

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AFLATOXINAS B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> DE *Aspergillus parasiticus* EM ALIMENTOS.**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AFLATOXINS B<sub>1</sub> AND B<sub>2</sub> OF *Aspergillus parasiticus* IN FOOD.**

**Categoria:** Artigo original

Fábio Dias Costa <sup>1</sup>  
Franciele Bona Verzeletti <sup>2</sup>  
Ricardo Wagner <sup>3</sup>

**RESUMO**

No Brasil, as Aflatoxinas são a únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos pela legislação. Estima-se que 35% dos casos de câncer estejam relacionados à dieta e a presença de Aflatoxinas em alimentos. O objetivo deste trabalho é demonstrar a incidência das Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em alimentos provenientes de 40 amostras (milho, amendoim e feijão) encontradas em centrais de distribuição de Curitiba. As amostras foram submetidas a identificação pelos Kits pelo Enviroligix ES 110 Pro 20 e Enviroligix AS 101 BG, e confirmadas por cromatografia em camada delgada de silicagel-G. Após as análises, verificamos a presença de *Aspergillus* em 60% das amostras, 35% das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, e 40% na CCD. Os resultados positivos de aflatoxinas nesta pesquisa reforçam a importância de fiscalização dos órgãos reguladores desse setor e orientação para medidas higiênico-sanitárias, prevenindo, assim, contaminações por essas micotoxinas.

1. Acadêmico do 8<sup>o</sup> Período do Curso de Biomedicina das Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL.
2. Biomédica, Mestre em Envelhecimento Humano, Professora das Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL.
3. Farmacêutico-Bioquímico, Doutor em Bioquímica, Professor da Universidade Federal do Paraná – UFPR.  
Endereço: R. Konrad Adenauer, 442 – Tarumã – Curitiba – Pr. E-mail: fabiodc123@gmail.com

**Descritores:** alimentos; aflatoxinas; cromatografia em camada delgada.

## **ABSTRACT**

In Brazil, Aflatoxins are the only mycotoxins whose maximum levels in foods are prescribed by the laws. It is estimated that 35% of cancers are related to diet and the presence of aflatoxins in food. The objective of this work is to demonstrate the incidence of Aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in food from 40 samples (corn, peanuts and beans) found in distribution centers in Curitiba. The samples were subjected to identification by Kit EnviroLogix ES 110 Pro 20 and EnviroLogix AS 101 BG, and confirmed by thin layer chromatography silica gel-G. After analysis, we found the presence of Aspergillus in 60% of the samples, 35% of aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>, and 40% in the TLC. The positive results of aflatoxins in this research reinforce the importance of regulatory oversight of the sector and guidance for hygienic-sanitary measures, thus preventing contamination by mycotoxins.

**Descriptors:** food; aflatoxinas; thin layer chromatography.

## **INTRODUÇÃO**

Um dos objetivos da saúde ambiental é a prevenção dos danos causados por contaminantes presentes no meio ambiente, fazendo com que os níveis dessas exposições sejam mantidos em valores que não constituam risco à saúde humana (1).

Os alimentos estão sujeitos à contaminação por substâncias tóxicas, e sua ingestão é capaz de ocasionar sérios transtornos ao organismo humano e animal (2).

Dentre estes contaminantes estão as micotoxinas, que são produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos e podem estar presentes em alimentos, como amendoim, milho, trigo, cevada, café, leite, arroz, farinhas, nozes, castanhas, frutas secas, entre outros <sup>(3)</sup>. Estas contaminações podem variar de acordo com as condições ambientais, processamento e armazenamento, assim como o tipo de alimento, uma vez que determinados grãos são substratos mais aptos para o crescimento de certos fungos <sup>(4)</sup>.

A contaminação de alimentos, tanto para consumo humano ou animal por micotoxinas representam perdas econômicas significativas, assim como representam sérios riscos a saúde <sup>(5)</sup>.

As micotoxicoses são ocasionadas pela ingestão de alimentos ou rações contaminadas com micotoxinas <sup>(3)</sup>, e o fungo *Aspergillus* é um dos principais gêneros fúngicos implicados neste tipo de intoxicação<sup>(2)</sup>. O gênero *Aspergillus* é caracterizado por apresentar conidióforos eretos, simples, com uma vesícula dilatada, globosa ou clavada na sua extremidade; sobre a vesícula são formadas as fiálides primárias e/ou secundárias (Figura 1), os conídios são hialinos, unicelulares, globosos e coloridos. As espécies de *A. flavus* apresentam cabeça radial verde-amarela com esporos espinhosos, e a *A. parasiticus* apresentam conidióforos menores que 500µm com cabeças verde-amareladas <sup>(6,7)</sup>.

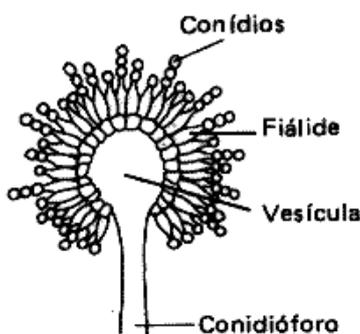


Figura 1. Estruturas Morfológicas do gênero *Aspergillus* (adaptado) <sup>(8)</sup>.

A origem da palavra “Aflatoxina” originou-se de “*Aspergillus flavus* toxina”, uma vez que o *A. flavus* e o *A. parasiticus* são as principais espécies responsáveis pela contaminação de culturas por estas micotoxinas <sup>(9)</sup>. Vários gêneros e espécies de fungos já foram relatados como produtores de Aflatoxinas, porém, atualmente, pode-se dizer que os grandes produtores pertencem às espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, ambas pertencentes ao grupo-espécie *A. flavus* <sup>(10)</sup>.

Entre as 16 toxinas cujas estruturas estão relacionadas, as Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Figura 2) são as de maior importância, pois são frequentemente encontradas e estudadas <sup>(11)</sup>. A Aflatoxina B<sub>1</sub> é particularmente a mais importante, uma vez que é a que apresenta a maior toxicidade e é um potente composto hepatocarcinogênico natural <sup>(3)</sup>.

Existem linhagens de *A. flavus* que não produzem aflatoxinas, outras que só produzem as do grupo B e outras que só produzem as do grupo G. Lin (1980), revisando vários autores, observou que embora todas as linhagens de *A. parasiticus* sejam produtoras de aflatoxinas, nem todas as de *A. flavus* são capazes de produzi-las. Além disso, o *A. parasiticus* é geralmente maior produtor de Aflatoxina do que o *A. Flavus*, e parece que todas as linhagens de *A. parasiticus* conhecidas são produtoras das quatro Aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), enquanto que as linhagens de *A. flavus*, frequentemente produzem somente as Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> <sup>(12)</sup>.

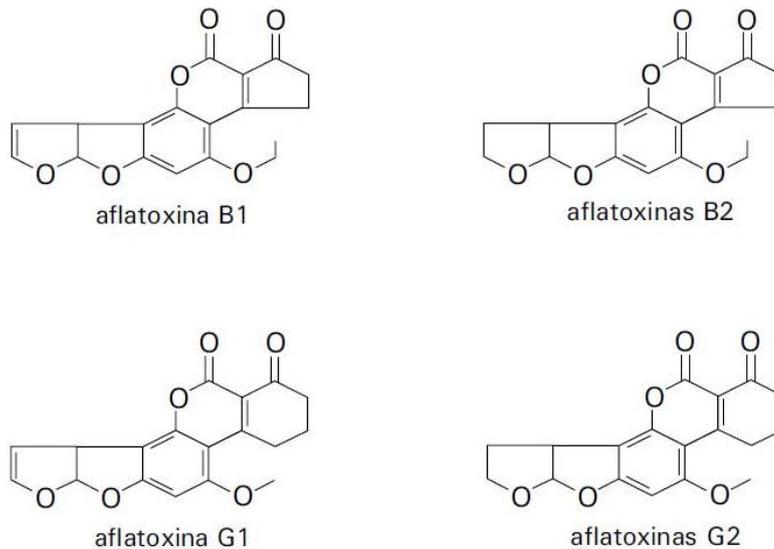


Figura 2. Estruturas químicas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Fonte: FREIRE et al., 2007) <sup>(13)</sup>.

Especialistas afirmam que a Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é, na realidade, um composto pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos <sup>(14, 15, 16)</sup>. A AFB<sub>1</sub> em sua forma ativada é o composto identificado como AFB<sub>1</sub>-epóxido, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB<sub>1</sub>. Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente através de ligações covalentes com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como DNA, RNA e proteínas <sup>(14)</sup>. Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas Aflatoxinas <sup>(15)</sup>. A AFB<sub>1</sub>-epóxido pode também ser conjugada enzimaticamente com a glutathione reduzida, através de glutathione-S-transferases, constituindo importante via de detoxificação deste composto <sup>(17)</sup>.

A ligação da AFB<sub>1</sub>-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB<sub>1</sub>. A formação de adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N<sub>7</sub>, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53 <sup>(15)</sup>. A ocorrência deste tipo

de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático (18,19, 20, 21).

A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica das Aflatoxinas. Esta capacidade tem sido demonstrada extensivamente, sobretudo em relação à AFB<sub>1</sub>, em muitas espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas <sup>(22)</sup>. Nestes animais, a AFB<sub>1</sub> induz à formação de carcinoma hepatocelular (CHC), mesmo quando ingerida em quantidades muito baixas, o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais <sup>(23)</sup>. Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como pâncreas e intestino, tem sido observado em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas <sup>(22)</sup>.

Em 2002, a IARC – *International Agency for Research on Cancer* considerou as Aflatoxinas como carcinogênicas para humanos (Grupo I) <sup>(24)</sup>. No Brasil, as Aflatoxinas são a únicas micotoxinas que tem níveis máximos estabelecidos em alimentos previstos pela legislação, o Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece o de 20 µg/kg de aflatoxinas totais para matérias-primas de alimentos e rações <sup>(25)</sup>.

Estima-se que 35% dos casos de câncer estejam relacionados à dieta. A presença de Aflatoxinas em alimentos é considerada um fato importante na produção de câncer hepático <sup>(26)</sup>.

Visto o potencial tóxico e a importância da pesquisa destas aflatoxinas em alimentos o presente trabalho tem como objetivo demonstrar a incidência das Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em alimentos provenientes de 40 amostras (milho, amendoim e feijão) encontradas em centrais de distribuição de Curitiba.

## **METODOLOGIA**

## Cultivo da Cepa ATCC

Utilizou-se como padrão para extração das Aflatoxinas a cepa ATCC de *Aspergillus parasiticus* (ARS Culture Collection 20011-501). Em câmara de fluxo devidamente esterilizada a cepa ATCC de *Aspergillus parasiticus* foi retirada de seu recipiente original, e colocada em um erlenmeyer de 250mL com 150mL do meio de cultura líquido, composto de Yeast Extract (extrato de Levedura) 3,0g, Malt Extract (extrato de malte) 3,0g, Dextrose 10 g, Peptone 5.0 g e Água 1000 mL, anteriormente autoclavado. Agitou-se por 12hs em agitador, aguardou-se a reativação e desenvolvimento da cepa ATCC de *Aspergillus parasiticus*.

A confirmação morfológica da cepa ATCC de *Aspergillus parasiticus* deu-se após o desenvolvimento da biomassa, onde se agitou o erlenmeyer por 5 minutos e retirou-se do meio líquido 20µL e inoculou-se no centro de uma placa de Petri com Ágar Batata e aguardou-se o desenvolvimento em temperatura ambiente, classificando-se seguindo as descrições contidas em RAPER e FENNEL (1967), conforme o desenvolvimento da colônia, observadas com microscópio munido de ocular de micrometria.

A confirmação bioquímica da cepa ATCC de *Aspergillus* deu-se pelo kit Envirologix ES 110 Pro 20 e a Confirmação da presença das Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> pelo kit Envirologix AS 101 BG.

A biomassa em meio líquido e meio sólido foi repicada semanalmente com objetivo de produção de um maior volume de biomassa, etiquetando e datando as mesmas.

## Extração das Toxinas da Cepa ATCC

Extraiu-se a toxina do micélio e do meio de cultura transferindo-se e filtrando-se em Büchner, sob papel filtro nº1. A partir do meio separado e filtrado foi retirada uma alíquota de 100 mL em 50mL de clorofórmio em funil de separação. A fase orgânica foi filtrada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e em seguida evaporada até a secura para posterior análise por CCD.

## Amostras

As amostras de milho, feijão e amendoim foram adquiridas nas centrais de abastecimento de Curitiba na quantidade de 300g cada. Foram analisadas 20 amostras de milho, 10 de feijão e 10 de amendoim.

Cada amostra foi identificada e triturada para uma espessura de 20 mesh, pesou-se 10g transferida para becker de 50 mL e adicionou-se 20mL de etanol PA,

Esta solução foi agitada sob agitação mecânica por 5 minutos e filtrou-se em Büchner, sob papel filtro nº1. A partir do filtrado a amostra foi submetida a confirmação da presença de *Aspergillus spp.* e das Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> pelos kit's Enviroligix ES 110 Pro 20 e Enviroligix AS 101 BG, seguindo as orientações do fabricante.

Após confirmação da presença de *Aspergillus spp.* e das Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, nas amostras proveniente dos alimentos, o etanol foi evaporado até a secura para análise por CCD, frente aos padrões de Aflatoxinas produzidas pela cepa padrão.

Para análise por CCD foi utilizada placa de silicagel-G de 0,5 mm de espessura, usando-se como fase móvel, clorofórmio, acetona e água (88 : 12 : 1,5) em seguida as placas forma observadas em câmara de luz ultravioleta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras de milho analisadas demonstradas na Tabela 1, pode se observar a positividade de 15 amostras, indicando uma contaminação de 75% por *Aspergillus*, percentual esse compatível com Asevedo et al. (1994), que pesquisaram a microbiota fúngica e espécies produtoras de aflatoxinas em 90 amostras de milho estocados em diferentes regiões do Brasil, a qual indicou o gênero *Aspergillus* em 72,2% das amostras <sup>(27)</sup>. Esse alto percentual de contaminação se deve ao fato de que fungos do gênero *Aspergillus*, normalmente, são encontrados no solo e em grãos armazenados <sup>(2)</sup>.

Para a presença das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, 11 amostras apresentaram resultados positivos (55%), valores estes quantificados como igual ou superior a 20 µg/kg e na CCD, 13 (65%) apresentaram positividade para aflatoxinas.

O Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece o de 20 µg/kg de aflatoxinas totais para matérias-primas de alimentos e rações <sup>(25)</sup>. Amaral et al. (2006) também observaram a ocorrência de aflatoxinas nos produtos à base de milho analisados em Maringá e Marialva, no estado do Paraná e concluíram que, devido ao elevado consumo de produtos à base de milho na região Sul do país, a Ingestão Diária Provável Média (IDPM) de AFB<sub>1</sub> estava acima da Ingestão Diária Tolerável (IDT), indicando risco para esta população <sup>(28)</sup>.

Tabela 1. Amostras de Milho submetidos aos kit Envirologix ES 110 Pro 20, kit Envirologix AS 101 BG e CCD.

Amostra	<i>Aspergillus spp</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub>	CCD
M1	+	-	-
M2	-	-	-
M3	+	+	+
M4	+	+	+

M5	-	-	-
M6	+	+	+
M7	+	-	+
M8	+	-	-
M9	+	+	+
M10	+	+	+
M11	+	+	+
M12	-	-	-
M13	+	+	+
M14	+	+	+
M15	+	-	+
M16	+	+	+
M17	-	-	-
M18	+	+	+
M19	+	+	+
M20	-	-	-

( + ) Amostra positiva para o teste.

( - ) Amostra negativa para o teste.

A incidência de contaminação de 60% das amostras de amendoim e para a presença do fungo *aspergillus* e de 20% para as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e na CCD apresentadas na Tabela 2, mostram que a contaminação por estas micotoxinas continua num patamar elevado, em relação aos níveis permitidos tanto no Brasil <sup>(25)</sup>, quanto na Comunidade Européia<sup>(29)</sup>. Esse nível de contaminação pode estar associado às condições climáticas (umidade e altas temperaturas), mas também às práticas inadequadas de agricultura e condições de estocagem já que o amendoim é um alimento que favorece o crescimento de fungos e a ocorrência de aflatoxinas, uma vez que possui uma composição ideal de nutrientes <sup>(30)</sup>.

Tabela 2. Amostras de Amendoim submetidos aos kit Envirologix ES 110 Pro 20, kit Envirologix AS 101 BG e CCD.

Amostra	<i>Aspergillus spp</i>	Aflatoxinas B1 e B2	CCD
A1	+	-	-
A2	-	-	-
A3	+	-	-
A4	-	-	-
A5	+	+	+
A6	-	-	-
A7	+	-	-
A8	+	+	+

A9	+	-	-
A10	-	-	-

( + ) Amostra positiva para o teste.  
 ( - ) Amostra negativa para o teste.

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam uma contaminação por *Aspergillus* em 30% das amostras de feijão e apenas 10% nos testes seguintes. Em estudos realizados por outros pesquisadores, amostras de feijão também apresentaram baixos níveis de aflatoxinas. Haydar et al. (1990) encontraram níveis de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nas concentrações de 0,19 ppb a 11,0 ppb. Cvetnic (1994) detectou aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, em feijões, também nas quantidades inferiores ao limite de 20 ppb. Mahmoud & Abdalla (1995) analisaram amostras de feijão e detectaram aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em concentrações inferiores a 30 ppb. Taguchi et al. (1995) não encontraram aflatoxinas em amostras de feijões<sup>(31)</sup>.

Tabela 3. Amostras de Feijão submetidos aos kit Envirologix ES 110 Pro 20, kit Envirologix AS 101 BG e CCD.

Amostra	<i>Aspergillus spp</i>	Aflatoxinas B1 e B2	CCD
F1	-	-	-
F2	-	-	-
F3	+	-	-
F4	+	+	+
F5	-	-	-
F6	+	-	-
F7	-	-	-
F8	-	-	-
F9	-	-	-
F10	-	-	-

( + ) Amostra positiva para o teste.  
 ( - ) Amostra negativa para o teste.

Do total das 40 amostras analisadas 24 apresentaram a presença de *Aspergillus* (60%), 14 foram positivas para as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (35%) e na CCD 16 amostras (40%) apresentaram traços característicos de aflatoxinas (Gráfico 1). Dentre as amostras que foram positivas para o fungo *Aspergillus*, 58,33% foram positivas para as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e 66,67% positivas na CCD.

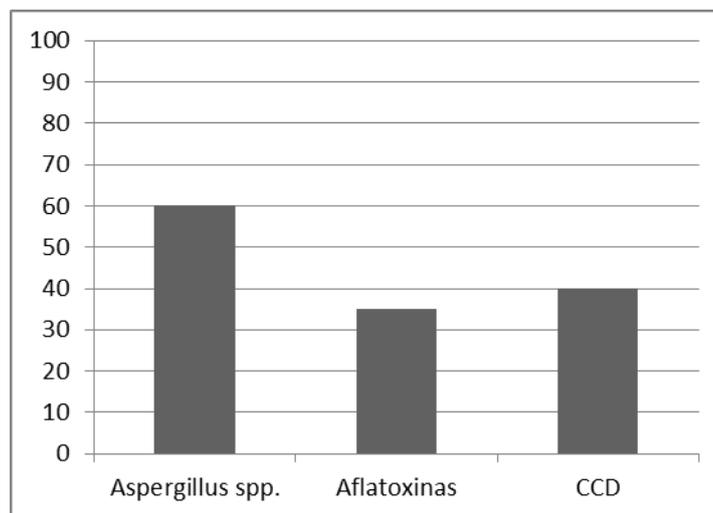


Figura 3. Percentual de testes positivos.

## CONCLUSÃO

Práticas agrônômicas e métodos de processamento, não eliminam ou previnem completamente as aflatoxinas em alimentos, assim a prevenção constitui a maneira mais eficiente para controlar a contaminação por fungos e a consequente produção de toxinas, controles estes que devem ser tomados durante as operações de colheita, na limpeza secagem e estocagem dos grãos.

Os resultados positivos de aflatoxinas nesta pesquisa reforçam a importância de uma fiscalização mais efetiva dos órgãos reguladores desse setor, o que contribuiria, sobretudo, orientar os diversos segmentos da cadeia produtiva a adotarem medidas higiênico-sanitárias para prevenir contaminações por essas micotoxinas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amorim LCA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2003; 6(2):158-170.
2. Oga S. Fundamentos de toxicologia. 2 ed. São Paulo (SP) Atheneu; 2003. p.501-517.
3. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003; 16(3):497-516.

4. Santurio JM. Micotoxinas e micotoxicoses nos Suínos. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007; 35:1-8.
5. Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001; 167:101-134.
6. Wicklow DT. Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. In: Diener UL, Asquith RL, Dickens JW. Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Alabama, Craftmaster Printers 1983; p.112.
7. Samson RA, Pitt JI. Modern Concepts in Penicillium and *Aspergillus* Classification. New York, Plenum Press 1990; p.478.
8. Minter DW, et al. Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* and *Penicillium*. In: Samson RA, Pitt JI. Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. New York, Plenum Press 1985; p.77- 82.
9. YU J. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 237(2):333–340.
10. Raper KB, Fennel DI. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.; 1967.
11. Goldblatt LA. Aflatoxin – Scientific Background, Control and Implications. New York: Academic Press 1969. p.13-54.
12. LIN MT. Biologia dos fungos toxigênicos. In: Encontro Nacional de Micotoxinas: Problemas e Soluções. São Paulo (SP): SBM 1982; p.11-22.
13. Freire FCO, et al. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza (CE) 2007; p.5-36.
14. Biehl ML, Buck WB. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. *J. Food Protec*, 1987; 50:1058-1073.
15. Hsieh DPH, Atkinson DN. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. *Adv. Exp. Med. - Biol.* 1991; p.36.
16. Wogan GN. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. *Prog. Clin. Biol. Res* 1992; 374:123-37.
17. Hayes JD, Judah DJ, McLellan LI, Neal GE. Contribution of the glutathione-S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. *Pharmacol. Ther.* 1991; 50:443-472.
18. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 1991; 350:429-31.
19. Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 1991; 51:5023-5044.
20. Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991; 338: 1356-1359.

21. Peers FG, Bosch FX, Kaldor J, Linsell A, Pluijmen M. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *Int. J. Cancer* 1987; 39:545-553.
22. Busby WF, Wogan GN. Aflatoxins. In: Searle CE. *Chemical carcinogens*. Washington, American Chemical Society 1984; 2:945-1136.
23. Coulombe RA. Aflatoxins. In: Sharma RP, Salunkhe DK. *Mycotoxins and phytoalexins.*, Boca Raton: CRC Press; 1991. p.103-43.
24. International Agency for Research on Cancer - IARC. Some Naturally Occurring Substance: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon: OMS 2002; p.1-33.
25. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002. Online. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 01 jun. 2013.
26. Caldas ED. et al. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos de risco para saúde humana. *Revista de Saúde Pública, São Paulo (SP)* 2002; 36(3):319-323.
27. Asevedo IG, Gambale W, Corrêa B, Paula CR, Almeida RMA, Souza VM. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. *Revista de Microbiologia, São Paulo (SP)* 1994; 25(1):46-50.
28. Amaral KAS, Nascimento GB, Sekiyama BL, Janeiro V, Machinski Junior M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas (SP)* 2006; 26(2):336-342.
29. Comunidade Européia. *Jornal Oficial da União Européia, Regulamento (CE) nº 2174/2003 da Comissão de 12 de dezembro de 2003.*
30. Rocha MD, Maia PP, Rodrigues MAC, Martins I. Incidência de Aflatoxinas em Amostras de Amendoim e Paçoca Comercializadas na Cidade de Alfenas –MG, Brasil. *Rev. Bras. Toxicologia* 2008; 21(1):15-19.
31. Silva JL, et al. Ocorrência de Aflatoxinas em Feijões Comercializados no Mercado Varejista de Goiânia-Go. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 2002; 32 (2):109-114.