinidade e realização de pequenas modificações na fase de extração do método de CCD para a análise de AFM₁ em leite de vaca²¹.

Os resultados da análise de AFM₁ nas amostras de leite de cabra avaliadas pelo método Sabino *et al.*²⁴ ou pela técnica modificada não revelaram a presença desta toxina, e isto provavelmente decorreu da utilização de rações de boa qualidade, cujo acondicionamento era realizado em tonéis de plástico tampados, mantidos em depósitos em bom estado de conservação e arejados e por um curto período (8 a 15 dias). A ausência de AFM₁ em todas as amostras de leite avaliadas teve correlação direta com estudos paralelos, que também não

evidenciaram a ocorrência de AFB₁ nas rações ingeridas pelos animais durante o mesmo período experimental.

A AFM₁ é um produto da biotransformação da AFB₁, a qual é excretada no leite de animais que ingerem alimentos contaminados por esta toxina^{6,7}. Investigações científicas sobre a excreção da AFM₁ em leite de cabra, revelam taxas de eliminação entre 0,45 a 3,67%^{31,32,33}, podendo ocorrer variação destes níveis entre os animais, ordenhas e fases de lactação³⁴.

Em todas estas propriedades estudadas predominava o sistema de criação semi-intensivo e intensivo, com regime alimentar semelhante, constituído de volumoso, ração e suplemento mineral. A ração era fornecida duas vezes ao dia para os animais em lactação, em quantidades diárias variáveis de 300 a 700g/animal, a depender da produção de leite do rebanho.

Nossos resultados revelaram que, apesar da AFM₁ não ter sido detectada no leite, nem a AFB₁, avaliada em estudos paralelos, ter sido encontrada nas rações destes animais, observou-se predominância de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento fúngico e conseqüente produção de aflatoxinas, tais como temperatura média em torno de 25°C e umidade relativa do ar acima de 70% (Tabela 1), condições estas, correlatas com a literatura^{35,36}.

A análise dos fatores climáticos revelou que não houve diferença significativa dos índices de temperatura (mínima, média e máxima) e umidade relativa do ar entre as microrregiões das propriedades em estudo, embora valores significativamente elevados de precipitação pluviométrica tenham sido observados nas propriedades B e C (Tabela 1).

Os maiores índices de temperatura mínima média e máxima ocorreram nos períodos das 2^a. e 3^a. coletas enquanto que os níveis de precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar foram significativamente mais altos durante a 1^a. e 4^a. coletas (Tabela 1).

As variações dos fatores climáticos não tiveram influência sobre a presença de AFM₁ nas propriedades estudadas. Corrêa *et al.*²⁶ também não verificaram a presença de AFM₁ em amostras de leite de vaca coletadas em diferentes estações climáticas. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado uma tendência sazonal na contaminação do leite de diferentes espécies animais por AFM₁, e a maior incidência, geralmente ocorre durante o inverno, quando os animais são alimentados principalmente com concentrados^{5,10,12,34}. Neste estudo, o manejo alimentar dos animais não sofreu modificações durante todo período experimental.

Estudos realizados por Martins *et al.*²² em Portugal e por Tiwari e Chauhan⁸ na Índia, também não evidenciaram a presença de AFM₁ em amostras de leite de cabra analisadas. Entretanto, esta ocorrência tem sido verificada no leite destes animais na Alemanha³⁷, Itália⁹ e Grécia¹⁰, em percentuais variáveis de 30 a 53,5%, das amostras analisadas, e em níveis de contaminação inferiores a 0,05µg/L, limite permitido pela legislação da Comunidade Européia. A presença de AFM₁ em amostras de queijos produzidos com leite caprino provenientes

Tabela 1. Médias dos fatores climáticos medidos nas propriedades produtoras de leite caprino durante o período das coletas

Fatores Climáticos	Propriedade					Coletas			
	A	B	C	D	E	1 ^a .	2 ^a .	3 ^a .	4 ^a .
Temperatura mínima (°C)	20,5 ^a	20,6 ^a	20,6 ^a	20,1 ^a	20,1 ^a	20,6 ^A	20,8 ^A	21 ^B	19,3 ^C
Temperatura média (°C)	25 ^a	24,9 ^a	24,9 ^a	24,5 ^a	24,5 ^a	25,1 ^A	25,7 ^B	25,6 ^B	22,7 ^C
Temperatura máxima (°C)	30,2 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30,6 ^A	31,5 ^B	31,1 ^C	26,9 ^D
Precip. pluviométrica (mm)	96,3 ^{ab}	106,7 ^a	106,7 ^a	72,8 ^b	72,8 ^b	122,9 ^A	49,6 ^B	63,7 ^B	128 ^A
Umidade relativa (%)	78,7 ^a	79,7 ^a	79,7 ^a	77,2 ^a	77,2 ^a	77 ^A	73,8 ^B	75,4 ^C	88 ^D

* Letras minúsculas comparam os valores nas linhas entre as propriedades e letras maiúsculas os valores nas coletas (p<0,05)

da Espanha e Itália, em níveis variáveis de 0,019 a 200µg/kg, também tem sido relatada por Barrios et al.³⁸ e Finoli e Vecchio⁹, respectivamente.

No Brasil, a ocorrência de AFM₁ tem sido verificada principalmente em leite bovino, evidenciando níveis de contaminação superiores a 0,5µg/L^{15,16,24}, limite estabelecido pela legislação brasileira³⁹, e no leite humano, embora em baixa concentração (0,024µg/L)¹⁷. O presente estudo representa o primeiro relato científico sobre o monitoramento de AFM₁ em leite de cabra no país.

AGRADECIMENTOS

À FAPESB e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (UFBA) pelo auxílio financeiro.

Ao PROCES e CAPES pela bolsa de Mestrado concedida.

REFERÊNCIAS

1. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Global Livestock Production and Health Atlas, 2003. [http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp]. 04 de agosto de 2005.
2. Costa AL. Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa, 2003. [http://www.cnpc.embrapa.br/artigo-4.htm]. 03 de agosto de 2005.
3. Ribeiro ELA, Ribeiro HJSS. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. *Semina* 2001; 22 (2): 229-35.
4. Jenness R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. *J Dairy Sci* 1980; 63 (10): 1605-30.
5. Galvano F, Galafaro V, Galvano G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: a worldwide review. *J Food Prot* 1996; 59 (10): 1079-90.
6. CAST (Council of Agricultural Science and Technology). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report, n.139. EUA: CAST; 2003.
7. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 2002; 127:19-28.
8. Tiwari V, Chauhan RKS. Aflatoxin detection in milk samples of cattle. *Sci Lett* 1991; 14 (10): 391-2.
9. Finoli C, Vecchio A. Aflatoxin M₁ in goat dairy products. *Microbiol Alim Nutr* 1997; 15 (1): 47-52.
10. Roussi V. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk and market milk commercialized in Greece. *Food Addit Contam* 2002; 19 (9): 863-8.
11. Rastogi S, Dwivedi PD, Khanna SK, Das M. Detection of aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control* 2004; 15: 287-90.
12. Kamkar A. A study of the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control* 2005; 16: 593-9.
13. Kaniou-Grigoriadou I, Eleftheriadou A, Mouratidou T, Katikou P. Determination of aflatoxina M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and feta cheese. *Food Control* 2005; 16: 257-61.
14. Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazzi AM et al. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by newborn. *Eur J Nutr* 2004; 43:191-7.
15. Oliveira CAF, Germano PML, Bird C, Pinto CA. Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 1997; 14 (1): 7-10.
16. Sassahara M, Netto DP, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxina M₁ in raw milk in the north of Paraná state. *Food Chem Toxicol* 2005; 43 (6): 981-4.
17. Navas SA, Sabino M, Rodriguez-Amaya D. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 2005; 22 (5): 457-62.
18. Garrido NS, Ilha MH, Ortolani MRS, Fávoro RMD. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit Contam* 2003; 20 (1): 70-3.
19. Prado G, Oliveira MS, Abrantes FM, Santos LG, Soares CR, Veloso T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil – agosto/98 à abril/99. *Ciênc Tecnol Aliment* 1999; 19 (3): 420-3.
20. Scussel VM. Comparison of methods by TLC and HPTLC for determination of aflatoxin M₁ in milk and B₁ in eggs. *Ciênc Tecnol Alimen* 2003; 23 Suppl 1: 46-52.
21. Shundo L, Ruvieri V, Navas SA, Sabino M. Otimização da determinação da aflatoxina M₁ em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2004; 63 (1): 43-8.
22. Martins HML, Martins MLL, Cruz MB. Métodos: ELISA e TLC aplicados à pesquisa de aflatoxina M₁ em leites de origem ovina e caprina. *Veterinária Técnica* 1994; 4 (6):20-5.
23. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of Analysis of AOAC.16th ed. Arlington: AOAC; 1996. Chapter 49.
24. Sabino M, Purchio A, Zorzetto MAP. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 1989; 6 (3): 312-26.
25. INMETRO (Instituto Nacional de Meteorologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. [www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratórios/cal.ensaios-DOQ-CGCR 008-Rev. 01 - março 2003]. 01 de setembro de 2005.
26. Corrêa B, Galhardo M, Costa EO, Sabino M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. *Rev Microbiol* 1997; 28: 279-83.
27. Della Rosa HV, Moraes ECF. Determinação de resíduo de aflatoxina M₁ em leite por flúorodensitometria. *Rev Farmacol Bioquim Uni S Paulo* 1981; 17 (2): 270-84.
28. Sylos CM, Rodríguez-Amaya D. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1996; 56 (1): 87-97.
29. CE (European Committee) Commission Directive 98/53/EC. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs, annex II, JOL 201, 17 July, 1998, p. 93-101.

30. Horwitz W, Kamps LR, Boyaler VW. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem* 1980; 63 (6): 1344-54.
31. Goto T, Hsieh DPH. Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered ¹⁴C-aflatoxin B₁. *J Assoc Off Anal Chem* 1985; 68 (3): 456-8.
32. Helferich WG, Baldwin RL, Hsieh DPH. [¹⁴C] aflatoxin B₁ metabolism in lactating goats and rats. *J Anim Sci* 1986; 62: 697-705.
33. Acosta A, Escobar A, Margolles E, Mella C. Dinámica de excreción de aflatoxina M₁ en leche de cabras. *Rev Salud Anim* 1989; 1: 208-211.
34. Patterson DSP, Glancy EM, Roberts BA. The "carry over" of aflatoxin M₁ into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁. *Fd Cosmet Toxicol* 1980; 18: 35-7.
35. Bullerman LB, Schroeder LL, Park K. Formation and control of mycotoxins in food. *J Food Protec* 1984; 47 (8): 637-646.
36. Gourama H, Bullerman LB. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. *J Food Prot* 1995; 58 (12): 1395-1404.
37. Hahn G, Knorr S. Bacteriological, cytological and residue studies on milk from ewes and goats. *Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene"* 1989; 30:332-42.
38. Barrios MJ, Gualda MJ, Cabanas JM, Medina LM, Jordano R. Occurrence of aflatoxin M₁ in cheeses from the south of Spain. *J Food Prot* 1996; 59 (8): 898-900.
39. Brasil. Resolução RDC nº274, de 15 de out. 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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.