

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

JOSÉ HENRIQUE SBARAGLINI

AFLATOXINA NO AMENDOIM

BAURU
2012

JOSÉ HENRIQUE SBARAGLINI

AFLATOXINA NO AMENDOIM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química, sob orientação da Profa. Dr. Ana Paula Cerino Coutinho.

BAURU
2012

Sbaraglini, José Henrique

S276a

Aflatoxina no amendoim / José Henrique Sbaraglini --
2012.

27f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Química) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Aflatoxina. 2. Amendoim. 3. Contaminação. 4.
Análises. I. Coutinho, Ana Paula Cerino. II. Título.

JOSÉ HENRIQUE SBARAGLINI

AFLATOXINA NO AMENDOIM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química, sob orientação da Prof^a. Dr. Ana Paula Cerino Coutinho

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Cerino Coutinho

Universidade Sagrado Coração

Prof^a. Ms. Setsuko Sato

Universidade Sagrado Coração

Prof^a. Ms. Alessandra Bizan de Oliveira Stetnet

Universidade Sagrado Coração

Bauru, 20 de Junho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha professora e orientadora Dr^a. Ana Paula Cerino Coutinho, que me ajudou na elaboração desse trabalho.

RESUMO

As aflatoxinas são resultados do metabolismo dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Existem vários tipos de aflatoxinas, mas os principais são as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Essas micotoxinas são estáveis a temperaturas acima de 100°C, não se decompondo com o cozimento, pasteurização e torrefação. Em condições favoráveis de umidade e temperatura, algumas frutas, sementes e farinhas estão sujeitas à germinação e propagação de fungos, e conseqüentemente, contaminadas. O amendoim e seus derivados são produtos que são contaminados com grande frequência, pois é um alimento com grande quantidade de nutrientes e, o clima, muitas vezes não favorece durante a safra. Na agricultura, essas toxinas representam um prejuízo incalculável. No organismo, gera problemas de saúde, tanto humano, quanto animal. As contaminações ocorrem com maior frequência através de ingestão de alimentos contaminados. Os rins, o fígado e o sistema nervoso, são os mais afetados. Hoje em dia, há testes que podem ser considerados até fáceis de fazer, para identificar no alimento, algum tipo de contaminação. Lembrando que a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determinou um limite de 20 µg/Kg para as somas das aflatoxinas B1 + G1 + B2 + G2.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Micotoxinas. Amendoim e derivados. Contaminação.

ABSTRACT

Aflatoxins are produced by metabolism of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. There are several types of aflatoxins but the main ones are the aflatoxins B1, B2, G1 and G2. These mycotoxins are stable at temperatures above 100°C, does not break down by cooking, pasteurizing and roasting. Under favorable conditions of humidity and temperature, some fruits, seeds and flour are subject to the germination and propagation of fungi, and thus contaminated. The peanut and its products are products that are contaminated with high frequency, it is a food with large amounts of nutrients, and the weather often does not favor during the season. In agriculture, these toxins represent an incalculable loss. In the body, causes health problems, both human and animal. The contamination occurs more frequently through ingestion of contaminated food. The kidneys, liver and nervous system are most affected. Today, there are tests that may be considered to easy to make, to identify the food, any kind of contamination. Recalling that ANVISA (National Agency for Sanitary Vigilance) has set a limit of 20 mg / kg for the sum of aflatoxins B1 + B2 + G1 + G2.

Keywords: Aflatoxins. Mycotoxins. Peanuts and its products. Contamination.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	AMENDOIM	2
3	AFLATOXINAS	3
4	AFLATOXINA NO AMENDOIM	4
5	CONTAMINAÇÕES	6
6	MEDIDAS DE CONTROLE	9
7	LEGISLAÇÃO	11
8	MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS	12
8.1	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	12
8.2	PROCEDIMENTO AFLATEST COM FLUORÍMETRO (0-100 PPB).....	14
8.3	8.3 MÉTODO DE TRIAGEM DE ROMER (AOAC 1984).....	18
9	CONCLUSÃO	20
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, e que agem como potentes agentes hepatotóxicos (tóxicos para o fígado) e carcinogênicos em diferentes espécies de animais. Os esporos dos fungos aflatogênicos encontram-se normalmente no solo e no ar, podendo contaminar uma grande variedade de alimentos. Sementes, farinhas e frutas, quando em condições de umidade e temperatura favoráveis à germinação e propagação de fungos, estão sujeitas a níveis consideráveis de contaminação como fungos e suas toxinas (SYLOS, 1986).

O amendoim e seus derivados são produtos que são contaminados com grande frequência, pois é um alimento preferido pelo fungo (devido a grande quantidade de nutrientes) e, também, porque muitas vezes há excesso de chuva no período de secagem após o arranquio. Além do amendoim, a aflatoxina pode ser encontrada em muitos outros produtos, tais como, outros cereais, sementes, nozes, etc.

Existem vários tipos de aflatoxinas, porém o termo geralmente diz respeito a quatro compostos do grupo difurano cumarina, de onde derivam as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (SABINO 2003). Na agricultura essas toxinas representam prejuízos, perdas na produção de grãos e queda no rendimento de crescimento e reprodução de animais, levando a perdas incalculáveis (DUXBERY, 2004).

É comprovado cientificamente o vínculo da ação das micotoxinas com inúmeros problemas de saúde, tanto no homem como nos animais. A contaminação ocorre com maior frequência através da ingestão de alimentos contaminados, e sua absorção geralmente provoca reações sob a forma de hemorragias e necroses. Muitas das micotoxinas têm afinidade por um determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso os mais afetados. As contaminações ocasionadas por esta bactéria podem ser classificadas em moderadas (comprometem apenas as funções intestinais) e severas (compromete outras partes do corpo). Sua fonte está relacionada à ingestão de alimentos contaminados ou ao contato físico com pessoas que já estejam contaminadas (INMETRO, 1993). Por essas razões, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determinou um limite de 20 µg/Kg para a soma das aflatoxinas B1+G1+B2+G2 (ANVISA, 2002).

Muitas vezes, essas toxinas passam despercebidas pelas pessoas, que não procuram saber da qualidade do produto que está comprando ou consumindo. Esse trabalho tem como objetivo analisar as estruturas de diferentes aflatoxinas, descrever as fontes de contaminações e descrever métodos para a detecção da aflatoxina no amendoim.

2 AMENDOIM

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.), é uma leguminosa originária da América do Sul, cultivada nas mais variadas regiões tropicais do mundo, pela sua ampla adaptabilidade a grande diversidade ambiental. É uma importante matéria-prima para a indústria de alimentos devido seu grande valor nutricional. Apesar da redução da área plantada com amendoim, no Brasil, principalmente após os anos 70, o Brasil já foi um importante produtor mundial e o seu cultivo ainda desempenha papel importante para o abastecimento do mercado doméstico (MORAES; GODOY, 1997).

A importância econômica do amendoim está relacionada ao fato das sementes possuírem sabor agradável e serem ricas em óleo (aproximadamente 50%) e proteína (22 a 30%). Além disso, contém carboidratos, sais minerais e vitaminas, constituindo-se num alimento altamente energético (585 calorias/100 g/sementes) (AGROBYTE, 2012).

O estado de São Paulo destaca-se como o maior estado produtor do Brasil, e o sabor agradável torna o amendoim um produto destinado também ao consumo "*in natura*", como aperitivos salgados, torrados e preparado de diversas formas. Na indústria de doces, são usados grãos inteiros em diversas coberturas ou grãos moídos na forma de paçocas ou substituindo a castanha de caju em cobertura de sorvetes. Os grãos também podem ser utilizados para extração do óleo, empregado diretamente na alimentação humana, na indústria de conservas (enlatado) e em produtos medicinais (AGROBYTE, 2012).

3 AFLATOXINAS

Atualmente, são conhecidas dezessete substâncias tóxicas similares designadas pelo termo de aflatoxina, porém, as principais que apresentam interesse médico-sanitário são identificadas como aflatoxinas (AFs) B1, B2, G1 e G2. Dentre elas, a que apresenta maior poder toxigênico é a aflatoxina B1 (AFB1), seguida da aflatoxina AFG1, AFB2 e AFG2 (CORRÊA, 2000; ARAÚJO, 2006).

Os quatro principais metabólitos são identificados como B1 e B2 (por apresentarem fluorescência violeta, quando observadas sob luz ultravioleta em 365 nm) e G1 e G2. Duas outras substâncias denominadas M1 e M2 foram detectadas no leite, urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo das B1 e B2.

As aflatoxinas são compostos químicos pouco solúveis em água (10 a 30 µg/mL), são solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido. São instáveis sob radiação ultravioleta, na presença de oxigênio e em condições extremas de pH (pH < 3 e pH > 10), e também na presença de agentes oxidantes (ARAÚJO, 2006). Apresentam ponto

de fusão alto, sendo resistente ao calor, sendo decompostas apenas em temperaturas superiores a 230° C (SILVA, 2005).

A tabela 1 mostra a fórmula, a massa molecular e o ponto de fusão das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2:

Aflatoxina	Fórmula molecular	Massa molar	Ponto de fusão (°C)
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240

Fonte: BUTTLER, 1974.

A Aflatoxina é resistente a muitos agentes físicos e químicos, resistindo por mais de uma hora em meios de esterilização (VAN DYCK *et al.*, 1982). Alguns autores, na tentativa de estabelecer a composição química da Aflatoxina, observaram que este produto era constituído de dois tipos de substâncias, que quando submetidas à luz ultravioleta apresentavam fluorescência de coloração azul ou verde. A essas substâncias deu-se o nome de Aflatoxinas, toxinas do *Aspergillus flavus*, seguidas da denominação B (*blue*) ou G (*green*) de acordo com a cor da fluorescência (MIDIO; MARTINS, 2000; SABINO, 2003).

Com a realização da espectroscopia de massa chegou-se à fórmula empírica das aflatoxinas B e G. Pelas diferenças dos valores dos R_fs (Fator de Referência) observados na cromatografia em camada delgada, foram denominadas aflatoxinas B1 (C₁₇H₁₂O₆) e B2 (C₁₇H₁₄O₆), G1 (C₁₇H₁₂O₇) e G2 (C₁₇H₁₄O₇). As aflatoxinas são furocumarinas complexas, são substâncias apolares, instáveis à luz ultravioleta, mas bastante estáveis a temperaturas acima de 100°C (MIDIO; MARTINS, 2000).

A figura 1 mostra fórmulas estruturais das principais aflatoxinas:

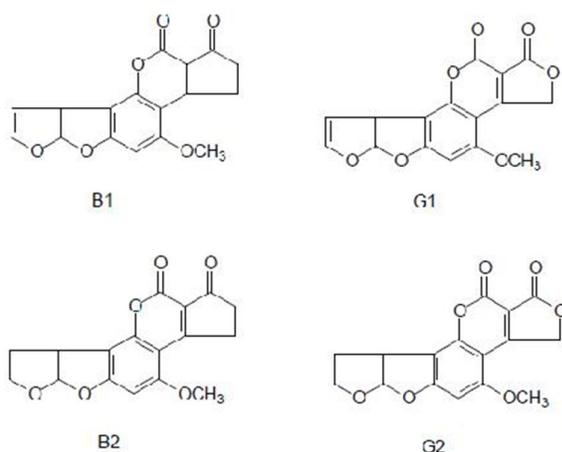


Figura 1: Fórmula estrutural das principais aflatoxinas. Fonte: Midio; Martins, 2000.

4 AFLATOXINA NO AMENDOIM

O amendoim é um alimento que apresenta condições favoráveis para contaminação por aflatoxinas devido a grande quantidade de nutrientes. O clima tropical favorece a produção dos fungos, e, portanto, países detentores deste clima como o Brasil, reúnem condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos inclusive os fungos produtores de aflatoxinas (CIB, 2005). A presença de micotoxinas nos alimentos é um problema de saúde pública, que precisa ser mais divulgado para que a população tenha conhecimento sobre a presença destas toxinas nos alimentos e possa consumir alimentos de qualidade, que não coloquem em risco sua saúde. A contaminação dos alimentos ocorre principalmente se não forem colhidos, armazenados e processados corretamente (FONSECA, 2007).

Os fungos destas toxinas têm seu habitat no solo, no ar e em ambientes que ofereçam condições propícias como umidade e temperatura. O produto em casca deve ser armazenado com umidade máxima de 9%, o que lhe garantirá a sua segurança alimentar (PROAMENDOIM, 2012).

Conforme Dorner et al. (2003), lotes de amendoins contaminados não podem ser utilizados para o consumo humano e também representam perdas econômicas para as indústrias que utilizam e comercializam o amendoim “in natura” e seus produtos derivados. Essas micotoxinas são estáveis a temperaturas acima de 100°C, não se decompondo com o cozimento, pasteurização e torrefação (MIDIO; MARTINS, 2000). Segundo Mannon & Jonhson (1985), 25% dos grãos produzidos no mundo estão contaminados por micotoxinas.

A figura 2 mostra uma colônia de *Aspergillus flavus* na placa de Petri



Fotografia de Dr. E. Terrazas, Morphology of Medically Important Fungi. © 2001, William McDonald, M.D. Universidad de Califórnia

As principais doenças que ocorrem na cultura de amendoim podem causar a redução de 10% a 50% na produção de vagens. Os principais problemas podem ocorrer tanto na fase de plantio, com as doenças de sementes e plântulas, como durante o desenvolvimento da cultura, com as doenças causadas por fungo do solo ou da parte aérea, e após a colheita, com fungos produtores de aflatoxina ou de grãos armazenados (MORAIS, S.A. et al, 1997).

O principal fungo encontrado na torta de amendoim foi *Aspergillus flavus*. Em uma análise química na torta de amendoim, foi encontrada uma série de compostos tóxicos que apresentavam fluorescência sob luz ultravioleta.

5 CONTAMINAÇÕES

Para o crescimento e multiplicação dos fungos são importantes os seguintes fatores: umidade, temperatura, presença de oxigênio, tempo para o crescimento fúngico, fonte de carbono, nitrogênio, o pH, a presença de íons metálicos. Estes fatores explicam por que alguns fungos se desenvolvem melhor em um alimento que em outro. O milho e o amendoim, por exemplo, são mais susceptíveis à contaminação por fungos produtores de aflatoxinas por possuírem uma composição ideal de nutrientes (MALLMANN *et al*, 2003; SABINO, 2003).

No Brasil a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência em alimentos destinados ao consumo humano e animal. Estas toxinas são comumente encontradas em alimentos que tem substratos essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento de fungos (FORSYTHE, 2002).

Caldas *et al.* (2002) analisaram 366 amostras de alimentos (amendoim cru e derivados, milho de pipoca, milho em grão e castanha do Pará) consumidos no Distrito Federal, e detectou a presença de aflatoxinas em 19,6% das amostras, sendo que AFB1 esteve presente em 98,5% das amostras positivas. Caldas *et al.*, (2002), analisaram amostras também em Minas Gerais e verificaram frequências de contaminação de 46,6% do total da amostra.

Já em São Paulo, Sabino *et al.* (1999) pesquisaram aflatoxinas em 137 amostras de amendoim e derivados, onde 62 amostras (45,3%) foram positivas para aflatoxinas e 37 (27%) apresentaram valores de Aflatoxinas B1 + G1 acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Gonçalez *et al.*, (2008), avaliaram a contaminação das cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem, onde constatou já no estágio de granação a presença de aflatoxinas em concentrações que variava de 5,42µg/Kg a 218,52 µg/Kg. As cascas de amendoim são utilizadas para cama de frangos e gado, e também serve de fibra para ruminantes, podendo então contaminar o animal que posteriormente vai servir de alimento para o humanos.

Na região de São José do Rio Preto/SP, foi detectada contaminação em de 39,3% das 178 amostras analisadas (SANTOS *et al.*, 2001). Batatinha *et al.*, (2003) detectaram aflatoxinas em 93,55% das amostras analisadas de amendoim e seus derivados no estado da Bahia. Sendo assim, níveis elevados de contaminação encontrados nos alimentos que

ultrapassam os níveis máximos permitidos pela legislação brasileira, representam fator de risco para a população, onde alta incidência de aflatoxinas se deve principalmente à forma de colheita, secagem e armazenamento do produto.

Neste entendimento, Sabino et al. (1995), descreve que a contaminação por aflatoxinas em alimentos representa um sério problema no Brasil, devendo-se levar em conta os fatores que contribuem de forma negativa na contaminação, seja pelo clima favorável ou pelas práticas de agricultura e condições de estocagem.

As micotoxinas tornaram-se mais conhecidas após o acidente econômico ocorrido na Inglaterra em 1960, ao provocarem um surto com alta letalidade em perus na Inglaterra conhecido como "*turkey - X disease*". Nesse surto, aproximadamente 100 mil perus morreram após consumirem torta de amendoim na ração, proveniente do Brasil (SARGEANT, 1961). As aves morriam no espaço de uma semana, com sinais de anorexia, apatia e perdiam a força das asas (SABINO, 2003).

Os efeitos das aflatoxinas no organismo animal incluem carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e hepatotoxicidade (BRADBURN & COKER, 1993). A absorção de aflatoxinas ocorre por difusão passiva através do intestino, difundindo-se rapidamente por todos os tecidos do organismo (RAMOS & HERNANDEZ, 1996). Uma vez em contato com o tecido hepático, as aflatoxinas dão início à inibição da síntese proteica, o que resulta numa diminuição do nível de proteínas plasmáticas, principalmente da albumina e das globulinas alfa e beta (SANTIN, 2000).

Uma das causas das aflatoxinas serem extremamente tóxicas para aves é sua rápida absorção pelo trato gastrointestinal. Essa rápida absorção é evidenciada através do aparecimento de AFL imediatamente após a ingestão da micotoxina. Uma vez absorvida, a AFL B1 é imediatamente ligada, de forma reversível, à albumina e, em menor escala, a outras proteínas. Formas de aflatoxinas ligadas e não ligadas a proteínas séricas espalham-se pelos tecidos, especialmente o fígado (WYATT, 1991). Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença. A primeira mudança é alteração no tamanho dos órgãos internos. Ocorre aumento de tamanho no fígado, baço e rins, enquanto a bursa e timo estão diminuídos. Somando-se a alterações de tamanho, ocorrem alterações na coloração e textura dos órgãos. Por exemplo, o fígado de aves com aflatoxicose tem como característica a coloração amarelada e friável, com acentuada infiltração de gordura. O grau de infiltração gordurosa depende da dose e do tempo de intoxicação por aflatoxina, chegando a 68% de aumento em frangos de corte (MERKLEY *et al.*, 1987).

Confirma-se, portanto, a contaminação dupla quando apresentam lesões indicativas de aflatoxicose acrescidas de erosões na moela. Também observa-se, em frangos e poedeiras

contaminados com aflatoxinas, extrema palidez das mucosas e pernas . Essa pigmentação deficiente parece ser resultado da menor absorção, diminuição no transporte e deposição tecidual dos carotenoides da dieta (LEESON *et al.*, 1995).

A umidade do amendoim é um fator importante a ser analisado. Com a umidade acima de 20% – 22% a atividade metabólica da vagem oferece resistência à penetração do fungo e o risco de contaminação do amendoim praticamente não existe. Abaixo de 11%, no amendoim em casca, não há umidade suficiente para o desenvolvimento dos fungos e também não há perigo de contaminação. A fase crítica, em que a possibilidade de contaminação do amendoim é grande, está no intervalo de 22% a 11%, devendo-se fazer a secagem o mais rápido possível nesta fase (FONSECA, 2007). A temperatura também é um fator importante para o desenvolvimento dos fungos e, conseqüentemente, surgimento de toxinas. A temperatura ótima para a produção de aflatoxinas é de 27°C (SABINO, 2003).

A contaminação do homem pelas aflatoxinas pode ocorrer de duas maneiras: por contaminação direta, onde o homem ingere alimento contaminado. Ou pela forma indireta, onde o homem se alimenta de produtos derivados de animais, que ingeriram alimentos contaminados, como ovos, carne, leite. Ambas as formas de contaminação são prejudiciais a saúde (MAIA, 2007).

Um dos mais importantes registros de aflatoxicose em humanos ocorreu no noroeste da Índia, no outono de 1974 onde 397 pessoas foram afetadas e 108 pessoas morreram (CVE, 2003).

6 MEDIDAS DE CONTROLE

As medidas que podem melhorar a qualidade do amendoim, são:

- Evitar injúrias nas vagens antes da colheita, uma vez que o fungo *A. flavus* pode se desenvolver nas vagens em formação e maturação.
- Colher o amendoim em períodos secos e no momento em que apresentar-se completamente maduro, efetuar a secagem o mais rápido possível, evitar o reumidecimento dos frutos, eliminar vagens e grãos quebrados e, se a colheita ocorrer em dias chuvosos, proceder à secagem artificial.
- Armazenar em locais secos e ventilados, empilhar os sacos em estrados de madeiras, evitar contato direto com o solo, monitorar constantemente a umidade do produto, controlar pragas e roedores e armazenar sempre que possível em baixas temperaturas, e, durante o transporte, evitar injúrias e reumidecimento (AGROBYTE, 2012). Indubitavelmente, o melhor método para controlar a contaminação de micotoxinas em alimentos é prevenir o crescimento de

fungos. A contaminação de grãos por micotoxinas pode ser um problema sério que pode acontecer não só através de condições inadequadas de armazenagem, mas também já na lavoura, durante o período pré-colheita. São essenciais, também, os procedimentos para diminuição da umidade dos grãos colhidos e a armazenagem dentro de padrões recomendados internacionalmente. O uso de inibidores de crescimento fúngico em grãos armazenados tem sido muito utilizado como um método preventivo. O controle da atividade dos fungos nas rações animais e seus componentes têm como premissa básica conseguir matérias primas livres da produção de micotoxinas durante o processo de armazenamento (SMITH & HAMILTON, 1970).

A realização de análises em alimentos é fundamental para evitar a comercialização de produtos com altos teores de aflatoxinas, reduzindo assim a possibilidade de causar danos à saúde humana. O ideal, porém, seria evitar a contaminação durante a colheita, secagem e armazenagem. Tecnologias estão sendo desenvolvidas para remover, destruir ou reduzir a contaminação de aflatoxinas em alimentos suscetíveis, no campo e durante o armazenamento. Segundo Rustom (1997), no entanto, a eficiência de um método para inativação de aflatoxinas depende de vários fatores, como a natureza do alimento, sua umidade, nível de contaminação e grau de associação de aflatoxinas com os seus componentes.

Os métodos de inativação de aflatoxinas que contaminam alimentos, removendo ou destruindo a toxina, podem ser classificados em métodos que empregam substâncias químicas, biológicas e métodos físicos. A aplicação dos métodos de inativação de aflatoxinas não deve resultar na formação de outras substâncias tóxicas ou deixar qualquer resíduo prejudicial. A qualidade do produto deve ser mantida, deve ser economicamente viável e tecnicamente aplicável, além de ser capaz de destruir os esporos e fungos que estão presentes no produto e que em condições favoráveis proliferam e produzem a toxina (MALLMANN, et al, 2006; RUSTOM, 1997).

Um estudo realizado por Gunterus et al (2007) alertou que o etileno e o CO₂ são uma promessa na batalha para controlar a contaminação por aflatoxinas. O etileno e o CO₂ agem juntos ou separados, reduzindo a síntese de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*. A inibição por CO₂ é semelhante à do etileno.

A inativação por meio de métodos físicos envolve extração com solventes, adsorção, inativação pelo calor e irradiação. A extração com solventes pode remover toda a aflatoxina, sem a formação de produtos tóxicos ou redução do conteúdo de proteína e qualidade do alimento. Sua limitação deve-se ao custo elevado e à formação de extratos tóxicos. A adsorção ocorre com a ligação dos adsorventes às aflatoxinas e daí a remoção de soluções aquosas. A inativação por meio de calor depende do nível inicial de contaminação, temperatura e tempo

de aquecimento, teor de umidade, pH e força iônica. Aflatoxinas são sensíveis à luz ultravioleta. Raios gama e irradiação solar também destroem aflatoxinas nos alimentos (RUSTOM, 1997).

Uma das estratégias para a eliminação das aflatoxinas dos alimentos consiste na agregação de substâncias adsorventes, que inibem a absorção das toxinas pelo trato digestivo. A adição de bentonita sódica ou montmorilonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações para animais tem promovido a neutralização de parte dos efeitos negativos das aflatoxinas (LOPES, et al, 2006). Estes aditivos são atóxicos e reduzem a absorção de aflatoxinas. Os níveis bioquímicos avaliados em animais que receberam ração com adsorvente e aflatoxina foram semelhantes aos níveis séricos de animais do grupo de controle, provando assim a eficácia deste adsorvente na prevenção dos efeitos da aflatoxicose em aves (BATINA, 2005).

7 LEGISLAÇÃO

Devido aos prejuízos que as micotoxinas podem causar a saúde humana e animal, vários países vêm estabelecendo os níveis máximos de contaminantes nos alimentos e rações, pois uma vez contaminados, os alimentos tornam-se inadequados para comércio e consumo (SCUCCEL, 1998).

Desta forma, devido à legislação interna de cada país, há uma considerável distinção entre os níveis máximos de tolerância de intoxicação dos alimentos contaminados destinados ao consumo humano de país a país. A tabela 2 mostra os níveis máximos de aflatoxinas permitidos em alimentos para consumo humano com os respectivos países:

Tabela 2 – Níveis máximos permitidos de aflatoxinas em alimentos em alguns países.

PAÍS	NÍVEL MÁXIMO (PPB)	ALIMENTO
União Europeia	2 (B1); 4 (total)	Cereais e produtos processados
Austrália	5 (total)	Todos os alimentos
Brasil	20 (total)	Amendoim e derivados de milho
Índia	30 (total)	Todos os alimentos
Japão	10 (total)	Todos os alimentos
Singapura	0 (total)	Todos os alimentos
África do Sul	5 (total)	Todos os alimentos
Estados Unidos	20 (total)	Todos os alimentos

Fonte: SCUSSEL, 1998.

De acordo com a tabela, pode observar que a tolerância varia para cada país. O mais tolerante é a Índia (30ppb) e o país com menor tolerância de aflatoxina é a Singapura, onde o nível de ppb deve ser de zero (SCUCCEL, 1998). Importante ainda ressaltar, que embora possa o alimento estar contaminado em níveis superiores aos estabelecidos, estas toxinas na maioria das vezes estarão presente em concentrações muito baixas ($\mu\text{g/g}$) de forma a não alterar as propriedades organolépticas, como o sabor e odor, dificultando sua constatação pelos consumidores, o que somente um trabalho eficaz das autoridades competentes poderá evitar que estes alimentos cheguem à mesa dos consumidores, e que diante da impossibilidade de constatação previa ao consumo, sejam ingeridos de forma sistemática findando por causar micotoxicose crônica ou aguda dependendo do grau de contaminação (CALDAS, 2002).

8 MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE AFLATOXINAS

Para evitar a comercialização e o consumo de amendoim e derivados contaminados com micotoxinas, foram criados vários métodos para análises de aflatoxinas com o propósito de identificar o nível de contaminação.

8.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Este método, do Instituto Adolfo Lutz (1976) é aplicado para a determinação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em sementes oleaginosas, cereais e seus produtos, e também em rações. As aflatoxinas são extraídas com clorofórmio e com posterior remoção de interferentes por partição líquida com metanol-água-hexano. Os componentes são determinados pela comparação da intensidade de fluorescência das amostras com a dos padrões por cromatografia em camada delgada.

Preparação da amostra: Triture ou moa, a fim de que se obtenha massa homogênea, podendo utilizar um liquidificador. Passe a amostra pela peneira de 20 *mesh*. Homogeneíze novamente e retire uma sub-amostra de 30 g.

Extração e purificação: Pese 30 g da amostra previamente homogeneizada e transfira para um frasco Erlenmeyer. Adicione cerca de 10 mL de água aquecida a 60°C para facilitar a penetração do solvente orgânico nos tecidos hidrofílicos. Homogeneíze com bastão de vidro. Adicione 100 mL de clorofórmio, tampe o frasco com algodão e agite manualmente por 30 segundos. Prossiga esta operação com agitador mecânico por mais 30 minutos. Filtre o extrato clorofórmico em funil de vidro com papel de filtro qualitativo.

No caso de amostra de amendoim ou derivados, adicione pequena quantidade de celite ao funil para acelerar a filtração. Colete 50 mL do extrato em outro frasco Erlenmeyer e evapore em banho-maria a 80°C ate que todo o clorofórmio tenha sido eliminado.

Ressuspenda o resíduo com 50 mL de metanol, transfira quantitativamente para o funil de separação, adicione 50 mL da solução de NaCl a 4% e agite lentamente. Extraia as gorduras e os demais interferentes com três porções de 50 mL de hexano. Descarte a fração com hexano (superior). Recolha o extrato metanólico em bquer ou frasco Erlenmeyer. Transfira quantitativamente o extrato metanólico para um funil de separação limpo e extraia as aflatoxinas com 50 mL de clorofórmio, agitando o funil de separação suavemente por três minutos. Deixe as fases se separarem e recolha a inferior (clorofórmio) em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Repita a operação com mais 50 mL de clorofórmio. Recolha o total de clorofórmio juntamente com o extrato da primeira partição e evapore em banho Maria à 80°C ou rotavapor a (50-60)°C. O resíduo deve ser transferido quantitativamente com clorofórmio para um frasco Erlenmeyer de 25 ou 50 mL e evaporado sob corrente de nitrogênio. Para efetuar a cromatografia em camada delgada, dissolva o resíduo em clorofórmio em quantidade adequada, normalmente entre 200 a 500 µL e utilize banho de ultrassom por cerca de 30 segundos para assegurar total dissolução das aflatoxinas.

Triagem das micotoxinas por cromatografia em camada delgada: Aplique em placa de sílica gel, 5 a 10 µL da amostra e alguns pontos de cada padrão, separadamente, fazendo sobrepor no segundo ponto do padrão 5 µL da amostra. Desenvolva o cromatograma em cuba previamente preparada para garantir a saturação com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Remova a placa depois de 12 cm de desenvolvimento do solvente e seque. Observe o cromatograma sob lâmpada de luz UV de comprimento de onda longo. Amostras suspeitas de conterem aflatoxinas devem ser quantificadas e confirmadas separadamente.

Quantificação: Aplique, nas placas 1, 3, 5, 7 µL dos padrões e 5 e 10 µL de cada amostra. Desenvolva as placas em clorofórmio-acetona (90:10) ou em tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Compare a intensidade da fluorescência da mancha da micotoxina da amostra com a dos padrões e determine qual das manchas da amostra corresponde a do padrão. Se a intensidade da fluorescência da mancha de menor volume utilizado da solução de amostra for maior do que a do padrão, dilua a amostra e recromatografe.

Confirmação da identidade das aflatoxinas: Realize a cromatografia bidimensional, utilizando a fase 1: clorofórmio-acetona-hexano (85:15:20) ou clorofórmio-acetona (90:10) e a fase 2: tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10) e faça o teste químico com ácido sulfúrico (1+3) e reação com ácido trifluoroacético, descrito a seguir:

a) teste químico - Pulverize a placa com solução aquosa de H₂SO₄ (1+3). Deixe secar e observe sob lâmpada UV (comprimento de onda longo). A fluorescência das aflatoxinas muda de azul (AFB) ou verde (AFG) para amarelo. Este teste somente confirma a ausência de aflatoxinas.

b) reação com TFA (ácido trifluoroacético) - Divida uma placa verticalmente em duas regiões e em cada um delas cromatografe dois pontos de amostra e dois de padrões. Em uma das regiões, sobreponha 1 µL de solução de TFA em um dos pontos da amostra e em um dos pontos do padrão. Aqueça a placa por 10 minutos a (35-40)°C e desenvolva o cromatograma com clorofórmio-acetona (85+15) ou clorofórmio-acetona-isopropanol (85:12,5:2,5).

Examine a placa sob lâmpada UV de comprimento de onda longo. A aflatoxina com TFA forma um hemi-acetal cujo Rf é 1/3 do Rf da aflatoxina original. Utilizando-se TFA, a aflatoxina B1 transformar-se-á em aflatoxina B2a e a aflatoxina G1 em G2a. Este teste é decisivo para confirmação da identidade das aflatoxinas B1 e G1.

Cálculo:

$$\frac{S \times Y \times V}{Z \times W} \text{ Micotoxina em } \mu\text{g/Kg (ppb)}$$

S = µL de micotoxina padrão, de fluorescência igual a da amostra;

Y = concentração-padrão da micotoxina em µg/mL;

V = µL de solvente requerido para diluir o extrato final;

Z = µL da mancha do extrato da amostra que deu intensidade de fluorescência igual a do padrão;

W = gramas de amostra contidas no extrato final.

Notas:

O material contaminado deve ser tratado com hipoclorito de sódio a 5% e acetona, antes de ser descartado e lavado. Enxague bem todo material para que não fique nenhum resíduo do oxidante utilizado. Como alternativa, deixe o material contaminado por um período mínimo de 30 minutos em uma solução de hidróxido de sódio a 5%.

As aflatoxinas são hepatotóxicas e carcinogênicas; portanto a análise deve ser realizada em capela de exaustão apropriada, com máscara e luvas de borracha.

8.2 PROCEDIMENTO AFLATEST COM FLUORÍMETRO (0-100 PPB)

Procedimento

Pesar 25 g de amostra bruta com 5 g de NaCl e colocar em um liquidificador. Adicionar ao copo 125 ml de metanol:água (60:40). Tampar o copo e bater por 1 minuto. Despejar o extrato em um filtro de papel com pregas. Coletar o filtrado em um recipiente limpo. Coletar 20 ml do extrato filtrado e misturar com 20 ml de água purificada e misturar

bem. Filtrar a mistura através de filtro de microfibras de vidro 1.5 μm em um frasco limpo, ou diretamente em uma seringa de vidro, até alcançar a marca de 10 ml.

Cromatografia por Coluna

Passar 10 ml de extrato diluído filtrado através da coluna Aflatest a uma vazão de 1-2 gotas por segundo, até entrar ar na coluna. Passar duas vezes 10 ml de água purificada através da coluna a uma vazão de aproximadamente 2 gotas por segundo. Os 20 ml de água e mais os 10 ml de extrato diluído, são descartados.

Depois da segunda passagem de água, preparar uma cubeta de vidro abaixo da coluna e adicionar 1 ml de metanol na seringa de vidro. Eluir a uma vazão de 1 gota\segundo passando o metanol completamente. Coletar na cubeta 1 ml de metanol passado pela coluna, e adicionar 1 ml de revelador (1ml de solução de Bromo + 9 ml de água purificada). Misturar bem e colocar no fluorímetro para se fazer a leitura de concentração de aflatoxina.

A figura 3 mostra a mistura batida com água:metanol filtrada em filtro de pregas.



Figura 3. Filtração da amostra em filtro de pregas. Foto tirada em 26 jun de 2012 por: Próprio autor.

A figura 4 mostra uma nova filtração. Dessa vez, em filtro microfibras.



Figura 4. Filtração em filtro microfibras. Foto tirada em 26 jun de 2012 por: Próprio autor.

A figura 5 mostra a eluição do filtrado através da coluna Aflatest



Figura 5. Líquido sendo eluído através da coluna Aflatest. Foto tirada em 26 jun de 2012 por: Próprio autor.

A figura 6 mostra a coluna Aflatest (onde se fixa a concentração de Aflatoxina).



Figura 6. Coluna Aflatest. Foto tirada em 26 jun de 2012 por: Próprio autor.

A figura 7 mostra o fluorímetro onde será feita a leitura da concentração de Aflatoxina.



Figura 7. Fluorímetro VICAM SERIE 4EX. Foto tirada em 26 jun de 2012 por: Próprio autor.

8.3 MÉTODO DE TRIAGEM DE ROMER (AOAC 1984)

Esse método, descrito por Romer em 1975, oficializado pela “Association of Official Analytical Chemists” em 1980, utiliza uma minicoluna de vidro empacotada com sulfato de cálcio anidro (Drierite, 20-40 mesh, W.A. Hammond, Drierite, Co.), alumina neutra (100 – 200 mesh), sílica-gel, florisil (100 – 200 mesh), e novamente sulfato de cálcio anidro em camadas de 8 a 10, 8 a 10, 16 a 20, 8 a 10, e 8 a 10 mm de altura respectivamente.

Partindo-se de 50 g de amostra moída procedeu-se à extração de aflatoxinas através de mistura de acetona-água (85:15), triturando-se por 3 minutos. Após a filtração, 150 ml do filtrado foram submetidos a um processo de limpeza com os seguintes reagentes precipitantes: 3 g de carbonato básico de cobre e 200 ml de gel de cloreto férrico, preparado a partir de 170 ml de hidróxido de sódio 0,2N e 30 ml de cloreto férrico (cloreto férrico anidro 20 g/300 ml de água).

Uma segunda filtração foi feita com auxílio de terra diatomácea. Os 150 ml do filtrado foram colocados em funil de separação com 150 ml de ácido sulfúrico 0,03% e as aflatoxinas extraídas com duas porções de 10 ml de clorofórmio, coletadas separadamente. Em seguida, os extratos foram levados com solução de hidróxido de potássio 0,02% contendo cloreto de potássio 1% e recolhidos em béqueres.

2 ml do primeiro extrato foram colocados no topo da minicoluna e eluídos com clorofórmio-acetona (9:1). Nestas condições, amostras positivas apresentam, na camada de florisil, uma banda fluorescente sob iluminação ultravioleta a 365 nm. O restante do primeiro e o segundo extratos foram guardados para posterior quantificação, caso a triagem resultasse positiva.

Método de Quantificação de Romer (1975)

A avaliação quantitativa de aflatoxinas, segundo Romer, baseia-se na dissolução dos extratos em mistura de benzeno-acetonitrila, aplicação em placas de sílica-gel e desenvolvimento por sistema clorofórmio-acetona. Através da comparação visual com padrões sob iluminação ultravioleta a 365 nm, estimou-se os teores de aflatoxinas nas amostras.

Foram juntados 4 ml de cada um dos extratos de clorofórmio obtidos como descrito no item anterior e neutralizados em funil de separação com solução de ácido sulfúrico 0,03%. Uma alíquota de 6 ml foi coletada em frasco e levada à secura em banho-maria à temperatura de 40°C sob corrente de nitrogênio. O extrato seco foi diluído e levado a volume fixo com a mistura benzeno-acetonitrila (98:2). Alíquotas de 3,5; 5,0 e 6,5 ml foram aplicadas em placas de sílica-gel, ao lado de padrões em volumes iguais ao do extrato. Utilizou-se mistura clorofórmio: acetona (9:1) para o desenvolvimento do cromatograma. A intensidade das

manchas fluorescentes da amostra foi visualmente comparada com a dos padrões sob iluminação ultravioleta a 365 nm.

Para o cálculo, foi aplicada a seguinte fórmula:

Onde:

$$\frac{S \times Y \times V}{Z \times W} \text{ Micotoxina em } \mu\text{g/Kg (ppb)}$$

S – Volume em µl do padrão B1 igual ao desconhecido.

Y – Concentração do padrão B1 em µg/ml.

V – Volume em µl da diluição final do extrato da amostra.

Z – Volume em µl do extrato da amostra aplicada cuja intensidade de fluorescência é igual a 5 (padrão B1)

W – Gramas de amostra correspondente ao volume do extrato que foi evaporado.

9 CONCLUSÃO

Sementes oleaginosas como o amendoim, estão sendo muito produzidas e consumidas ultimamente devido a inúmeros nutrientes e derivados que se pode obter desse alimento. Mas o que muitos não sabem, é que além de muito nutritivo, pode ser também muito tóxico e muitas vezes, fatal. O amendoim pode conter uma toxina chamada Aflatoxina, que é o produto do metabolismo dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Essa toxina pode causar doenças em animais e seres humanos, sem falar do enorme prejuízo pós-safra, onde as sementes contaminadas são descartadas. Por esses motivos, a preocupação de elaborar análises a fim de se obter uma leitura de aflatoxinas é grande, e há inúmeros métodos para detecção dessas micotoxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, Júlio M. A; Química de Alimentos: Teoria e Prática. 3ª ed. Editora UFV, Viçosa, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Legislação. resolução rdc no 274, de 15 de outubro de 2002. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm>. Acesso em 19/12/2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho, Resolução - Rdc Nº 274, De 15 De Outubro De 2002. Acesso em: 30 de abril de 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990, chapter 49. p. 1184-1199.

AGROBYTE, Amendoim. Retirado em <www.agrobyte.com.br/index.php?pag=amendoim> Acesso em 20/05/2012

BATATINHA, M. J. et al. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados no estado da Bahia durante o ano de 2002. Revista Instituto Adolfo Lutz. São Paulo v.62, n, p. 183-187, 2003.

BATINA, P. N. et al. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 4, 2005.

BRADBURN, N.; COKER, R.D. Aflatoxin contamination in maize. **Tropical Science**, v.33, n.44, p.418-428, 1993.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxina e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista Saúde Pública*, v. 36, n. 3, p. 319-323, jun. 2002.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Disponível em <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Aflatoxinas.htm>>

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos: Panorama nacional. In: Encontro nacional de micotoxinas e simpósio de armazenamento qualitativas de grãos do mercosul, 9., 1998, Florianópolis. Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos. p.162-168. Florianópolis, 2000.

DUXBERY, D. Testing for mycotoxin control. *Food Technology*, v. 58, n. 11, p. 78 – 80, Chicago, 2004.

FERNANDES, F. C. Micotoxinas: risco biológico para trabalhadores em aviários. *Revista Brasileira de Medicina do Trabalho*. Belo Horizonte, v. 2, n. 3, p. 200-208, jul./set. 2004.

FONSECA, H. Prevenção e controle de Micotoxinas em produtos agrícolas. *Boletim Técnico*, n. 7. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/Boletim7.htm>>. Acesso em: 2 maio 2007.

FORSYTHE, Stephen J. Microbiologia da segurança alimentar. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: Artmed, 2002

GONÇALEZ, E.; SOUZA, T. N.; ROSSI, M. H.; FELICIO, J.; CORREA, B. Avaliação da microflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. *Ciências. Agrotec*, v. 32, n.5, p. 1380-1386, set/out, Lavra, 2008.

GUNTERUS A. et al. Ethylene inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* grown on peanuts. *Food Microbiology*. v. 24, p. 658-663, jan. 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2a ed. São Paulo: IMESP, 1976. p. 323-325.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/amendoim.asp>>. Acesso em: 23/05/2012

LAMIC. Laboratório de Análises Micotoxicológicas. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.gov>>. Acesso em: 13 jun. 2007.

LEESON S, Diaz G, Summers JD. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph, Ontario. 1995.

LOPES, J. M. et al. Adição de bentonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. *Ciência Rural*, v. 36, n. 5, Santa Maria, 2006.

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros – uma revisão. *Revista da FZVA*. v.14, n.1, p. 235-257. Uruguaiana, 2007.

MALLMANN, C. A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006. *Anais...* p. 213-224, 2006. Disponível em: < http://www.lamic.ufsm.br/papers/20060515_criterios.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2007.

MALLMANN, C. A. et al. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano no Estado do Rio Grande do Sul. SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2., 2003. *Anais...* 2003. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/papers/2.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2006.

MANNON, J.; JONHSON, E. Fungi down on the farm. *New Scientist*, v.105, 1985.

MERKLEY JW, Maxwell RJ, Phillips JG, Huff WE. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens, *Poultry Science* 1987; 66: 59-64.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. *Toxicologia de alimentos*. São Paulo: Varela, 2000.

MORAES, S.A.; GODOY, I.J. Amendoim: controle de doenças. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. (Eds.) *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Suprema, Viçosa; Suprema, 1997. V.1, p.1-49.

PRÓ-AMENDOIM. O portal do amendoim. Disponível em: <http://www.proamendoim.com.br/amendoim_cultivo.php>. Acesso em 15 jun. 2012

PRZYBYLSKI, W. **Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates.** *J. Assoc. Off. Analyt. Chem.*, v. 58, p. 163-164, 1975.

RAMOS, A.J.; HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rats small intestine. *Mycopathologia*, v.134, p.27-30, 1996.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*. v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B1 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 Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, vol. 48, p. 81-85, 1988.

SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, Seizi. *Fundamentos de Toxicologia*. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. p. 427-436.

SANTOS, C.C.M., LOPES, M.R.V. e KOSSEKI, S.Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto / SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.60, n.2, p. 153-157, 2001.

SARGEANT K, O'KELLY J, Carnaghan RBA, Allcroft R. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Veterinary Record* 1961; 73: 1219-23.

SCUCCEL, V. M.. *Micotoxinas em alimento*. Insular. Florianópolis. 1998.

STACK, M.E.; POHLAND, A.E. Collaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of aflatoxin. *J. Assoc. Off. Analyt. Chem.*, v. 58, p. 110 - 113, 1975.

SYLOS CM, Rodrigues-Amaya DB, Santurio JM, Baldissera MA. Occurrence of aflatoxins and cyclopiazonic acid in brazilian peanut and corn. In:IX International IUPAC Symposium. 1996. Rome. Italy. p.132.

DYCK, P.J. van; TOBBACK, P.; FEYS, M.; VOORDE, H. van de. Sensitivity of aflatoxin B1 to ionizing radiation. *Appl. Environ. Microb.*, v. 43, 1982.

VELASCO, J. Replacement of benzene as a solvent for aflatoxin standards. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, p. 938A-940A, 1981.

WYATT RD. Poultry. In: Smith JE & Henderson RS, ed. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Raton, Fl. 1991. p. 553-605.

ZAVIERO, D.; CONTRERAS, M. Impacto de hongos y micotoxinas em las aves. **Indústria Avícola**, Illinois, v.52, n.7, 2005.