

**AUTORES
AUTHORS**

✉ **Josué Fontes ROSMANINHO¹**
Carlos Augusto Fernandes OLIVEIRA^{2*}
Tatiana Alves dos REIS³
Benedito CORRÊA³

¹Solcamp Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil;

²Departamento de Engenharia de Alimentos,
Faculdade de Zootecnia e Eng. de Alimentos, Univ. de São Paulo
Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil

Fone: 55-19-35654173,

Fax: 55-19-35654114;

³Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

*e-mail: carlosaf@usp.br

RESUMO

No presente trabalho pesquisou-se a ocorrência de aflatoxina M₁ (AFM₁) e ácido ciclopiazônico (CPA) em 40 amostras de leite de consumo dos tipos A, B, C e Longa Vida, comercializados em lojas de hipermercados e padarias do município de São Paulo no período de janeiro a maio de 2002. A unidade amostral foi constituída por 1 embalagem original fechada de 1 L, sendo que cada amostra foi proveniente de um lote de fabricação. A análise de AFM₁ foi efetuada através de extração e purificação em colunas de imunoafinidade, seguido de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência. O CPA foi extraído e purificado em colunas de sílica gel, com quantificação por cromatografia em camada delgada. Os resultados revelaram 23 amostras (57,5%) positivas para AFM₁, em níveis que variaram de 10,6 a 121,2 ng/L de leite, portanto, abaixo do limite de tolerância para a AFM₁ em leite adotado no Brasil. Os níveis médios de AFM₁ nos leites tipos A, B, C e Longa Vida foram de 5,9, 26,6, 19,8 e 22,2 ng/L, respectivamente. Não foi observada amostra positiva para CPA, cujo limite de quantificação foi de 3 µg de CPA/L de leite. A estimativa da ingestão diária média de AFM₁ para crianças de 4 meses de idade (adotando-se o consumo diário de leite de 720 ml e o peso médio de 7 Kg) foi de 0,18, 1,64, 1,22 e 1,82 ng/kg de peso corpóreo/dia, para os leites tipos A, B, C e Longa Vida, respectivamente. Discute-se a importância destes dados para a Saúde Pública.

ABSTRACT

This study evaluated the occurrence of aflatoxin M₁ (AFM₁) and cyclopiazonic acid (CPA) in 40 samples of fluid milk grades A, B, C and ultra-high-temperature (UHT) treated milk commercialized in markets and bakeries in São Paulo, during January to May 2002. Each milk sample was constituted by one original pack of 1 L, representative of one production batch. Analysis of AFM₁ was performed using immunoaffinity columns for extraction and purification, followed by quantification in a high performance liquid chromatography system. The CPA was extracted and purified using silica gel columns, and quantified by thin layer chromatography. Results showed 23 (57.5%) positive samples for AFM₁, at levels of 10.6 - 121.2 ng/L of milk, which were below the tolerance limit for AFM₁ in milk adopted by Brazilian regulations. The mean levels of AFM₁ in milk grades A, B, C and UHT were 5.9, 26.6, 19.8 and 22.2 ng/L, respectively. No CPA was detected in the samples, considering the quantification limit of 3 µg CPA/L. By using data on milk consumption of 720 ml for children aging 4 months, and considering the mean weight of 7 Kg, the estimated mean daily intake of AFM₁ were 0.18, 1.64, 1.22 and 1.82 ng/kg body weight/day, for milk grades A, B, C and UHT, respectively. The relevance of these data for the Public Health is discussed.

**PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS**

AFM₁. CPA. Leite. Contaminação. Micotoxinas.
AFM₁. CPA. Milk. Contamination. Mycotoxins.

1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais (COULOMBE, 1991). Os principais produtos alimentícios susceptíveis ao desenvolvimento destes fungos incluem: amendoim, milho e trigo que, normalmente, são utilizados na composição de alimentos e rações. São conhecidos, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁ (AFB₁), B₂, G₁ e G₂ (COULOMBE, 1991). A aflatoxina M₁ (AFM₁) é originada, principalmente, a partir da biotransformação hepática da AFB₁. Após ser biotransformada, pode permanecer em diversos tecidos, especialmente no hepático e no renal, ou ser excretado através da urina e do leite. Deste modo, a AFM₁ constitui o principal metabólito hidroxilado presente em leite de animais que ingeriram ração contaminada por AFB₁ (APPLEBAUM et al., 1982).

Diversos estudos efetuados em modelos experimentais demonstram que as aflatoxinas são poderosos agentes hepatotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido. Em Saúde Pública, as aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados (McLEAN & DUTTON, 1995).

A excreção de AFM₁ tem sido estudada, principalmente, no leite bovino, uma vez que este alimento constitui uma das principais fontes de nutrientes para os seres humanos, particularmente à população infantil. No município de São Paulo, MARTINS & MARTINS (1986) analisaram 224 amostras de leite tipo "B", observando a AFM₁ em 4 amostras (1,8%), das quais 2 contendo 250 ng/L. SABINO et al. (1989) analisaram amostras de leite coletadas de fazendas do Vale do Paraíba, detectando AFM₁ em 18% das amostras, em níveis de 100-1.680 ng/l. No entanto, os autores constataram que, de 100 amostras de leite pasteurizado, coletadas em São Paulo, apenas 1 foi positiva (200 ng/l). Os autores atribuíram a baixa incidência de AFM₁ nas amostras de leite comerciais, à diluição da toxina, decorrente da mistura de leite contaminado e não contaminado, durante o beneficiamento pelas usinas.

OLIVEIRA et al. (1997), analisando 300 amostras de leite em pó, distribuído pelo programa de alimentação escolar do município de São Paulo, observaram 11% de amostras positivas, com concentrações entre 100-1.000 ng/l. JUSSARA (2000) pesquisou a AFM₁ em 120 amostras de leites pasteurizado e esterilizado comercializados na cidade de São Paulo, observando 7 amostras positivas (6%) em níveis de 24,3 a 101,2 ng/L. Recentemente, no município de Ribeirão Preto/SP, GARRIDO et al. (2003) analisaram AFM₁ e aflatoxina M₂ (derivado biotransformado da aflatoxina B₂) em 60 amostras de leite esterilizado e 79 de pasteurizado. A AFM₂ não foi encontrada em nenhuma amostra, enquanto a AFM₁ esteve presente em 20,9% das amostras, em níveis de 50-240 ng/L.

Além da AFM₁, outras micotoxinas também podem ser excretadas através do leite, como o ácido

ciclopiazônico (CPA). O CPA é uma micotoxina produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. LEE & HAGLER (1991), nos Estados Unidos, analisaram 7 lotes diferentes de milho, constatando a contaminação por CPA em 4 lotes, com níveis de 25-250 µg/kg, e de aflatoxinas em todos os lotes (níveis de 4-508 µg/kg), evidenciando a ocorrência simultânea das toxinas.

Os dados relativos à toxicidade do CPA são escassos na literatura. Estudos toxicológicos, efetuados em animais, revelaram maior predisposição à ação tóxica do CPA em órgãos vitais como fígado, rins, sistema digestivo e sistema neurológico (LOMAX et al., 1984). PIER et al. (1989), em estudo com suínos, administraram aflatoxina e CPA, isolados e em combinação, observando a potencialização dos efeitos das duas toxinas, demonstrada pela redução no ganho de peso, aumento da mortalidade e alterações hepáticas nos animais intoxicados.

PRASONGSIDH et al. (1997) analisaram a estabilidade do CPA em leite, observando que as técnicas usuais de processamento, entre elas, a pasteurização, a esterilização e a desidratação, não apresentaram eficiência para destruir o CPA no leite contaminado, similarmente ao que ocorre em relação a AFM₁.

O objetivo do presente trabalho foi pesquisar, quantitativamente, a ocorrência de AFM₁ e CPA em amostras de leite de consumo (tipos A, B, C e Longa Vida) comercializados no município de São Paulo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram colhidas 40 amostras de leites A, B, C e longa vida integral, pertencentes às 2 marcas de maior volume de comercialização nas lojas de hipermercados e padarias do Município de São Paulo. Assim, foram analisadas, ao todo, 10 amostras de cada tipo de leite. O período de colheita compreendeu os meses de janeiro a maio de 2002, tomando o cuidado de evitar a repetição dos lotes de amostras já colhidas.

A unidade amostral foi constituída por 1 embalagem original fechada de 1 L, sendo que cada amostra foi proveniente de um lote de fabricação, conforme indicado no rótulo. Foram colhidas, na primeira semana de cada mês, 8 amostras de leite/mês (1 de cada marca, para cada tipo de leite), retirando-as, ao acaso, das unidades disponíveis nas gondolas.

As amostras foram identificadas, acondicionadas em sacos de polipropileno estéreis, armazenadas em caixa isotérmica contendo gelo e enviadas imediatamente ao laboratório para a realização das análises.

A determinação de AFM₁ nas amostras de leite foi efetuada utilizando-se a metodologia preconizada por TUINSTRAL et al. (1993), com adaptações propostas pela empresa fabricante de colunas de imunoafinidade (Aflatest®, Vicam), e determinação através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em síntese, a amostra analítica (25 ml) foi previamente aquecida a 37°C, adicionada de 1 g de NaCl e submetida à centrifugação (1.250 x g, 15 min.), após o que foi passada diretamente através de coluna de imunoafinidade,

sendo a mesma adaptada a uma seringa de vidro e conectada a um sistema de vácuo (fluxo de 2-3 ml/min.). Após a eluição da amostra, a coluna foi lavada através da passagem de 20 ml de água ultrapurificada (Milli Q, Millipore)-metanol (9+1). Em seguida, passou-se 1 ml de metanol, de maneira a eluir a AFM₁, recolhendo o eluato em frasco âmbar. O eluato foi diluído com água ultrapurificada até formar uma solução de metanol-água (7+3), semelhante à fase móvel utilizada na corrida cromatográfica.

A separação e a quantificação da AFM₁ foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida (CLAE) (Shimadzu®), equipado com detector de fluorescência (excitação: 366 nm e emissão: 428 nm) e coluna Shim-pack CLC-ODS (5 μm) 4,6 x 250 mm, precedida de pré-coluna Shim-pack (5 μm) 4 x 10 mm. Foram injetados 20 μl da amostra, utilizando-se, como fase móvel, metanol-água (7+3), com fluxo de 0,8 ml/min. A quantificação de AFM₁ nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, obtidos nas amostras, na equação de regressão da curva de calibração, preparada previamente com padrões de AFM₁ aferidos nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 ng/mL, de acordo com SCOTT (1990).

A determinação de CPA foi efetuada de acordo com a técnica descrita por URANO et al. (1992), incluindo as modificações propostas por PRASONGSIDH et al. (1998). A amostra de leite (25 ml) foi misturada com 25 ml de solução de bicarbonato de sódio a 2% em metanol, em agitador de alta velocidade por 3 min. Em seguida, esta solução foi transferida para um funil de separação, acrescentando-se 100 ml de hexano e agitando-se por 3 min. Após a separação por centrifugação, a fase inferior foi transferida para outro funil de separação, acrescentando-se ácido clorídrico (HCl 6N), de maneira a obter um pH=3,0. Foram acrescentados, à solução acidificada, 2 porções de 100 ml de clorofórmio, agitando por 30 minutos. Os extratos combinados foram passados em funil analítico contendo 50g de sulfato de sódio anidro. A secagem dos extratos foi realizada em evaporador rotativo a 40°C, até próximo a secura.

O resíduo foi transferido, quantitativamente, para um frasco de 4 ml, e secado sob atmosfera de nitrogênio. O resíduo final foi re-suspendido, em 200 μl de metanol, para posterior identificação e quantificação por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromatoplasmas de alumínio divididas em 4 partes iguais (10 x 10cm). Os padrões foram

aplicados em 3 níveis diferentes (2,5; 5 e 10 ng de CPA), e as amostras, em alíquotas de 10 μl. Empregou-se, como fase móvel acetato de etila-2-propanolhidróxido de amônio (50+15+10), em corrida unidimensional, conforme LANSDEN (1986). Após a corrida cromatográfica, a cromatoplasma foi retirada da cuba e secada em estufa a 35°C, por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a aspersão de reagente de Erlich, sobre toda a placa, para a observação de mancha de coloração púrpura, após cerca de 4 minutos. Nestas condições, a mancha permaneceu evidente, por aproximadamente 7 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram encontrados níveis detectáveis de CPA nas amostras de leite. O limite de quantificação do método, nas condições descritas, foi de 3 μg de CPA/L de leite.

Os níveis de AFM₁ obtidos nas amostras de leites de consumo são apresentados na Tabela 1. Das 40 amostras analisadas, 23 (57%) apresentaram AFM₁ em níveis que variaram de 10,6 a 121,2 ng/L de leite. No entanto, todas as amostras positivas encontraram-se dentro do limite de 500 ng/L, aceito pelo Brasil (BRASIL, 2002) e Estados Unidos (GALVANO et al., 1996), enquanto 3 amostras apresentaram níveis acima de 50 ng/L, o qual constitui o limite de tolerância adotada pela Comunidade Européia (CE, 1998).

Os resultados obtidos no presente trabalho são coerentes com estudos efetuados em outros países. MARKAKI & MELISSARI (1997), GALVANO et al. (1998), KIM et al. (2000), MARTINS & MARTINS (2000) e SAITANU (1997) observaram contaminações em mais de 75% das amostras de leite analisadas, utilizando CLAE como método de quantificação das amostras, e o limite de detecção entre 115 ng AFM₁/L de leite.

No Brasil, MARTINS & MARTINS (1986), SABINO et al. (1989), OLIVEIRA et al. (1997) e JUSSARA (2000) detectaram percentuais de contaminação entre 1,8-18% nas amostras de leite analisadas. Os limites de detecção, obtidos pelos autores através de diferentes técnicas analíticas, variaram de 100-250 ng/L de leite.

A frequência de amostras positivas para AFM₁ foi de 30% nas amostras de leite tipo A, com nível médio de contaminação de 5,9 ng/L, enquanto os outros tipos de leite

Tabela 1 Níveis de aflatoxina M₁ em leites de consumo tipos A, B, C e Longa Vida, comercializados no Município de São Paulo-SP

Tipo de Leite	Nº de amostras analisadas	Amostras positivas ^a N (%)	Varição ^b (ng/L)	Média (ng/L)
A	10	3 (30%)	14,4 - 26,6	5,9
B	10	6 (60%)	10,6 - 121,2	26,6
C	10	6 (60%)	11,4 - 51,4	19,8
Longa Vida	10	8 (80%)	11,4 - 45,4	22,2
Total	40	23 (57%)	10,6 - 121,2	18,4

¹Amostras positivas: acima de 10 ng/L;

²Níveis mínimos e máximos detectados nas amostras analisadas.

apresentaram frequência igual ou superior a 60%, com níveis médios acima de 19 ng/L. Coerentemente, a concentração média de AFM₁ foi maior nos leites tipos C e Longa Vida. A participação dos tipos de leite A, B, C e Longa Vida no mercado consumidor é estimada em 0,83%, 7,5%, 33,3% e 58,3%, respectivamente. Portanto, observou-se que o tipo de leite que apresentou menor contaminação por AFM₁, representa menos de 1% do consumo total de leite fluido consumido pela população.

Considerando os níveis médios de AFM₁ observados no presente estudo, e adotando-se o consumo diário de leite de 720 ml, para crianças de 4 meses de idade (OLIVEIRA et al. 1997), as quais apresentam o maior consumo, e o peso médio de 7 Kg, estimado pela FUNDAÇÃO IBGE (1977), para crianças do sexo masculino, de 4 meses de idade, calculou-se a ingestão diária média (ID) de AFM₁, através dos diferentes tipos de leite analisados. Os valores obtidos foram 0,18, 1,64, 1,22 e 1,82 ng/kg de peso corpóreo (p.c.)/dia para os leites A, B, C e Longa Vida, respectivamente.

A ingestão diária de uma toxina pode ser avaliada mediante a comparação com um valor teórico de ingestão tolerável, calculado a partir de dados experimentais ou epidemiológicos. Com relação às aflatoxinas, contudo, ainda não existem dados suficientes para estabelecer níveis toleráveis de exposição (RUSTOM, 1997). Alguns pesquisadores, no entanto, têm preconizado a utilização de fatores de segurança para estimar valores de ingestão diária tolerável (IDT) para as aflatoxinas, com base em experimentos com animais. Neste tipo de estimativa, um fator de 1.000 a 5.000 é aplicado à maior dose administrada aos animais, para a qual não foram observados efeitos tóxicos. A IDT para a AFM₁, baseada nestes critérios e calculada em relação aos resultados obtidos por CULLEN et al. (1987), foi de 0,5 ng/kg p.c./dia, utilizando-se um fator de segurança de 5.000.

Os valores de ID, estimados no presente trabalho para os leites A, B, C e Longa Vida, foram maiores do que o valor de IDT mencionado para a AFM₁. Contudo, existem controvérsias a respeito da validade das estimas de IDT para aflatoxinas, devido sobretudo, aos problemas decorrentes da extrapolação de dados obtidos em animais para a espécie humana (KUIPER-GOODMAN, 1991). Deve-se ressaltar, porém, que apesar do fator de segurança refletir diferenças inter e intra-espécies, bem como o significado biológico dos tumores induzidos experimentalmente, não existe consenso sobre a aceitação deste critério para carcinógenos genotóxicos, como a AFM₁. Para estes compostos, recomenda-se o menor grau de exposição possível, principalmente de crianças, as quais, de maneira geral, são consideravelmente mais sensíveis aos efeitos tóxicos de compostos químicos veiculados pelos alimentos.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que os leites de consumo comercializados no município de São Paulo apresentam AFM₁ em níveis inferiores ao limite estabelecido pela legislação brasileira. Entretanto, a estimativa de ingestão diária média de AFM₁ através do leite, para crianças de 4 meses, variou de 0,18 a 1,82 ng/kg p.c./dia, o que reforça a importância do controle da AFM₁ em leite e derivados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLEBAUM, R.S., BRACKETT, R.E., WISEMAN, D.W., MARTH, E.H. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products - a review. *Journal of Food Protection*, v. 45, p. 752-777, 1982.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 274, de 15 out. 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1653&word=Aflatoxina%20M1> (acessado em 10/Set/2004).

[CE] Comunidades Européias. Regulamento CE n.º 1525/98. *Jornal Oficial das Comunidades Européias*, 1998. (Diretiva das Comunidades Européias).

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Ed). *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 103-143.

CULLEN, J.M., RUEBNER, B.H., HSIEH, L.S., HYDE, D.M., HSIEH, D.S.P. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male Fisher rats compared to aflatoxin B1. *Cancer Research*, v. 47, p. 1913-1917, 1987.

FUNDAÇÃO IBGE. Estudo Nacional de Despesa Familiar. Consumo Alimentar antropometria. Região II: São Paulo. Rio de Janeiro, IBGE, 1977. v. 1.

GALVANO, F., GALOFARO, V., GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *Journal of Food Protection*, v. 59, p. 1079-1090, 1996.

GALVANO, F., GALOFARO, V., DE ANGELIS, A., GALVANO, M., BOGNANNO, M., GALVANO, G. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 738-741, 1998.

GARRIDO, N.S., IHA, M.H., SANTOS, O.M.R., DUARTE, F.R.M. Occurrence of aflatoxins M (1) and M (2) in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 20, p. 70-73, 2003.

JUSSARA, A.T. Ocorrência de aflatoxina M1 em amostras de leite comercializado na cidade de São Paulo. São Paulo, 2000. [Dissertação de Mestrado Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

KIM, E.K., SHON, D.H., RYU, D., PARK, J.W., HWANG, E.K., KIM, Y.B. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, v. 17, p. 59-64, 2000.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 33, p. 325-333, 1991.

LANSDEN, J.A. Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 69, p. 964-966, 1986.

LEE, Y.J., HAGLER, W.M.J.R. Aflatoxin and cyclopiazonic

acid production by *Aspergillus flavus* isolated from contaminated maize. *Journal of Food Science*, v. 56, p. 871-872, 1991.

LOMAX, L.G., COLE, R.J., DORNER, J.W. The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. *Veterinary Pathology*, v. 21, p. 418, 1984.

MARKAKI, P., MELISSARI, E. Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, v. 14, p. 451-456, 1997.

MARTINS, J.L.S., MARTINS, I.S. Aflatoxina M1 no leite tipo "B" comercializado no município de São Paulo, SP (Brasil). *Revista de Saúde Pública*, v. 20, p. 303-308, 1986.

MARTINS, M.L., MARTINS, H.M. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, v. 17, p. 871-874, 2000.

McLEAN, M., DUTTON, M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 65, p. 163-192, 1995.

OLIVEIRA, C.A.F., GERMANO, P.M., BIRD, C., PINTO, C.A. Immunochemical assessment of aflatoxin M1 in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 14, p. 7-10, 1997.

PIER, A.C., BELDEN, E.L., ELLIS, J.A., NELSON, E.W., MAKI, L.R. Effects of cyclopiazonic acid and aflatoxin singly and in combination on selected clinical pathological and immunological responses of guinea pigs. *Mycopathologia*, v. 105, p. 135-142, 1989.

PRASONGSIDH, B.C., KAILASAPATHY, K., SKURRAY, G.R., BRYDEN, W.L. Stability of cyclopiazonic acid during storage and processing of milk. *Food Research International*, v. 30, p. 793-798, 1997.

PRASONGSIDH, B.C., KAILASAPATHY, K., SKURRAY, G.R., BRYDEN, W.L. Kinetic study of cyclopiazonic acid during the heat-processing of milk. *Food Chemistry*, v. 62, p. 467-472, 1998.

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, v. 59, p. 57-67, 1997.

SABINO, M., PURCHIO, A., ZORZETTO, A.P. Variations in the level of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 6, p. 321-326, 1989.

SAITANU, K. Incidence of aflatoxin M1 in Thai milk products. *Journal of Food Protection*, v. 60, p. 1010-1012, 1997.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In: HELRICH, K. (Ed). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. p. 1184-1213.

TUINSTRAN, L.G., ROOS, A.H., VAN TRIJP, J.M. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M1 in milk powder

using immunoaffinity columns for clean-up: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, v. 76, p. 1248-1254, 1993.

URANO, T., TRUCKSESS, M.W., MATUSIK, J. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. *Journal of AOAC International*, v. 75, p. 319-322, 1992.