

DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ EM PIMENTA (*Piper nigrum* L.) E ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E DENSITOMETRIA

Guilherme Prado*, Marize Silva de Oliveira, Ana Paula Aprígio Moreira, Adriana de Souza Lima, Robson de Assis Souza e Matheus do Carmo Alves

Serviço de Ciências Bioquímicas, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, 30510-010 Belo Horizonte – MG, Brasil

Recebido em 8/1/07; aceito em 6/9/07; publicado na web em 10/3/08

DETERMINATION OF AFLATOXIN B₁ IN PEPPER (*Piper nigrum* L.) AND OREGANO (*Origanum vulgare* L.) BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AND DENSITOMETRY. An analytical study based on extraction with methanol-water, immunoaffinity cleanup and separation, identification and quantification of aflatoxin B₁ by thin-layer chromatography, in ground black and white pepper and oregano was carried out. Validation of the applied methodology was done through accuracy and precision studies. Recoveries of aflatoxin B₁ and relative standard deviations, from spice samples spiked at levels from 4.86 to 97.70 µg/kg, were, respectively, higher than 72% and lower than 20%. Application to spice samples available in Minas Gerais state, purchased at popular markets, showed no contamination with aflatoxin B₁.

Keywords: aflatoxin B₁; methodology; spices.

INTRODUÇÃO

Fungos estão amplamente distribuídos no solo, plantas, matéria orgânica em decomposição, água, ar e poeira. Conseqüentemente, produtos não processados de origem animal e vegetal podem tornar-se contaminados com uma ampla variedade de espécies fúngicas. Os condimentos são produzidos em países de clima tropical que apresentam elevados valores de temperatura, umidade e índices de pluviosidade. Frequentemente, os condimentos permanecem no solo para secagem à temperatura ambiente, onde as condições climáticas favorecem o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas.¹⁻³

Micotoxinas são metabólitos tóxicos do metabolismo secundário de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Existem descritas cerca de 400 micotoxinas, sendo as mais comuns as aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisina, desoxivalenol, patulina, toxina T-2 e zearalenona.⁴ As micotoxinas têm sido detectadas em vários alimentos de muitas partes do mundo, inclusive no Brasil, e são consideradas como um dos mais perigosos contaminantes de alimentos e rações animais.^{5,6}

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) representam a principal classe e são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, sendo frequentemente encontradas em amendoim, pistache, cereais, milho, arroz e figo. Os efeitos tóxicos das aflatoxinas incluem atividade imunossupressora, mutagênica, teratogênica e hepatocarcinogênica. A aflatoxina B₁ é o mais potente hepatocarcinógeno descrito em mamíferos e é classificada no Grupo 1 (provável carcinógeno) pela "International Agency of Research on Cancer"^{7,8}.

Diferentes condimentos, tais como, pimenta, páprica, orégano, cominho, gengibre, açafrão, são produzidos principalmente na Índia, Indonésia, Brasil, Marrocos, Malásia e Turquia, sendo mundialmente utilizados para aumentar e/ou acrescentar sabor ao alimento, e, secundariamente, com finalidade de conservação, devido a suas propriedades antioxidantes. Apesar de inúmeros trabalhos descritos na literatura relacionarem a ocorrência de aflatoxinas em diferentes tipos de alimentos, poucos descrevem sua presença em condimentos.^{2,3,5,9-14}

Tradicionalmente, métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas empregam extração das toxinas com solventes orgânicos, coluna de imunoafinidade, partição líquido-líquido ou coluna de fase sólida para a remoção de compostos interferentes e quantificação por cromatografia em camada delgada (CCD) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).^{4,15-19}

O monitoramento de aflatoxinas requer método simples, rápido, exato, preciso e sensível. Infelizmente, poucos trabalhos com estas características são descritos na literatura. Devido a sua especificidade, o emprego de coluna de imunoafinidade atualmente está bem difundido em diferentes tipos de alimentos, como café, cerveja, leite, queijo, suco de maçã, iogurte e matrizes complexas como salsa e plantas medicinais.²⁰⁻³¹

O objetivo desse trabalho foi avaliar o grau de contaminação com aflatoxina B₁ em amostras de pimenta (*Piper nigrum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) comercializadas no estado de Minas Gerais. Inicialmente, foram avaliados alguns parâmetros de um método analítico, utilizando extração com metanol-água, purificação em coluna de imunoafinidade e detecção e quantificação da aflatoxina B₁ por cromatografia em camada delgada/densitometria.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes

Os solventes utilizados para preparo da fase móvel: ácido fórmico, clorofórmio e tolueno (Merck, Darmstadt, Alemanha) e acetato de etila (CRQ, Diadema, Brasil) foram de grau analítico. O metanol empregado para extração da aflatoxina foi grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemanha). O Tween 20 foi grau analítico Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro). A água utilizada no preparo da solução de extração foi obtida por sistema de purificação e filtração Milli-Q de resistividade 18 MΩ cm⁻¹ (Millipore, Bedford, MA, USA).

Aflatoxina B₁ foi adquirida da Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO e diluído em benzeno:acetonitrila (98:2 v/v), grau cromatográfico. O benzeno da Tedia (Fairfield, OH, USA) e a acetonitrila, da Merck (Darmstadt, Alemanha).

*e-mail: gui@funed.mg.gov.br

A coluna de imunoafinidade utilizada foi a Aflatest WB, G1024, da Vicam, Watertown, USA. A estocagem das colunas foi em temperatura entre 2 e 8 °C e utilizadas à temperatura ambiente.

As placas de cromatografia de camada delgada empregadas foram obtidas da Merck (Darmstadt, Alemanha): cromatofolha de alumínio, sílicagel 60, sem indicador fluorescente, 20 x 20 cm e espessura de 250 µm.

Todo o material de vidraria utilizado na determinação de aflatoxina foi descontaminado com Extran Alcalino MA 01, 7555 (Merck, Darmstadt, Alemanha), a 20%, (pH >12) permanecendo em contato durante 24 h e posterior lavagem com água destilada.

Solução padrão de aflatoxina B₁

Solução padrão estoque de aflatoxina B₁ (13,43 µg mL⁻¹) foi preparada dissolvendo o padrão sólido em benzeno:acetonitrila (98:2 v/v). A concentração exata foi medida em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, Shimadzu Scientific Instrument, Japão.³² Uma solução padrão intermediária foi preparada diluindo 1 mL da solução estoque com 10 mL de benzeno:acetonitrila (98:2 v/v). Esta solução foi utilizada para a elaboração da curva de calibração, aplicando-se na placa de cromatografia de camada delgada volumes que variaram de 2 a 5 µL. Para os ensaios de fortificação foi utilizada uma solução de aflatoxina B₁ em benzeno:acetonitrila (98:2 v/v) em uma concentração de 9,73 µg mL⁻¹. Todas as soluções foram acondicionadas em frascos âmbar a -18 °C.

Amostras

Um total de 30 amostras de pimenta do reino e 20 de orégano moídas foram coletadas pela Vigilância Sanitária (MG) em supermercados e mercearias de diferentes municípios do estado de Minas Gerais, no período de março de 2006 a julho de 2007.

Extração e purificação

Amostras de pimenta (50 g) e orégano (25 g) foram extraídas com 250 mL de uma mistura de metanol:água (60:40) e 4 g de NaCl, sob agitação durante 60 min, seguida de ultrassom por 15 min. Após filtração em papel Whatman 4 e microfibras Whatman GF-B 47 mm, 10 mL e 25 mL dos extratos de pimenta e orégano, respectivamente, foram diluídos com 10 e 25 mL, de Twenn 20%. Após agitação, a totalidade da mistura foi passada através de uma coluna de imunoafinidade, contendo anticorpos específicos para aflatoxina, em um fluxo de 2-3 mL/min. Posteriormente a coluna foi lavada com 20 mL de água destilada, seca, sendo a aflatoxina B₁ eluída com 3 x 2 mL de metanol. Seguiu-se evaporação do metanol até resíduo (± 50 °C), em atmosfera de nitrogênio e ressuspensão em 200 µL de benzeno:acetonitrila (98:2 v/v). Este procedimento analítico faz parte do Manual de Instruções da Vicam para quantificação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em condimentos. Foi alterada a proporção da mistura de extração metanol:água (de 80:20 para 60:40) e utilizada uma coluna de imunoafinidade com maior quantidade de anticorpos específicos para aflatoxinas: a coluna WB G1024 da Vicam ao invés da Aflatest,³³ conforme descrito na parte experimental (Reagentes).

Cromatografia em camada delgada – densitometria

A aflatoxina B₁ foi separada e identificada por cromatografia em camada delgada, em placa de sílica gel 60 G, 20 x 20 cm, utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20 v/v/v/v). Foram aplicados 5, 10, 20 e 30 µL

dos extratos das amostras e 2, 3, 4 e 5 µL da solução padrão intermediária de aflatoxina B₁ (1,343 µg mL⁻¹). Após eluição a placa foi seca em estufa a 105 °C durante 10 min e examinada visualmente em luz ultravioleta a 366 nm (Cromatovisor – UV-Betrachter, Suíça). A quantificação da aflatoxina B₁ foi feita por medidas das intensidades das fluorescências dos spots das amostras e de padrões, em densitômetro Shimadzu, modelo CS9301PC, com lâmpada de xenônio, 250-370 nm, em leitura linear, com feixe 0,4 x 5,0 mm e alta sensibilidade de fluorescência. Os níveis de aflatoxina B₁ nas amostras foram calculados a partir do cálculo das áreas dos picos das aflatoxinas referentes aos extratos das amostras e da solução padrão de aflatoxina B₁.

Características de desempenho da metodologia analítica

Linearidade

A linearidade foi avaliada na faixa de 2,7 a 6,7 ng, a partir da solução padrão intermediária de aflatoxina B₁ de 1,343 µg mL⁻¹ e calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Foi utilizado o coeficiente de correlação linear (r²) como indicador da reta como modelo matemático.³²

Recuperação

Os estudos de recuperação foram realizados após fortificação de amostras em que não foram detectadas aflatoxinas com solução padrão de aflatoxina B₁ em benzeno:acetonitrila (98:2 v/v) em uma concentração de 9,73 µg mL⁻¹. Para pimenta foram utilizados 6 níveis de contaminação em 4 repetições e para orégano, 4 níveis de contaminação em duplicata. A recuperação foi calculada pela relação entre a quantidade de toxina quantificada e a adicionada no início do procedimento analítico executado de forma completa.

Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção do equipamento foi considerado como sendo a menor concentração de aflatoxina B₁ em que o método distingue, com segurança, como sendo a resposta. A faixa empregada foi de 0,09 a 0,45 ng de aflatoxina B₁.

O limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser determinado com um nível aceitável de exatidão e precisão. É a capacidade de um método obter resultados próximos ao real e com baixa dispersão, executando o procedimento analítico de forma completa.³²

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o densitograma de uma curva padrão de aflatoxina B₁ e de amostras fortificadas de pimenta (19,46 µg/kg), obtido pela medida das áreas de fluorescência dos respectivos extratos aplicados na placa de cromatografia. Boa linearidade foi obtida entre fluorescência emitida e concentração de aflatoxina, demonstrada pelo valor do coeficiente de correlação (r²) superior a 0,99, conforme recomendado por Green.³⁴

Os níveis de contaminação de aflatoxina B₁ empregados e encontrados, a partir de amostras fortificadas, bem como os valores de recuperação e coeficientes de variação, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

O limite de detecção do equipamento baseado em 3 vezes o ruído do sinal foi de 0,54 ng/g.

Observa-se que os valores obtidos de recuperação para pimenta fortificada com aflatoxina B₁ variaram de 85 a 107% e de 72 a 96% para orégano. As modificações introduzidas, alteração na composição da mistura metanol:água e o tipo de coluna de imunoafinidade empregada, proporcionaram um aumento nos valores de recupera-

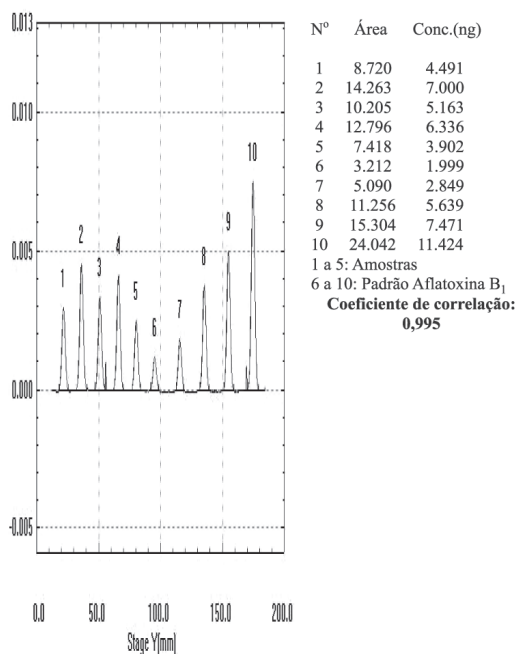


Figura 1. Quantificação da aflatoxina B₁ comparando as áreas das soluções dos extratos das amostras (1 a 5) e da curva padrão (6 a 10) por densitometria

Tabela 1. Resultados de recuperação para aflatoxina B₁ em amostras de pimenta do reino artificialmente contaminadas com diferentes concentrações de toxina

Quantidade adicionada (µg/kg)	Quantidade recuperada (µg/kg)	Média (µg/kg)	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
4,86	5,11	4,12	85	20,6
	4,50			
	3,22			
	3,64			
9,76	10,99	10,14	102	10,1
	10,58			
	10,33			
	8,65			
19,46	18,38	17,84	92	4,2
	18,51			
	17,60			
	16,88			
38,92	35,36	33,52	86	5,2
	34,66			
	31,98			
	32,10			
58,40	64,23	62,80	107	2,5
	62,46			
	60,72			
	63,78			
97,30	84,50	85,13	87	3,6
	82,75			
	89,65			
	83,65			

Limite de detecção: 2,5 µg/kg; Limite de Quantificação: 5 µg/kg; Média Geral de Quantificação: 93,2 %

Tabela 2. Resultados de recuperação para aflatoxina B₁ em amostras de orégano artificialmente contaminadas com diferentes concentrações de toxina

Quantidade adicionada (µg/kg)	Quantidade recuperada (µg/kg)	Média (µg/kg)	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
9,76	10,74	9,40	96	20,2
	8,06			
19,46	14,77	14,10	72	6,7
	13,43			
38,92	37,60	34,96	90	10,6
	32,33			
77,84	59,10	56,41	72	6,7
	53,72			

Limite de detecção: 5 µg/kg; Limite de quantificação: 10 µg/kg; Média geral de recuperação: 82,5%.

ção em relação ao método original, que eram de 76% para pimenta e 57% em orégano, para um nível de contaminação de 20 µg/kg de aflatoxinas.³³ Os valores de coeficientes de variação, em todos os níveis de fortificação, tanto para pimenta quanto para orégano, foram inferiores a 20%. Na análise de micotoxinas consideram-se como aceitáveis valores de recuperação no intervalo de 70 a 120% e coeficiente de variação inferior a 30%.^{35,36} Em função dos resultados obtidos, os limites de quantificação do método analítico para pimenta e orégano são, respectivamente, 5,0 e 10,0 µg/kg. Dessa forma, os limites de detecção serão 2,5 e 5,0 µg/kg para pimenta e orégano, respectivamente, conforme Green.³³ Esses valores atendem à Resolução nº 34/76 do Ministério da Saúde, que estabelece o limite máximo de 30 µg/kg de aflatoxinas em alimentos.³⁷

Nesse estudo, nenhuma das 30 amostras de pimenta e 20 de orégano estavam contaminadas com aflatoxinas. As características de desempenho do método analítico foram avaliadas apenas para a aflatoxina B₁ pelo fato de somente esta toxina estar incluída no Grupo 1 (provável carcinógeno). Entretanto, em nenhuma das amostras analisadas foram observadas fluorescências características das aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ nos seus respectivos R_f. Em Portugal, aflatoxina B₁ foi detectada em 3 das 7 amostras de pimenta branca analisadas, em níveis inferiores a 5,0 µg/kg.² Na Turquia, Erdogan³ avaliando a qualidade de 44 amostras de pimenta, detectou contaminação com aflatoxina B₁ em 11 amostras, utilizando cromatografia em camada delgada, na faixa de 1,1 a 97,5 µg/kg. Bircan,¹⁰ também na Turquia, detectou em 4 das 15 amostras de pimenta preta moída, aflatoxina B₁ em concentração inferior a 5,0 µg/kg. Em um levantamento de pimenta preta feito no Marrocos, Zinedine *et al.*¹¹ detectaram aflatoxina em 7 das 15 amostras, com níveis inferiores a 1,0 µg/kg. Fazekas *et al.*¹⁴ avaliaram, na Hungria, o conteúdo de aflatoxinas em 70 amostras de pimenta vermelha moída. Em 18 foi detectado aflatoxina B₁, e em 7 o nível foi superior a 5 µg/kg. No Brasil, Gatti *et al.*⁹ realizaram um monitoramento em duas das principais regiões produtoras de pimenta (Pará e Espírito Santo) e não detectaram aflatoxinas em 115 amostras de sementes secas de pimenta preta, utilizando a cromatografia em camada delgada como metodologia analítica. Resultados semelhantes foram encontrados por Freire *et al.*¹³ após analisarem 10 amostras de pimenta branca e preta da região da Amazônia. Semelhantemente, Elshafie *et al.*¹² em Omã não detectaram aflatoxinas em 105 amostras de condimentos, inclusive pimenta preta.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que não há evidência de contaminação por aflatoxina em pimenta e orégano. Entretanto, estudos com pimenta no Brasil revelaram uma alta conta-

minação com fungos toxigênicos produtores de aflatoxina. Gatti *et al.*⁹ detectaram em 99,1% das amostras analisadas fungos filamentosos, com 53,5% para o *Aspergillus flavus*. Foram isoladas 13 espécies de *A. flavus*, em um total de 56, capazes de produzir aflatoxinas, utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada. Da mesma forma, Freire *et al.*¹³ isolaram um total de 42 espécies em pimenta branca e vermelha, sendo o *A. flavus* o fungo mais frequentemente isolado (43,8%). Morais *et al.*³⁸ observaram, em Minas Gerais, que 56% das amostras de pimenta e orégano apresentavam contagens de fungos superiores a 5,0 x 10³ UFC/g, sendo o *A. flavus* o fungo mais isolado.

Ressalta-se, dessa maneira, a importância dos procedimentos de pós-colheita, tais como, técnicas de secagem e armazenamento de condimentos, que devem ser cuidadosamente controlados, para minimizar o crescimento de fungos e a possível produção de micotoxinas.

CONCLUSÃO

A metodologia empregada apresentou boa performance analítica para determinação de aflatoxina B₁ em pimenta e orégano.

A metodologia cumpre os limites estabelecidos pela legislação no Brasil para aflatoxina B₁ em alimentos.

Dada a importância da exposição humana à aflatoxina B₁ para a saúde pública e as condições climáticas do Brasil, que favorecem a produção de fungos e produção de micotoxinas, é necessário um constante monitoramento da qualidade dos alimentos oferecidos para os consumidores.

AGRADECIMENTOS

À FUNED (Fundação Ezequiel Dias), à Vigilância Sanitária do Estado de Minas Gerais pelo aporte financeiro e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa (G. Prado e M. S. de Oliveira) e de Iniciação Científica (R. A. Souza e M. do C. Alves).

REFERÊNCIAS

- Filtenborg, O.; Frisvad, J. C.; Thrane, U.; *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *33*, 85.
- Martins, M. L.; Martins, H. M.; Bernardo, F.; *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 315.
- Erdogan, A.; *Chemosphere* **2004**, *56*, 321.
- Zheng, M. Z.; Richard, J. L.; Binder, J.; *Mycopathologia* **2006**, *161*, 261.
- Abdulkadar, A. H. W.; Al-Ali, A. A.; Al-Kildi, A. M.; Al-Jedah, J. H.; *Food Control* **2004**, *15*, 543.
- Rodriguez-Amaya, D. B.; Sabino, M.; *Braz. J. Microbiol.* **2002**, *33*, 1.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST); *Mycotoxins: economics and health risks*, Ames, Iowa, 2003, Task Force Report 139.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) Em *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Lyon, 1993, vol. 56, 397.
- Gatti, M. J.; Fraga, M. E.; Magnolis, A. M.; Rocha Rosa, C. A.; *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 1120.
- Bircan, C.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2005**, *40*, 929.
- Zinedine, A.; Brera, C.; Elakhdari, S.; Catano, C.; Debegnach, F.; Angelini, S.; De Santis, B.; Faid, M.; Benlemlih, M.; Minardi, V.; Miraglia, M.; *Food Control* **2006**, *17*, 868.
- Elshafie, A. E.; Al-Rashdi, T. A.; Al-Bahry, S. N.; Bakheit, C. S.; *Mycopathologia* **2002**, *155*, 155.
- Freire, F. C. O.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R. M.; *Mycopathologia* **2000**, *149*, 13.
- Fazekas, B.; Tar, A.; Kovacs, M.; *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 856.
- Bradburn, N.; Coker, R. D.; Blunden, G.; *Food Chem.* **1995**, *52*, 179.
- Stroka, J.; Otterdijk, R.; Anklam, E.; *J. Chromatogr.* **2000**, *904*, 251.
- Stroka, J.; Anklam, E.; Jörissen, U.; Gilbert, J.; *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 320.
- Stroka, J.; Anklam, E.; *J. Chromatogr.* **2000**, *904*, 263.
- Akiyama, H. A.; Goda, Y.; Tanaka, T.; Toyoda, M.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *932*, 153.
- Prado, G.; Oliveira, M. S.; Abrantes, F. M.; Santos, L. G.; Veloso, T.; Barroso, R. E. S.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2000**, *20*, 192.
- Prado, G.; Oliveira, M. S.; Carvalho, E. P.; Oliveira Lima, L. C.; Veloso, T.; Souza, L. A. F.; Cardoso, A. C. F.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2003**, *23* (Supl.), 58.
- Prado, G.; Oliveira, M. S.; Abrantes, F. M.; Santos, L. G.; Soares, C. R.; Veloso, T.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1999**, *19*, 420.
- Prado, G.; Oliveira, M. S.; Pereira, M. L.; Abrantes, F. M.; Santos, L. G.; Veloso, T.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2000**, *20*, 398.
- Prado, G.; Oliveira, M. S.; Carvalho, E. P.; Veloso, T.; Souza, L. A. F.; Cardoso, A. C. F.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2001**, *60*, 147.
- Prado, G.; Oliveira, M. S.; Cunha, M. R.; Gomides, M. F.; Abrantes, F. M.; Santos, L. G.; Veloso, T.; Barroso, R. E. S.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2000**, *59*, 21.
- Martins, M. L.; Martins, H. M.; *Int. J. Food Microb.* **2004**, *91*, 315.
- Tassaneeyakul, W.; Razzazi-Fazeli, E.; Porasuphatana, S.; Bohm, J.; *Mycopathologia* **2004**, *158*, 239.
- Zhang, X.; Liu, H.; Chen, J.; *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, *43*, 47.
- Gómez-Catalán J.; Piqué, E.; Falcó, G.; Borrego, N.; Rodamilans, M.; Llobet, J. M.; *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 196.
- Ali, N.; Hashim, N. H.; Saad B.; Safan, K.; Nakajima, M.; Yoshizawa, T.; *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1763.
- Lino, C. M.; Baeta, L.; Pena, A. S.; Silveira, I. N.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 436.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008, 2003.
- VICAM; *Aflatest Instruction Manual*, 1999, p. 80-81.
- Green, J. M.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, A305.
- Horwitz, W.; Albert, R.; Nesheim, S.; *J. AOAC Int.* **1993**, *76*, 461.
- Horwitz, W.; Kamps, L. R.; Boyer, K. W.; *J. AOAC* **1980**, *63*, 1344.
- Brasil, *Diário Oficial da União*, 1977, Seç. I pt. I, p. 710.
- Morais, V. A. D.; Madeira, J. E. G. C.; Andrade, M. C.; Silva, L. F.; *Resumos do V Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia*, Florianópolis, Brasil, 2006.