



Identificação de aflatoxinas em paçocas de amendoim comercializadas na cidade de Lavras-MG

Maéve Carvalho Ferreira ¹; Daniela Fernanda de Freitas ^{2,*}; Edimar Agnaldo Moreira ³

¹ Centro Universitário de Lavras, Curso de Graduação em Farmácia Generalista;

² Centro Universitário de Lavras, Curso de Graduação em Farmácia Generalista.

³ Faculdade de Ciências e Tecnologias de Campos Gerais, Curso de Graduação em Farmácia Generalista.

RESUMO

Os alimentos estão sujeitos à contaminação por substâncias químicas, dentre elas, as aflatoxinas, as quais são potencialmente carcinogênicas. A presença de tais substâncias nos alimentos constitui importante risco para a população, tanto humana quanto animal. Em meio aos vários fatores que danificam a qualidade de um alimento, merece ênfase a contaminação de grãos por micotoxinas, especialmente as aflatoxinas, que são metabólitos tóxicos de fungos como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, compondo um sério problema de saúde pública em diversas regiões do mundo. O objetivo deste estudo foi identificar a presença de aflatoxinas B1 e B2 em amostras de paçocas adquiridas no comércio da cidade de Lavras - MG, Brasil, no período de janeiro a junho de 2011. A técnica utilizada para a separação e identificação das substâncias foi a cromatografia em camada delgada com prévia extração, líquido-líquido, dos analitos. Os resultados demonstraram que as amostras de paçocas utilizadas neste estudo não apresentaram contaminações por aflatoxinas B1 e B2. Torna-se importante um maior conhecimento da presença destas micotoxinas em alimentos visto os riscos que as mesmas possam causar no organismo humano. Palavras-chave: Aflatoxinas. Alimentos. Contaminação. Cromatografia em camada delgada.

INTRODUÇÃO

Designa-se contaminante químico de alimento toda substância que não seja um de seus constituintes naturais, podendo se tornar parte do alimento durante sua produção, processamento ou armazenamento por fatores naturais ou artificiais, e que ofereça risco de gerar dano à saúde do consumidor (Midio & Martins, 2000; Rocha *et al.*, 2008).

Os alimentos, de modo geral, estão sujeitos à contaminação por estas substâncias. Pequenas modificações na composição química dos alimentos dadas pela decomposição, tratamento culinário ou tecnológico inadequado, falsificações e adulterações, poderão levar a efeitos nocivos aos organismos que os ingerem no decorrer do tempo e, uma vez que muitas delas são tóxicas, sua ingestão é capaz de causar sérios transtornos aos organismos, tanto humanos quanto animais (Sabino *et al.*, 1997, Rocha *et al.*, 2008)

Em meio aos vários fatores que danificam a qualidade de um alimento, merece ênfase a contaminação de grãos por micotoxinas, especialmente as aflatoxinas, metabólitos secundários tóxicos de fungos, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, que compõem um sério problema de saúde pública em diversas regiões do mundo (Oliveira *et al.*, 2009; Oliveira & Koller, 2011). Este grupo de micotoxinas apresentou maior impacto no desenvolvimento de pesquisas na área de micotoxicologia, devido à sua implicação, na década de 60, na morte de mais de 100.000 aves alimentadas com ração contaminada na Inglaterra (Sabino, 2008 *apud*, Oga, 2008).

O desenvolvimento de fungos não implica na presença de micotoxinas no substrato. Mesmo dentro de um gênero potencialmente toxigênico, isso não requer que todas as espécies produzam toxinas (Chelkowski & Lew, 1992; Bullerman & Tsai, 1994; Castro *et al.*, 1995; Taniwaki & Silva, 2001; Sabino, 2008 *apud* Oga, 2008). Por outro lado, a ausência de sinais aparentes de contaminação por fungos não significa que o alimento encontra-se livre de toxinas, já que elas podem permanecer no produto mesmo depois do desaparecimento dos fungos responsáveis por sua produção (Sabino *et al.*, 1997; Oliveira & Koller, 2011).

Autor correspondente: Daniela Fernanda de Freitas, Centro Universitário de Lavras, Curso de Graduação em Farmácia Generalista; Av. Dr. Lincoln Westim da Silveira 1540 Centro, Alfenas-MG, danielaffreitas@bol.com.br

Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras (Sylos *et al.*, 1996; Nordin & Luchese, 1998).

Estes efeitos sofrem influência do estado nutricional, gênero, idade, exposição a outros agentes químicos, dose e período de exposição à toxina, espécie, frequência e composição da dieta (Amado, 2002).

O termo aflatoxinas normalmente se refere aos quatro compostos do grupo bifuranocumarina, metabólitos produzidos por *Aspergillus flavus* e parasiticus: aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. (Sabino, 2008 *apud* Oga, 2008). Sendo que a aflatoxina B1 é classificada como potencialmente carcinogênica (Eaton & Groopman, 1994; Rocha *et al.*, 2008). A classificação das aflatoxinas é dada de acordo com a cor da fluorescência, em B (*blue-azul*) ou G (*green-verde*), sendo esta propriedade importante para sua identificação em diversos tipos de alimentos. São substâncias instáveis à luz, porém estáveis a temperaturas acima de 100°C (Rocha *et al.*, 2008).

Considerando que as aflatoxinas são altamente tóxicas e que os produtos alimentícios, como amendoim e derivados, compõem o substrato ideal para o crescimento de fungos, torna-se importante um maior conhecimento da presença destas micotoxinas em alimentos, visto os riscos que estas possam causar no organismo humano, e, com isso, à saúde humana.

O presente trabalho teve por objetivo analisar amostras de paçoca de amendoim comercializadas na cidade de Lavras - MG, Brasil, para identificar a presença de aflatoxinas AFB1 e AFB2 por cromatografia em camada delgada (CCD).

MATERIAL E MÉTODOS

As análises para a determinação de aflatoxinas em paçocas foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar de Química e Ciências Farmacêuticas do Centro Universitário de Lavras – Unilavras.

Os reagentes, com grau de pureza analítica, utilizados na extração foram: metanol e clorofórmio (Proquímios®), cloreto de potássio (Reagen®), sulfato de cobre (Merck®), ácido fórmico (Micro Bioquímica®), acetato de etila (CAAL®), tolueno (Isifar®) e celite. Placas cromatográficas de sílica (Cromatofolha de alumínio Alugran Gel 60 UV).

Foram encontradas e adquiridas em supermercados e bancas do mercado municipal de Lavras-MG, Brasil, no período de janeiro de 2011 a junho de 2011, três marcas diferentes de paçocas de amendoim, com ausência de sinais de contaminação e armazenadas à temperatura ambiente, classificadas da seguinte maneira: Marca 1, Marca 2 e Marca 3, apresentando-se em embalagens de 22g e 18g.

Foram utilizadas 42 amostras (embalagem com 50 unidades, total 2.100 unidades), da marca 1, um total de

24 amostras de paçocas ou 1.200 unidades, utilizou-se da marca 2, um total de 9 amostras ou 450 unidades de paçocas e, da marca 3, um total de 9 amostras ou 450 unidades de paçocas.

Cada amostra foi triturada e misturada, para evitar que possíveis contaminações, que não estivessem bem distribuídas, se homogeneizassem e assim obter uma amostragem expressiva. Desta amostra, foram amostradas 50 g para análise. Toda a análise foi realizada com fundamento no método da AOAC (International Official Methods of Analysis), conforme descrito na figura 1.

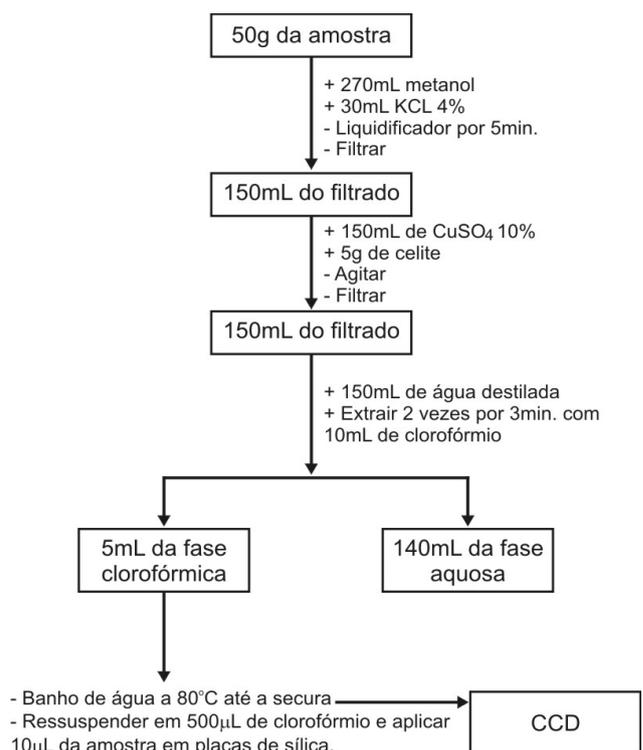


Figura 1 - Fluxograma da técnica de separação, extração e purificação para a determinação de aflatoxinas B1 e B2 em amostras de paçoca. Fonte - AOAC (International Official Methods of Analysis).

Soluções padrão de aflatoxinas a 1 mg/mL foram obtidas a partir da diluição de padrão primário de aflatoxinas B1, B2, (10 mg) da Sigma® em clorofórmio. A partir de diluições, foram obtidas as seguintes concentrações: B1 (1,00 µg.mL⁻¹), B2 (0,78 µg.mL⁻¹). Foram aplicados os volumes de 2,0 µL de cada solução padrão na cromatoplaça, juntamente com 10 µL de cada extrato.

O sistema solvente na cromatografia em camada delgada é empregado de forma combinada, sendo que a polaridade deste é fundamental. Foram testados 2 tipos de sistemas solventes para a eluição da amostra. O primeiro foi denominado como teste 1, sendo constituído por tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico (70:50:50:20); o teste 2 era constituído por tolueno: acetato de etila: ácido

fórmico (50:40:10). Estes sistemas foram avaliados para as análises de cada marca de paçoca em sextuplicatas e a detecção foi realizada por comparação visual da intensidade da fluorescência e o Rf das manchas frente à luz UV-365nm da amostra com o correspondente padrão de referência.

A aplicação da amostra foi realizada 2,0 cm acima da borda inferior da placa, a distância marcada previamente para a corrida do solvente foi de 10 cm. Um dado composto percorre sempre uma distância fixa em relação à distância percorrida pelo solvente. Esta relação é chamada de Fator de Retenção (Rf), que se determina usando a expressão:

$$Rf = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

A fim de analisar as diferenças estatísticas, foi utilizado o software estatístico (R Development Core Team, 2010) R. Retirando dos dados, médias, desvios padrão e variâncias. Além da comparação de médias e variâncias a um nível de significância de 95% (p>0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os sistemas solventes avaliados, o que apresentou resultado satisfatório foi o denominado teste 1, pois a intensidade das manchas dos padrões foram mais evidentes. O clorofórmio também foi utilizado como fase móvel por Prado *et al.*, 2008, na determinação de aflatoxina B1 em pimenta (*Piper nigrum L.*) e orégano (*Origanum vulgare L.*) por cromatografia em camada delgada e densitometria. Neste trabalho, foram analisadas amostras fortificadas com maior quantidade de anticorpos específicos para aflatoxinas de pimenta (19,46 µg/kg), obtido pela medida das áreas de fluorescência dos respectivos extratos aplicados na placa de cromatografia, em nenhuma das amostras analisadas foram observadas fluorescências características das aflatoxinas G1, B2 e G2 nos seus respectivos Rf.

De acordo com a expressão, têm-se os seguintes resultados de Rf das marcas analisadas: Quadro 1, 2, e 3.

Para os resultados das 3 marcas nas análises, o quadro 4 traz as médias, desvios padrão e variâncias dos resultados de Rf dos padrões B1 e B2 e das amostras analisadas.

Ao comparar as variâncias e médias foi constatado que são iguais entre as Rf dos padrões B1 e B2 nas amostras das 3 marcas nas análises, sendo que em todas as análises a hipótese de iguais variâncias e médias foram aceitas.

Caso houvesse sido detectada a presença de aflatoxinas, seria necessário realizar a confirmação das mesmas. Este procedimento é realizado aplicando 5 µL da amostra previamente processada e 5 µL da solução padrão de aflatoxinas, é adicionada 1 gota de ácido trifluoroacético em ambas aplicações (amostra e padrão), com posterior eluição e visualização sob luz ultravioleta (Macbinski Junior, 2008). Se a amostra derivatizada apresentasse o

Quadro 1: Resultado da análise 1 das três marcas de paçocas com os seus valores de Rf calculados comparados com o padrão B1 e B2. Fonte – Ferreira (2011).

Incidência de aflatoxinas em amostras de paçocas de amendoim comercializadas na cidade de Lavras - MG, no período de janeiro a junho de 2011.					
Amostra analisada	Distância percorrida pela amostra	Rf das amostras	Distância percorrida pelos padrões B ₁ e B ₂	Rf dos padrões B ₁ e B ₂	Amostras positivas
Marca 1	1- 5,0	1- 0,50	B1= 3,2	B1= 0,32	0
	2- 5,0	2- 0,50			
	3- 5,0	3- 0,50	B2= 2,8	B2= 0,28	
	4- 5,1	4- 0,51			
	5- 5,4	5- 0,54			
6- 5,5	6- 0,55				
Marca 2	1- 4,9	1- 0,49	B1= 3,5	B1= 0,35	0
	2- 4,8	2- 0,48			
	3- 4,9	3- 0,49	B1= 2,9	B2= 0,29	
	4- 4,9	4- 0,49			
	5- 5,0	5- 0,50			
6- 4,9	6- 0,49				
Marca 3	1- 4,8	1- 0,48	B1= 3,3	B1= 0,33	0
	2- 4,8	2- 0,48			
	3- 4,9	3- 0,49	B2= 2,6	B2= 0,26	
	4- 4,9	4- 0,49			
	5- 5,0	5- 0,50			
6- 5,0	6- 0,50				
Total de amostras analisadas:			9		

Quadro 2: Resultado da análise 2 das três marcas de paçocas com os seus valores de Rf calculados comparados com o padrão B1 e B2. Fonte - Ferreira (2011).

Incidência de aflatoxinas em amostras de paçocas de amendoim comercializadas na cidade de Lavras - MG, no período de janeiro a junho de 2011.					
Amostra analisada	Distância percorrida pela amostra	Rf das amostras	Distância percorrida pelos padrões B ₁ e B ₂	Rf dos padrões B ₁ e B ₂	Amostras positivas
Marca 1	1= 5,4	1= 0,54	B1= 3,0	B1= 0,30	0
	2= 5,1	2= 0,51			
	3= 5,2	3= 0,52	B2= 2,5	B2= 0,25	
	4= 5,0	4= 0,50			
	5= 5,0	5= 0,50			
6= 4,9	6= 0,49				
Marca 2	1= 5,4	1= 0,54	B1= 2,4	B1= 0,24	0
	2= 5,3	2= 0,53			
	3= 5,3	3= 0,53	B1= 1,6	B2= 0,16	
	4= 5,4	4= 0,54			
	5= 5,4	5= 0,54			
6= 5,3	6= 0,53				
Marca 3	1= 4,3	1= 0,43	B1= 2,2	B ₁ = 0,22	0
	2= 4,3	2= 0,43			
	3= 4,3	3= 0,43	B2= 1,9	B ₂ = 0,19	
	4= 4,4	4= 0,44			
	5= 4,4	5= 0,44			
6= 4,4	6= 0,44				
Total de amostras analisadas:			9		

Quadro 3: Resultado da análise 3 das três marcas de paçocas com os seus valores de Rf calculados comparados com o padrão B1 e B2. Fonte – Ferreira (2011).

Incidência de aflatoxinas em amostras de paçocas de amendoim comercializadas na cidade de Lavras - MG, no período de janeiro a junho de 2011.					
Amostra analisada	Distância percorrida pela amostra	Rf das amostras	Distância percorrida pelos padrões B ₁ e B ₂	Rf dos padrões B ₁ e B ₂	Amostras positivas
Marca 1	1= 4,8	1= 0,48	B1= 3,0	B1= 0,30	0
	2= 4,9	2= 0,49			
	3= 4,9	3= 0,49	B2= 2,3	B2= 0,23	
	4= 4,9	4= 0,49			
	5= 4,9	5= 0,49			
6= 5,2	6= 0,52				
Marca 2	1= 4,9	1= 0,49	B1= 2,3	B1= 0,23	0
	2= 4,9	2= 0,49			
	3= 4,9	3= 0,49	B2= 1,5	2= 0,15	
	4= 4,9	4= 0,49			
	5= 4,9	5= 0,49			
6= 4,9	6= 0,49				
Marca 3	1= 3,8	1= 0,38	B1= 2,4	B1= 0,24	0
	2= 3,8	2= 0,38			
	3= 3,9	3= 0,39	B2= 1,9	B2= 0,19	
	4= 3,8	4= 0,38			
	5= 3,9	5= 0,39			
6= 3,9	6= 0,39				
Total de amostras analisadas:			9		

Quadro 4: Resultado Das análises 1, 2 e 3 das três marcas de paçocas com os seus valores médios de Rf calculados comparados com o padrão B1 e B2. Fonte – Ferreira (2011). PM e AM correspondem a Padrão Marca e Amostra Marca respectivamente.

	Média	Desvio padrão	Variância
PM1B1	0,3066	0,0115	0,0001
PM1B2	0,2533	0,0251	0,0006
PM2B1	0,2733	0,0665	0,0044
PM2B2	0,2000	0,0781	0,0061
PM3B1	0,2633	0,0585	0,0034
PM3B2	0,2133	0,0404	0,0016
AM1	0,5066	0,0200	0,0004
AM2	0,5044	0,0214	0,0004
AM3	0,4366	0,0445	0,0019

mesmo Rf e coloração que o Rf dos padrões de B1 e B2 derivatizados, indicaria a confirmação da presença das aflatoxinas B1 e B2. Os resultados apresentados sugerem que as amostras de paçocas analisadas estavam livres de contaminação de aflatoxinas B1 e B2.

As fotos de comparação visual da intensidade da fluorescência e o Rf das manchas frente à luz UV-365nm da amostra com o correspondente padrão de referência são apresentadas nas figuras 2, 3 e 4.

A presença de micotoxinas em alimentos tem sido correlacionada a várias patologias humanas, e as autoridades de saúde no mundo todo têm praticado ações para diminuir a ingestão desses compostos pela dieta (Caldas *et al.*, 2002).

A exposição humana às 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 de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para se estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária (Caldas *et al.*, 2002).

Na literatura, existem diferentes formas de estimar a população de micotoxinas. Os trabalhos têm utilizado como ferramenta o levantamento de dieta nacional dos países, aplicação de questionário referente ao consumo, acompanhamento de dieta de grupos reduzidos e a mensuração de níveis de contaminação em alimentos (Carvalho, 2005; Rocha *et al.*, 2008).

Apesar dos resultados negativos deste trabalho, provavelmente devido às boas práticas agrícolas dos grãos empregados na produção e armazenamento das amostras de paçocas utilizadas em questão, a literatura apresenta resultados com incidência relativamente alta na contaminação do amendoim. O amendoim naturalmente favorece o crescimento de fungos, principalmente quando este é batido, ensacado e armazenado com umidade elevada. Este tipo de resultado foi evidenciado por Oliveira e Koller (2011), que demonstra a presença de *Aspergillus* spp e de aflatoxina nos grãos, mas não em paçocas.

O método analítico composto pela cromatografia em camada delgada, com anterior extração líquido-líquido, tem se mostrado satisfatório para a determinação de aflatoxinas



Figura 2: Foto da marca 1 da análise 3 em CCD lida no UV. Fonte – Ferreira (2011).



Figura 3: Foto da marca 2 da análise 3 em CCD lida no UV. Fonte – Ferreira (2011).

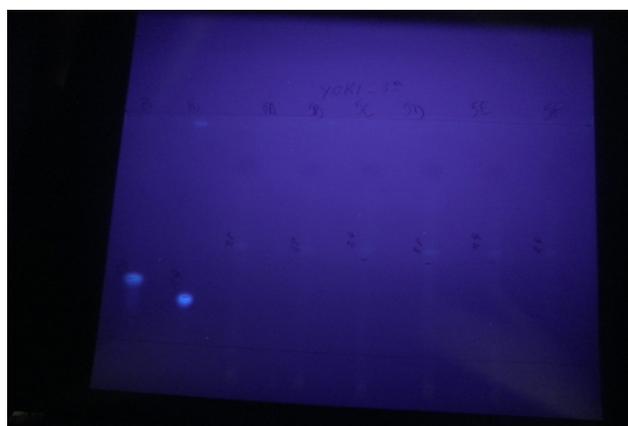


Figura 3: Foto da marca 3 da análise 3 em CCD lida no UV. Fonte – Ferreira (2011).

em amendoim e paçocas. A CCD é a técnica de referência para a maioria dos laboratórios brasileiros porque não necessita de equipamentos onerosos e é confiável (Soares & Rodriguez-Amaya, 1989). Esta técnica ainda permite a separação eficaz dos compostos, o que torna este método muito útil na caracterização das aflatoxinas.

Este método também foi utilizado por Amaral e Machinski Junior, 2007, em métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados. Rocha *et al.* (2008), também utilizaram a cromatografia como técnica de separação na incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. Neste trabalho, obteve-se 8 amostras positivas (38%) em 21 amostras de amendoim analisadas e 2 amostras positivas (13%) em 15 amostras de paçocas analisadas.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem que as amostras de paçocas de amendoim utilizadas neste estudo estavam livres de contaminação por aflatoxinas B1 e B2. Para afirmar a presença de aflatoxinas, as manchas das amostras deveriam ter a mesma intensidade comparada com o padrão de referência, o que não foi verificado nas placas. Ainda, de acordo com a comparação dos valores de Rf dos padrões, pode-se admitir a ausência de aflatoxinas B1 e B2 nas amostras.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário de Lavras (Unilavras-MG) pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e à profa. Dra. Patrícia Penido Maia (Unifal-MG) pelo auxílio teórico e técnico.

ABSTRACT

Identification of aflatoxins in peanut candy "paçoca" marketed in Lavras-MG, Brazil

The food can be subject of chemicals contamination, including aflatoxins, which are potentially carcinogenic. The presence of such substances in food is a serious risk to both human and animal population. Among many factors that damage the quality of food, the contamination of grain with mycotoxins deserves emphasis, particularly aflatoxins, which are toxic metabolites of fungi mainly *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, which represent a serious public health problem. The aim of this study was to determine the presence of aflatoxins B1 and B2 in samples of the peanut candy called "paçoca", acquired randomly in the city of Lavras - MG, Brazil, from January to June in the year 2011. The separation and identification of substances were performed by thin layer chromatography with prior liquid-liquid extraction. The obtained results showed

that the samples showed no contamination by aflatoxin B1 and B2. A greater knowledge of the presence of these mycotoxins in foods is important because of the risks for the human body.

Keywords: Aflatoxins. Food. Contamination. Thin layer chromatography.

REFERÊNCIAS

AOAC International Official Methods of Analysis. 16th ed. Washington, DC : AOAC; 1999;2:2-28.

Amado M A. Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes. Millenium. Revista do ISPV . 2002;26:57-60.

Amaral K A S, Machinski Junior M. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. Rev Anal. 2006;24:60-61.

Caldas E D, Silva S C, Oliveira J N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. Rev Saúde Pública. 2002;36(3):319-23.

Carvalho APP. Aflatoxinas: ocorrência, distribuição e estimativa de ingestão através de produtos de amendoim na cidade de Piracicaba - São Paulo. [Tese] Piracicaba:Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

Eaton D L, Groopman J D. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. San Diego (CA): Academic Press; 1994.

Fonseca H. Estudo da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização. Anais ESALQ. 1976;33:365-405.

Midio A F, Martins D I. Toxicologia de Alimentos. São Paulo: Varela; 2000.

Nordin N, Luchese R H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (Zeamays), destinado à alimentação animal. Bol Soc Bras Ciênc Tecnol Aliment. 1998;32(1):35-9.

Oga, Seizi. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu; 2008. 474 p.

Oliveira C A F, Gonçalves N B, Rosim R E, Fernandes A M. Determination of Aflatoxins in Peanut Products in the Northeast Region of São Paulo, Brazil. Int. J. Mol. Sci. 2009;10:174-83.

Oliveira L S F, Koller F F C. Ocorrência de *Aspergillus* spp. e Aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. Rev Ciên Ambien. 2011;5:57-68.

Rocha M D, Maia P P, Rodrigues M A C, Martins I. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. Rev Bras Toxicol. 2008;1:15 -9.

Sabino M, Milanez T V, Lamardo L C A, Navas A S, Stofer M, Garcia C B. Evaluation of the efficiency of two immunoassay kits for detection of aflatoxin B1 in corn,

fish feed, peanuts and its products. *Ciênc Tecnol Aliment.* 1997;107-10.

Soares L M V, Rodriguez-Amaya D. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem.* 1989;72(1):22-6.

Sylos C M, Rodriguez-Amaya D B, Carvalho P R N. Occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. *Food Addit Contamin.* 1996;13(2):169-72.

Taniwaki M H, Silva N. *Fungos em alimentos: ocorrência e detecção.* Campinas, SP: Núcleo de Microbiologia/ITAL; 2001. 82 p.

Recebido em 02 de julho de 2013

Aceito em 22 de janeiro de 2014