

## Determinação de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro por cromatografia em camada delgada

Determination of aflatoxins in cashew kernels by thin layer chromatography

Ícaro Gusmão Pinto Vieira<sup>2</sup>, Francisco das Chagas Oliveira Freire<sup>3</sup>, Juliana Alves Andrade<sup>4</sup>, Francisca Noelia Pereira Mendes<sup>5</sup> e Maria da Conceição Nascimento Monteiro<sup>6</sup>

**Resumo** - Neste trabalho foi detectada, pela primeira vez no Brasil, a presença de aflatoxina B<sub>1</sub> em farinha de amêndoas de cajueiro. A quantificação confirmou níveis inferiores a 2x10<sup>-9</sup> kg kg<sup>-1</sup>, portanto, abaixo do nível máximo permitido pela legislação internacional. Neste trabalho, as amostras utilizadas foram de diversos tipos (W4; W3; G2; F2; G1; SP2; X1; W1-320; P1m; LW1; SP3) de amêndoas de cajueiro, obtidas de empresas dos Estados do Rio Grande do Norte e do Ceará. O objetivo deste trabalho foi adaptar o método de análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para amêndoas de cajueiro. As análises realizadas constaram da identificação das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> e sua respectiva quantificação, utilizando padrões de concentrações definidas de aflatoxinas comparando a cor da fluorescência e o valor dos Rfs. A CCD mostrou-se eficiente para trabalhos rotineiros de determinação de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro.

**Palavras chave:** Amêndoas de cajueiro. Aflatoxina B<sub>1</sub>. CCD.

**Abstract** - The presence of aflatoxin B<sub>1</sub> in cashew kernel flour was detected for the first time in Brazil. The quantification confirmed levels below 2x10<sup>-9</sup> kg kg<sup>-1</sup>. Therefore, it's below the minimum level permitted by the international law. In this work the used samples were from different types (W4; W3; G2; F2; G1; SP2; X1; W1-320; P1m; LW1; SP3) of cashew kernel obtained from companies in Rio Grande do Norte and Ceará. This work aimed to adapt the analysis method by Thin Layer Chromatography for cashew kernel. The analysis consists of the identification of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> and its respective quantification using defined concentration patterns of aflatoxins comparing the fluorescent color and Rfs value. The CCD showed efficient for the daily works of determination of aflatoxins in cashew kernel.

**Key words:** Cashew kernels. Aflatoxin B<sub>1</sub>. TLC .

---

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 07/08/2006; aprovado em 06/07/2007

<sup>2</sup> Eng. Químico, D. Sc., Prof. do CCT-UECE, Av. Paranjana 1700, CEP 60780.094, Fortaleza-CE, icarogpv@uol.com.br.

<sup>3</sup> Eng. Agrônomo, Ph. D., Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

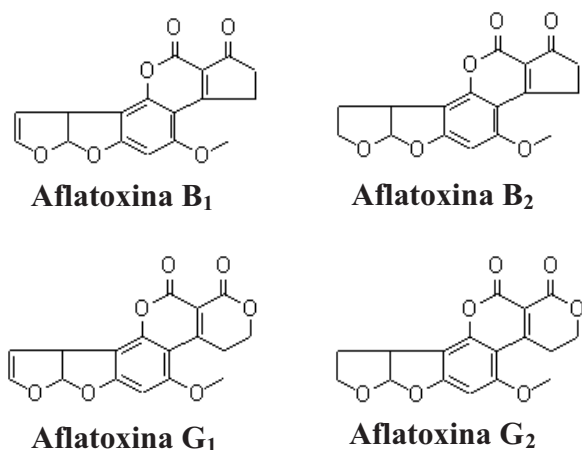
<sup>4</sup> Estudante de Engenharia de Alimentos - UFC

<sup>5</sup> Farmacêutica, D. Sc., Pesquisadora do Parque de Desenvolvimento Tecnológico/PADETEC/UFC, Fortaleza-CE

<sup>6</sup> Química Industrial, Técnica da Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial-NUTEC/LABCAJU, Fortaleza-CE

## Introdução

Em 1960 mais de 100.000 perus morreram na Inglaterra em um período de poucos meses, testes realizados revelaram que a toxina responsável pela mortalidade das aves era produzida por fungos presentes na torta de amendoim (GOLDBLAT, 1969). Estudos posteriores mostraram que as aflatoxinas são produzidas primariamente por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Esses estudos revelaram que as aflatoxinas representam um grupo de aproximadamente 20 metabólitos, embora normalmente somente as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> sejam encontradas como contaminantes diretos em alimentos. Essas toxinas possuem estruturas muito semelhantes e ocorrem como compostos heterocíclicos altamente oxigenados (HEATHCOTE; HIBBERT, 1978) (Figura 1).



**Figura 1-** Estruturas químicas das quatro principais aflatoxinas

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo (FONSECA, 1976). Programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária (PEREIRA; TOLEDO, 1995; FAO/WHO, 2001; BENTO et al., 1989). Diante dos resultados obtidos, cada país tem tentado definir regulamentações, sendo considerados aspectos relacionados à saúde pública (BENTO et al., 1989), políticos e econômicos (VAN EGMOND; DEKKER, 1995). A União Européia adotou o limite de tolerância máximo de  $2 \times 10^{-9}$  kg kg<sup>-1</sup> para a aflatoxina B<sub>1</sub> e de  $4 \times 10^{-9}$  kg kg<sup>-1</sup> para as aflatoxinas totais (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>) em amendoim, amêndoas, nozes em geral e frutas secas para consumo direto ou como ingrediente de alimentos (LEGISLAÇÃO DA COMUNIDADE EUROPÉIA,

2003). Assim, para exportação de amêndoas de cajueiro, os principais produtores de castanha têm como exigência, além das análises físico-químicas usuais, a determinação do teor de aflatoxinas em amêndoas.

Para determinação quantitativa e qualitativa de aflatoxinas em amêndoas, existem métodos em compêndios internacionais, mas não existe uma metodologia específica para amêndoas de Cajueiro, sendo necessária a adaptação do método oficial além de sua validação.

Estudos conduzidos em amêndoas de cajueiro no Brasil revelaram a presença de 80 diferentes espécies de fungos, 18 espécies de bactérias e 1 espécie de levedura. Dentre as espécies fúngicas identificadas várias são potencialmente aflatoxigênicas (FREIRE; KOZAKIEWICZ, 2005).

Com relação aos métodos de análise para controles eficientes de aflatoxinas em amêndoas são requeridas elevada sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão, além de limites de detecção e quantificação suficientes para avaliação das baixas concentrações em que estas micotoxinas são encontradas (DOMINGUEZ et al., 1987). Os métodos para a determinação de aflatoxinas em amêndoas utilizam, em sua maioria, extração com solventes orgânicos e purificação cromatográfica em fase sólida ou imunoafinidade (DRAGACCI et al., 2001; KAMIMURA, 1985; MARKAKI; MELISSARI, 1997). Tanto a cromatografia em camada delgada (CCD) quanto a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), se constituem em técnicas adequadas para separação, detecção e quantificação de aflatoxinas em amêndoas (VAN EGMOND, 1994). Embora outras técnicas mais complexas possam ser utilizadas (GILBERT, 1993; LESZCZYNSKA, 2001; KAMIMURA, 1996), os laboratórios selecionam as técnicas de acordo com sua situação econômica, objetivos da análise e capacidade dos analistas (CARRILO, 1996; DE SOUZA et al., 2003).

A CCD se constitui em técnica tradicional para determinação de micotoxinas, além de possuir grande importância histórica relacionada a essas substâncias. Graças à CCD as micotoxinas foram detectadas, isoladas e caracterizadas (DE SOUZA et al., 2003). AAOAC International recomenda essa técnica para determinação de aflatoxinas em diversos produtos (DE SOUZA et al., 2003). O baixo custo e a simplicidade são as principais vantagens dos procedimentos analíticos baseados na CCD. A capacidade de separação das micotoxinas dos componentes interferentes em placas de CCD confere um razoável nível de especificidade e sensibilidade ao método. Isso se deve ao fato de que a aflatoxinas fluorescem sob luz UV, o que permite que concentrações da ordem de nanogramas sejam detectadas em uma placa. A principal desvantagem

associada a essa técnica é a baixa repetibilidade associada à aplicação das amostras, desenvolvimento e etapas de interpretação, o que pode ser melhorado com a experiência dos analistas (COKER, 1984). Diversos autores destacam que estudos interlaboratoriais com livre escolha do método demonstraram que a experiência na determinação de aflatoxinas, uma análise difícil, é, pelo menos, tão importante quanto a escolha da técnica para obtenção de resultados confiáveis (STUBBLEFIELD; VAN EGMOND, 1989; DE SOUZA et al., 2003). Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo desenvolver e adaptar uma metodologia de análise em Cromatografia de Camada Delgada (CCD), de acordo com as normas oficiais da AOAC, tendo em vista a determinação qualitativa e quantitativa de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro, de acordo com as especificações exigidas pelo mercado internacional.

## Material e Métodos

**Amostras:** As amêndoas de cajueiro utilizadas neste trabalho foram obtidos junto a várias indústrias dos Estados do Rio Grande do Norte e do Ceará, sendo amostras correspondentes a lotes comerciais produzidos pelas mesmas indústrias e classificadas de acordo com normas internacionais: LW (super large wholes); W (wholes); SP (small pieces); P1 (first quality/large pieces); F (meal/fuor); X (small granules) (AFI, 1999). As amostras foram encaminhadas pelas indústrias para o LABCAJU (Laboratório de Análise para Certificação de Produtos do Caju da DITAL-NUTEC) para análise do teor de aflatoxinas e correspondem às amostras recebidas no período de Out/2005 a Maio/2006 (cerca de 50 amostras de várias classificações).

**Reagentes:** Os padrões de aflatoxinas utilizados foram da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA), mantidos sob temperatura de congelamento, devidamente protegidos da luz e vedados, até o momento da preparação das soluções. As soluções padrões foram preparadas e padronizadas em espectrofotômetro segundo AOAC (2002). Em seguida, foram armazenadas em frascos para padrão, de cor âmbar, devidamente vedados, sob temperatura de congelamento. A estabilidade das soluções foi monitorada, repetindo-se os procedimentos de padronização durante o período do experimento. Os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico da marca Vetec. As cromatoplasas utilizadas foram de sílica gel com camada de 250 µm e de 10 cm x 20 cm de tamanho, Merck (Darmstadt, Alemanha).

**Equipamentos:** Agitador Magnético Fisatom 752A; Banho-Maria Tecnal; Centrífuga Bio Eng BE 5000; Cromatovisor Ultra-Violeta Tecnal; Espectrofotômetro UV-

Visível Shimadzu 160A; Evaporador Rotatório Tecnal; Agitador Magnético Quimis 261.2; Moinho Tecnal Te-635; Cuba para Cromatografia Pyrex.

**Otimização do método:** O método otimizado foi baseado nos descritos pela AOAC (2002) e por Singh et al. (1991). No laboratório, cada amostra foi triturada em multiprocessador, passada em peneira de 20 mesh e três porções de 50 g retiradas para análise. As porções foram extraídas com metanol/água (60/40), em seguida o extrato foi filtrado e extraído com hexano. Da fase aquosa as toxinas foram extraídas com clorofórmio e quantificadas em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de sílica por comparação dos Rf's obtidos das amostras com os Rf's obtidos dos padrões conhecidos de micotoxinas. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra estudada.

**Procedimento Analítico:** O procedimento analítico estabelecido na otimização do método encontra-se detalhado a seguir:

**Moagem:** A amostra a ser analisada (aproximadamente 800 g) foi triturada em moinho e peneirada manualmente em peneira de 20 mesh, em seguida, colocada em saco plástico devidamente identificado.

**Extração:** As amostras já moídas e peneiradas (50 g) foram pesadas em um béquer de 100 mL, e cuidadosamente transferidas para um erlenmeyer de 500 mL. A seguir, 250 mL de uma solução metanol:água (60:40) foram adicionados. A mistura foi agitada por 30 minutos em agitador magnético. Após esse período ela foi deixada em repouso para decantar, filtrada em papel de filtração rápida (n° 1) para um erlenmeyer. Cerca de 125 mL do filtrado foi colocado em um funil de separação, sendo adicionado 30 mL da solução saturada de NaCl e 50 mL de hexano p.a. A mistura foi agitada e a fase hexânica foi separada. A fase aquosa (fase amarelada) foi agitada com 50 mL de clorofórmio. Após agitação, a mistura foi deixada em repouso até a separação das fases, quando, então, a fase clorofórmica foi separada e recolhida em um béquer e adicionado sulfato de sódio anidro. A mistura foi filtrada em papel de filtração lenta (n° 42) para um béquer de 100 mL. A fase clorofórmica filtrada foi concentrada até a secura em banho-maria. Ao resíduo da concentração foi adicionado 1 mL de clorofórmio e a solução obtida foi transferida para um ependorf com o auxílio da pipeta automática. Essa solução clorofórmica foi utilizada para aplicação na placa de sílica-gel.

**Procedimento de Aplicação na Placa:** A placa com sílica-gel foi ativada em estufa a 110 °C por 5 minutos, e em seguida, foram aplicados 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL das amostras e 1 µL dos padrões de Griseofulvina, aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>. Após a aplicação a placa foi eluída com toluol: acetato

de etila: ácido fórmico (TEF) (6:3:1). Após a eluição a placa foi seca e visualizada utilizando lâmpada de UV(365 nm). Pelo cromatograma obtido foram calculados os Rf's das amostras e dos padrões em relação à griseofulvina (Rfg; Fluorescência azul: B<sub>1</sub>(0,56), B<sub>2</sub>(0,39) e azul esverdeado: G<sub>1</sub>(0,32), G<sub>2</sub>(0,24). A determinação qualitativa foi feita pela comparação da fluorescência e dos Rf's das amostras em relação aos padrões. Uma vez que a amostra apresente Rf e coloração próxima ao padrão B<sub>1</sub> proceder com o teste de confirmação. Teste para Confirmação da Aflatoxina B<sub>1</sub>: A confirmação da presença de aflatoxina foi feita através da derivatização dos padrões e das amostras, com ácido trifluoracético (SINGH et al., 1991).

Em uma placa de sílica-gel foram feitas duas aplicações de 1 µL de griseofulvina, do padrão B<sub>1</sub> e da amostra que deu positivo no teste de identificação (de 5-20 µL). Em um dos spots de griseofulvina, padrão B<sub>1</sub> e amostra foram aplicados 2 µL de ácido trifluoracético. A placa cromatográfica foi aquecida em estufa a 105 °C por 2 minutos, retirada da estufa e após atingir a temperatura ambiente foi eluída com o mesmo eluente (TEF) anteriormente descrito. Os Rf's dos padrões, das amostras e dos padrões e amostras derivatizados, foram comparados utilizando-se a lâmpada de UV.

Se a amostra derivatizada apresentar o mesmo Rf e coloração que o Rf do padrão de B<sub>1</sub> derivatizado, indica que o teste confirma a presença da aflatoxina B<sub>1</sub>. Se a amostra derivatizada não apresentar o mesmo Rf e coloração indica que o teste não confirma a presença da aflatoxina B<sub>1</sub>.

**Quantificação:** Após a identificação da presença de alguma das aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) é necessário fazer a quantificação com uma nova aplicação do padrão de aflatoxina identificada e da amostra.

Na nova placa, foram aplicadas várias concentrações da amostra e do padrão obtido, com a concentração definida. Após a aplicação a placa foi eluída na mesma fase móvel descrita. Para o cálculo foi utilizada a concentração da amostra que mais se aproxima do padrão em relação à intensidade e tamanho do spot. Se os dados obtidos não forem suficientes para a quantificação, novas aplicações com diferentes concentrações devem ser feitas.

Cálculo:

$$\frac{S * Y * V}{W * Z} = 10^{-9} \text{ kgkg}^{-1} = \text{ppb}$$

Onde:

S = volume de aflatoxina padrão (µL)

Y = concentração da aflatoxina padrão (10<sup>-6</sup> g mL<sup>-1</sup>)

V = volume do solvente utilizado para a diluição final da

amostra (µL)

Z = volume da amostra (µL)

W = peso da amostra (g)

O volume do solvente utilizado para a diluição final é 1 mL, ou seja, 1000 µL.

## Resultados e Discussão

Conforme discutido anteriormente, a exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo. A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto (FONSECA, 1976). Programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária (CALDAS, 2002). Embora a presença de aflatoxinas em produtos agrícolas esteja reportada na literatura, principalmente para o amendoim e castanha do Brasil, apenas 4 artigos são encontrados na literatura descrevendo metodologias especificação ou resultados de análises para a amêndoas do cajueiro. Em trabalho utilizando coluna de imunoafinidade e CLAE, Leszczynska et al. (2000) determinaram a presença de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro comercializadas na Polônia, o mesmo sendo reportado para esse produto na Escócia (PEARSON et al., 1999). Na Inglaterra, Freire et al. (1999) determinaram aflatoxinas por extração com acetona:água, purificação do extrato com SPE (solid phase extraction) e análise por CCD. Abdulkadar et al. (2000), determinaram aflatoxinas utilizando extração com clorofórmio, purificação com coluna de sílica gel e análise por CLAE.

Pelo exposto, todos os autores determinaram aflatoxinas em amêndoas de cajueiro por métodos de extração, purificação e análises diferentes.

Tendo em vista as exigências do mercado internacional, o LABCAJU-Laboratório de Análise para Certificação de Produtos do Caju da DITAL-NUTEC desenvolveu e adaptou uma metodologia de acordo com a AOAC (2002) e por Singh et al. (1991) para análise quantitativa e qualitativa de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro.

As amêndoas de cajueiro (cerca de 50 amostras de varias classificações) utilizadas neste trabalho foram obtidas junto a várias indústrias dos Estados do Rio Grande do Norte e do Ceará, sendo amostras correspondentes a lotes comerciais produzidos pelas mesmas indústrias e classificadas de acordo com normas internacionais: LW (super large wholes); W (wholes); SP (small pieces); PI (first quality/

large pieces); F (meal/fluor); X (small granules) (AFI, 1999). Após a moagem e amostragem, as castanhas foram extraídas com uma mistura metanol:água (60:40), filtradas e ao filtrado foi adicionado solução saturada de NaCl e a mistura extraída com hexano para remoção das gorduras.

O extrato aquoso desengordurado foi então extraído com clorofórmio para remoção das aflatoxinas. A fase cloroformica com as aflatoxinas foi seca, filtrada e concentrada. O resíduo obtido da concentração com as aflatoxinas foi diluído para 1 mL e submetido a análise por CCD, onde vários volumes dessa amostra são aplicados em uma placa de sílica gel, contendo os padrões aplicados com concentrações definidas. A placa cromatográfica foi então eluída e o resultado visualizado utilizando lâmpada de UV. Após determinação dos Rf's na amostra e nos padrões e visualização por comparação do Rf's e intensidade entre o cromatograma obtido na amostra e nos padrões, confirmou-se a presença das aflatoxinas na amostra. Após o ajuste nas concentrações ou volumes aplicados da amostra, e por comparação com a intensidade e tamanho dos spots obtidos com a amostra e os padrões foi possível calcular o teor de aflatoxinas presentes em cada amostra. Para o cálculo foi utilizado a concentração da amostra que mais se aproximava do padrão em relação ao tamanho e intensidade do spot. Caso os dados não fossem suficientes para a quantificação, novas aplicações com diferentes concentrações eram realizadas. Após esses ajustes foi possível determinar qual aflatoxina estava presente e então calcular sua concentração.

Assim as amostras (50) dos diversos tipos de castanha foram submetidas ao método descrito, mas somente nas amostras do tipo F<sub>2</sub> foi encontrada aflatoxina B<sub>1</sub> (0,22x10<sup>-9</sup> kg kg<sup>-1</sup>), porém, com teor abaixo da especificação permitida que é de 2x10<sup>-9</sup> kg kg<sup>-1</sup>. Para a confirmação da presença da aflatoxina B<sub>1</sub>, as amostras e os padrões foram derivatizados com TFA, analisados novamente, sendo aplicados em placa de sílica gel, e após a eluição foi feita a comparação dos seus Rf's. As amostras de amêndoas de cajueiro contaminadas com aflatoxinas foram as de tamanhos menores (farinhas), de acordo com a classificação internacional. Já com os outros tipos de amostras de amêndoas não foram encontrados nenhum tipo de aflatoxinas. É provável que essa contaminação tenha ocorrido durante o manuseio ou estocagem.

Os resultados obtidos neste trabalho, bem como os resultados obtidos por outros autores, demonstram que, aparentemente, amêndoas de castanha de cajueiro não se comportam como um substrato adequado à formação de aflatoxinas, a despeito do elevado número de fungos já isolado (FREIRE; KOZAKIEWICZ, 2005). Outras

commodities, tais como o amendoim e castanha-do-Brasil, por outro lado, exibem teores de aflatoxinas normalmente acima dos permitidos pela legislação nacional e internacional (CASTRILLON; PURCHIO, 1988; FREITAS; BRÍGIDO, 1998; FREIRE et al., 2000). Não obstante essa vantagem das amêndoas de cajueiro com relação à presença de aflatoxinas, os produtores brasileiros deverão enfrentar barreiras cada vez mais rígidas com relação à exportação de amêndoas, tanto para os USA como para os países da Comunidade Européia. A disponibilidade de um método fácil e rápido como o da CCD, conforme comprovado no presente trabalho, poderá ser de enorme valia aos exportadores, os quais disporão de um método para analisar com confiabilidade as amêndoas destinadas à exportação.

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade do método para amêndoas de cajueiro, no entanto, um universo maior de amostras deve ser testado, tanto com relação ao tipo de amêndoas quanto aos Estados e empresas produtoras, a fim de confirmar estes resultados, bem como permitir a generalização do método.

## Conclusão

O método descrito neste trabalho permite a determinação qualitativa e quantitativa de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro. Amêndoas de diversas classificações (tipos W4, W-3, G-2, F-2, G-1, SP2, X1, W1-320, P1m, LW-1, SP3), provenientes de empresas produtoras dos Estados do Rio Grande do Norte e do Ceará, foram analisadas e os níveis de contaminação encontrados não ultrapassaram os níveis máximos permitidos pela legislação européia (foi detectada apenas aflatoxina B<sub>1</sub> em farinha de amêndoa do tipo F<sub>2</sub>), não se constituindo em fator de risco para a população que consome este tipo de amêndoa regularmente. A conscientização dos produtores de alimentos e as ações de vigilância sanitária permanentes são essenciais para diminuir a exposição humana a esses compostos e prevenir doenças crônicas advindas dessa exposição.

## Referências

- ABDULKADAR, A. H. W.; AL-ALI, A.; AL-JEDAH, J. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. **Food Control**, v. 11, p. 157-160, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Washington: AOAC, 2002.

- Association of Food Industries of New York (Basic specifications for Brazilian cashews, AFI's definition of Brazilian cashew grades. Disponível em: <http://www.amberwoodtrading.com/Specifications/Cashews2\_BrazilianCashewsSpecs.aspx>. Acesso em: 30 maio 2006.
- BENTO, H.; FERNANDES, A. M.; BARBOSA, M. Pesquisa de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite corrente pasteurizado e em leite em pó. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 84, p. 163-171, 1989.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-23, 2002.
- CARRILO, A. E. C. Micotoxinas: calidad analítica y materiales de referencia. In: CRUZ, L. C. H. (Ed.). **Micotoxinas: perspectiva latinoamericana**. [S.l.]: Sociedade Latinoamericana de Micotoxicologia, 1996. p. 48-52.
- CASTRILLON, A. L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas em castanha do Pará (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.). **Acta Amazonica**, v. 18, p. 49 – 56, 1988.
- COKER, R. D. High performance liquid chromatography and other chemical quantification methods used in the analysis of mycotoxins in foods. In: GILBERT, J. (Ed.). **Analysis of food contaminants**. London: Elsevier, 1984. p. 207-263.
- De SOUZA; S. V. C.; VARGAS; E. A.; de CASTRO; L.; JUNQUEIRA, R. G. Validação interlaboratorial de método para determinação de Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite por cromatografia em camada delgada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 213-220, 2003.
- DOMINGUEZ, L.; BLANCO, J. L.; GOMEZ-LUCIA, E.; RODRIGUEZ, E. F.; SUAREZ, G. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products contaminated at low levels. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 70, p. 470-472, 1987.
- DRAGACCI, S.; GROSSO, F.; GILBERT, J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid milk: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v. 84, n. 2, p. 437-443, 2001.
- CE –Legislação da Comunidade Européia. Regulamento CE no 121/2003. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. [s.l.:s.n], 2003. (Diretiva das Comunidades Européias).
- FAO/WHO. Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives. **WHO-Technical-Report-Series**, v. 3, n. 906, p. 62, 2001.
- FONSECA, H. Estudo da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização. **Anais ESALQ**, v. 33, p. 365-405, 1976.
- FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, p. 13–19, 2000.
- FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins of Brazilian cashew kernels. **Mycopathologia**, v. 145, p. 95–103, 1999.
- FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z. Filamentous fungi, bacteria and yeasts associated with cashew kernels in Brazil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, p. 249 – 254, 2005.
- FREITAS, V. P. S.; BRIGIDO, B. M. Occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in peanuts and their products market in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 7, p. 807 – 811, 1998.
- GILBERT, J. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. **Food Additives Contaminants**, v. 10, p. 37-48, 1993.
- GOLDBATT, L. A. **Aflatoxin**. New York: Academic Press, 1969. p. 1-40.
- HEATHCOTE, J. G.; HIBBERT, J. R. **Aflatoxins: Chemical and biological aspect**. New York: Elsevier, 1978. 173-186p.
- KAMIMURA, H. **Problems of mycotoxin in food sanitation**. 2th ed. Tokyo: JICA, 1996. 52p.
- KAMIMURA, H. Simple rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 68, p. 458-461, 1985.
- LESZCZYNSKA, J.; KUCHARSKA, U. Z.; EGOTA, H. Aflatoxins in nuts assayed by immunological methods. **European Food Research Technology**, v. 210, p. 213–215, 2000.
- LESZCZYNSKA, J.; MASLOWSKA, J.; OWCZAREK, A.; KUCHARSKA, U. Determination of aflatoxins in food products by the ELISA method. **Journal of Food Science**, v. 19, n. 1, p. 8-12, 2001.
- MARKAKI, P.; MELISSARI, E. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in comercial pasteurized milk determined with ELISA and HPLC. **Food Additives Contaminants**, v. 14, p. 451-456, 1997.
- PEARSON, S. M.; CANDLISH, A. A. G.; AIDOO, K. E.; SMITH, J. E. Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 97–99, 1999.
- PEREIRA, M. L.; TOLEDO, M. C. F. Micotoxinas: impacto na saúde humana e animal e sua detecção pelo método de ELISA. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária-UFMG**, n. 13, p. 5-27, 1995.
- SINGH, K.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; MATHUR, S. B. **An Illustrated Manual on Identification of some Seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their Mycotoxins**. Denmark: Jordbrugsforlaget Frederiksberg, 1991. 133p.
- STUBBLEFIELD, R. D.; VAN EGMOND, H. P. Chromatographic methods of analysis for Aflatoxin M<sub>1</sub>. In: VAN EGMOND, H. P. (Ed.). **Mycotoxins in dairy products**. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 57-95.
- VAN EGMOND, H. P. Aflatoxins in milk. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Ed.). **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press, 1994. cap. 17, p 365 -381.
- VAN EGMOND, H. P.; DEKKER, W. H. Worldwide regulations for mycotoxins in 1994. **Natural Toxins**, v. 3, p. 332-336, 1995.