

OCORRÊNCIA DE *Aspergillus* spp. E AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE AMENDOIM *IN NATURA* E PAÇOCAS

Letícia da Silva Favretto de Oliveira¹
Francisco Fernando de Castilho Koller²

RESUMO

Algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* são potenciais produtoras de aflatoxina, um metabólito secundário tóxico ao homem e animais, dentre elas, *A. flavus* e *A. parasiticus*, reconhecidos como aflatoxigênicos desde o início da década de 60. Nos humanos, as aflatoxinas são conhecidas por serem compostos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Este trabalho avaliou a presença de fungos e a produção de aflatoxinas em grãos de amendoim *in natura* destinados às indústrias gaúchas e em paçocas adquiridas em estabelecimentos comerciais em Porto Alegre. A análise fúngica foi realizada a partir do plaqueamento direto dos grãos e a detecção da presença das aflatoxinas através da cromatografia em camada delgada bidimensional. Constatou-se a ocorrência de *Aspergillus* spp em 67% das amostras de amendoim e 33% de paçocas, aflatoxinas foram detectadas em 58% das amostras de amendoim e 60% de paçocas. Os resultados evidenciaram relação entre a presença de *Aspergillus* spp e a presença de aflatoxina nos grãos, mas não em paçocas. Dentre as sete amostras de amendoim *in natura* contaminadas com aflatoxinas, duas ultrapassaram o limite permitido pela legislação.

Palavras-chave: *Aspergillus* spp., aflatoxinas, amendoim, paçocas, cromatografia

ABSTRACT

Occurrence of *Aspergillus* and aflatoxin in samples of peanuts *in natura* and peanut sweet. Some species of fungi of the genus *Aspergillus* are potential producers of aflatoxin, a secondary metabolite toxic to humans and animals, among them *A. flavus* and *A. parasiticus*, known as aflatoxigenics since the beginning of the decade of 60. In humans, aflatoxins are known to be mutagenic, carcinogenic, and teratogenic compounds. This study evaluated the presence of fungi and the production of aflatoxin in peanut kernels *in natura* destined to the

¹ Unilasalle – Canoas, RS, Curso de Ciências Biológicas.

E-mails para correspondência: leticiafavretto@uol.com.br

² Unilasalle, Ciências Biológicas, Av. Victor Barreto, 2288, CEP 9201-000, Canoas, RS

E-mail: koller@unilasalle.edu.br

southern industries and peanut sweet purchased in shops in Porto Alegre. The fungal analysis was performed from direct plating of the grains and the detection of the presence of aflatoxins through the chromatography in the dimensional thin layer two-dimensional. It was found the occurrence of *Aspergillus* spp in 67% of peanut samples and 33% of peanut sweet, aflatoxins were detected in 58% of the samples of peanut and 60% of peanut sweet. The results evidenced relation between the presence of *Aspergillus* spp and the presence of aflatoxin in grains, but not in peanut sweet. Among the seven samples of peanuts *in natura* contaminated with aflatoxins, two exceeded the limit allowed by law.

Key words: *Aspergillus* spp., aflatoxins, peanut, peanut sweet, chromatography

INTRODUÇÃO

Os fungos são indesejáveis nos alimentos, porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os alimentos, provocam sua deterioração. Além disso, muitos fungos podem produzir metabólitos tóxicos quando estão se multiplicando nos alimentos. Esses metabólitos recebem a denominação genérica de micotoxinas e correspondem a produtos metabólicos secundários que, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto no homem como nos animais. Os principais gêneros produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Visotto *et al.*, 2008; Sabbadini *et al.*, 2009).

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do cultivo, colheita, ou estocagem dos grãos. Contudo, crescimento de fungos e produção de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado, as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo depois que os fungos responsáveis tenham morrido (Taniwaki e Silva, 2001).

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência (Mallmann *et al.*, 2003). Os principais fungos produtores de aflatoxinas são *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, conhecidos como aflatoxigênicos desde o início da década de 60. Esses fungos estão amplamente distribuídos na natureza e se desenvolvem bem em temperaturas acima de 25°C e umidade relativa acima de 80 % (Nordin, 1995; Shundo *et al.*, 2003).

No Brasil, o clima quente e úmido e as não tão adequadas condições tecnológicas de plantio, colheita, secagem e armazenamento dos produtos agrícolas propiciam condições favoráveis à proliferação de fungos produtores de aflatoxinas. Isso constitui um grave problema na produção de grãos, assim como um grande problema de

saúde pública (Colaço *et al.*, 1994). O maior problema decorre da ação crônica das aflatoxinas no homem, pois ocasionam distúrbios imunológicos e o aparecimento de câncer hepático (Amaral *et al.*, 2006).

Existem quatro tipos de aflatoxinas detectadas pelos métodos analíticos tradicionais, baseados em cromatografia e imunoensaios, denominadas B1 e B2, que apresentam fluorescência azul-violeta quando observadas sob luz ultravioleta, e G1 e G2, que apresentam fluorescência esverdeada (Baldissera *et al.*, 1992; Prado *et al.*, 2008).

As aflatoxinas podem estar presentes em diversos alimentos, tais como, amendoim, milho, castanhas, feijão, arroz, cevada, sementes de girassol e rações animais. O amendoim (*Arachis hipogaea*) é, sem dúvida, um dos grãos mais contaminados por aflatoxinas e por causa disso tem sido objeto de inúmeras investigações, tanto o grão *in natura*, como seus subprodutos (Santos *et al.*, 2001). O presente trabalho teve como objetivos principais constatar a presença de *Aspergillus* spp em amostras de grãos de amendoim (*A. hipogaea*) e de doces tipo paçoca, bem como detectar e quantificar a contaminação por aflatoxinas nas amostras analisadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 12 amostras de grãos de amendoim *in natura* destinados às indústrias gaúchas de doces, enviadas ao Laboratório de Micotoxinas da Fundação de Ciência e Tecnologia CIENTEC, localizado em Porto Alegre, RS, no mês de março de 2010, e 10 amostras de paçocas de amendoim oriundas de pontos de comércio no município de Porto Alegre.

As paçocas, pertencentes a 10 marcas diferentes, foram adquiridas em estabelecimentos comerciais (2 supermercados, 3 armazéns e 5 lojas de produtos alimentícios) do município de Porto Alegre no mês de abril de 2010.

Cultivo Fúngico a partir de Grãos de Amendoim

A análise da presença de *Aspergillus* spp nos grãos de amendoim coletados foi realizada pelo Laboratório de Microbiologia do Unilasalle, no período de abril a maio de 2010, através da técnica de plaqueamento direto em placas de Petri, contendo o meio de cultura ágar batata dextrose (PDA) acidificado, descrita por Taniwaki e Silva (2001). A acidificação foi feita a partir da adição ao meio pronto fundido, de 1% de solução estéril de ácido tartárico a 10%, até o pH final de 3,5. Em capela de fluxo laminar, porções de 15 grãos das amostras foram inicialmente imersas em uma solução de 0,4% de hipoclorito de sódio por 2 minutos e, em seguida, enxaguadas três vezes

em água destilada. Cada porção foi dividida em 3 placas de Petri contendo o meio PDA acidificado, cada uma com 5 grãos de amendoim, com o auxílio de uma pinça esterilizada. A incubação foi realizada em estufa a 25°C por um período de cinco dias.

Cultivo Fúngico a partir de Paçocas de Amendoim

A verificação da presença de *Aspergillus* spp em paçocas de amendoim foi realizada através do método descrito por Swanson *et al.* (1992), onde 10g de cada amostra foram submetidas a diluições seriadas em 90 mL de água peptonada até 10⁻³. Conforme a metodologia descrita por Marvin (1976), através da técnica de *pour plate*, alíquotas de 1 mL, de cada diluição, foram inoculadas em 15 mL de meio PDA acidificado fundido, seguido de homogeneização. Após a solidificação do ágar, as placas foram invertidas e incubadas a 25°C, durante 7 dias. Após, foram contadas as colônias, e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

Isolamento e Identificação Fúngica

A investigação da presença de *Aspergillus* spp foi realizada a partir da detecção de colônias típicas do gênero *Aspergillus* nos cultivos fúngicos, através da técnica do ponto central, descrita por Pitt *et al.* (1997), onde, com o auxílio de um fio de platina, foi inoculada uma amostra de uma colônia suspeita na parte central de uma placa de Petri, contendo meio PDA acidificado, seguido de incubação a 25°C por 7 dias. Na observação morfológica da colônia, avaliou-se a textura e a coloração da superfície e do reverso.

A análise das características microscópicas seguiu a técnica de microcultivo (técnica de slides) entre lâmina e lamínula (Sutton, 1980). Para tanto, foi realizado o repique das colônias suspeitas no centro de um bloco de 1 cm² de ágar PDA acidificado, depositado sobre uma lâmina estéril e coberto com uma lamínula estéril. Cada lâmina foi depositada sobre um suporte de vidro, no interior de uma placa de Petri, contendo, no fundo, um papel umedecido em água destilada, todos previamente esterilizados, seguindo-se de incubação a 25°C por 3 dias. Após o período de cultivo, as lamínulas foram coradas com Lactofenol azul de algodão e observadas sob microscópio óptico. A identificação do gênero foi realizada a partir da chave de classificação dos fungos deteriorantes comuns em alimentos, de Pitt *et al.* (1997).

Análise das Aflatoxinas

A análise de aflatoxinas foi feita no Laboratório de Micotoxinas na CIENTEC, no período de março a abril de 2010, com base na metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa de aflatoxinas, conforme a Instrução

Normativa nº 9 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, publicado no Diário Oficial da União, de 30 de março de 2000. A extração de aflatoxinas foi realizada a partir de 50g de amendoim moído ou 50g de paçoca. O processo consistiu na adição de metanol e KCl a 50g da amostra, seguida de liquidação e filtração. Após, 150 mL do filtrado foram homogeneizados com o sulfato de cobre e celite, deixados em repouso e filtrados em papel filtro. Em seguida, 150 mL desta segunda filtração foram transferidos para um funil de separação, contendo água destilada, onde foram adicionados 10 mL de clorofórmio, agitados e deixados em repouso. Após repouso, foi drenada a fase clorofórmica para um frasco escuro e adicionados mais 10 mL de clorofórmio ao funil, repetindo a operação anterior, coletou-se a fase clorofórmica no mesmo frasco. O volume de clorofórmio recuperado foi, então, medido, homogeneizado e evaporado até a secura, sob nitrogênio em banho-maria com agitação e temperatura em torno de 40° C.

A detecção foi efetuada por cromatografia em camada delgada bidimensional através da comparação visual com padrões, utilizando-se placas de cromatofolhas de gel de sílica 60G, com 0,25 mm de espessura, sem indicador de fluorescência. O extrato seco foi redissolvido em 200 µL de benzeno-acetonitrila (98:2) e, em seguida, agitado em banho de ultra-som para homogeneização das duas fases drenadas.

Após homogeneização, 20 µL do extrato da amostra e 5 µL de uma mistura de solução padrão de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 foram aplicados em uma placa de cromatofolha bidimensional (10x10), com uma microseringa. A placa foi colocada em uma cuba com clorofórmio/acetona (90:10) por 10 minutos e, em seguida, em uma cuba com tolueno/acetato de etila/ácido fórmico/clorofórmio (35:25:10:25) por 10 minutos, para migração das aflatoxinas. Após secagem das placas em capela por 10 minutos e em estufa a 110° C por 1 minuto, as mesmas foram analisadas sob luz ultravioleta de onda longa a 365nm para a detecção de aflatoxinas.

Uma vez confirmada a presença de aflatoxina na amostra, a quantificação foi efetuada através de nova cromatografia em camada delgada bidimensional, sob as mesmas condições, comparando-se a amostra com padrões de quantidades conhecidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contaminação de Amendoim por Fungos e Aflatoxinas

A incubação de grãos de amendoim evidenciou crescimento fúngico em todas as 12 amostras analisadas. Os gêneros encontrados foram *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* e *Penicillium*, com prevalência do primeiro, conforme ilustra a tabela 1.

Tabela 1. Gêneros de fungos e presença de aflatoxinas nas amostras de amendoim analisadas.

	<i>Aspergillus</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i> e aflatoxinas	<i>Aspergillus</i> sem aflatoxinas	Apenas aflatoxinas
Nº de amostras contaminadas	8	5	4	3	5	3	2
Percentual de amostras contaminadas	67	42	33	25	42	25	17

Os resultados indicaram elevada ocorrência de *Aspergillus* spp em amendoim *in natura*, assim como a susceptibilidade desse grão à contaminação por aflatoxinas. Vecchia e Castilhos-Fortes (2007), também, relataram que o gênero *Aspergillus* é normalmente encontrado em grãos armazenados. Em estudo realizado por Nobrega e Suassuna (2004), a partir da análise sanitária de sementes de amendoim, foi verificado crescimento fúngico dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Fusarium* nas sementes de amendoim, onde, ainda, foi evidenciada maior taxa de contaminação pelo gênero *Aspergillus*.

Dentre as 8 amostras contaminadas com *Aspergillus* spp, 5 apresentaram contaminação somente com o fungo, 3 apresentaram contaminação somente com aflatoxinas, enquanto apenas em 2 foram constatadas aflatoxinas na ausência de *Aspergillus* spp. Embora os trabalhos de Taniwaki e Silva (2001), e de Chalfoun *et al.* (2008) afirmem que o crescimento de fungos e a produção de toxinas não são sinônimos e que a presença do fungo independe da presença da toxina, nossos resultados evidenciaram haver relação entre a ocorrência de *Aspergillus* spp e a presença de aflatoxinas em grãos de amendoim *in natura* ($P = 0,01$).

Tabela 2. Análise das amostras de amendoim *in natura* em relação ao percentual de contaminação fúngica, gêneros observados, nº de colônias de *Aspergillus* spp. e contaminação por aflatoxinas.

Amostra de amendoim	Contaminação fúngica (%)	Gêneros observados	Nº Colônias <i>Aspergillus</i> spp.	Contaminação total aflatoxinas (µg/kg)	Tipo de aflatoxina
1	80	<i>Rhizopus</i>	0	1,0	B1
2	100	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i>	2	13,88	B1 e B2
3	100	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i>	2	1,5	B1 e B2
4	100	<i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i>	4	NÃO DETECTADO	--
5	100	<i>Rhizopus</i>	0	NÃO DETECTADO	--
6	86	<i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i>	1	126,18	B1, B2, G1 e G2
7	100	<i>Rhizopus</i>	0	2,0	B1 e G1
8	76	<i>Penicillium</i>	0	NÃO DETECTADO	--
9	93	<i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i>	1	4,36	B1 e B2
10	93	<i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i>	7	44,82	B1 e B2
11	100	<i>Aspergillus</i>	3	NÃO DETECTADO	--
12	100	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i>	4	NÃO DETECTADO	--

O gênero *Aspergillus* foi identificado e confirmado em 8 amostras de amendoim *in natura*, enquanto a presença das aflatoxinas foi observada em 7 amostras. Os maiores índices de contaminação foram constatados nas amostras de nº 6 e 10 (Tabela 2).

Nas 7 amostras contaminadas com aflatoxinas, apenas a de nº 6 apresentou contaminação pelas 4 aflatoxinas, a de nº 7 por B1 e G1 e, as demais, por B1 e B2 (Tabela 2).

Segundo os trabalhos de Farias *et al.* (2000) e de Chalfoun *et al.* (2008), a distinção bioquímica entre as espécies do grupo *A. flavus* e *A. parasiticus* é o fato do *A. parasiticus* produzir os quatro tipos de aflatoxinas, enquanto que o *A. flavus* produz apenas as B1 e B2. Como neste trabalho a identificação foi apenas até o nível de gênero, tal fato indica a possibilidade de que o fungo encontrado nas amostras de nº 6 e 7 pertença à espécie *A. parasiticus*.

Das 12 amostras analisadas, duas apresentaram índices de contaminação acima do limite permitido pela legislação brasileira (de 20µg/kg na soma das 4 aflatoxinas). Esses resultados demonstram que a contaminação de grãos de amendoim *in natura* por aflatoxinas deve ser tratada como um problema de saúde pública, necessitando constante vigilância por parte dos órgãos responsáveis, de modo a controlar e a garantir a qualidade do amendoim consumido pela população. Conforme Santos *et al.* (2001), a população está exposta aos problemas de saúde causados pelas aflatoxinas devido ao consumo do produto por grande parte das pessoas.

Contaminação de Paçocas por Fungos

A incubação das paçocas evidenciou crescimento fúngico em seis das dez amostras, sendo 83% pertencentes ao gênero *Rhizopus*, 67% a *Penicillium* e 33% a *Aspergillus*.

O número de amostras de paçocas contaminadas com *Aspergillus* spp foi menor do que a contaminação observada nas amostras de amendoim *in natura*. Provavelmente, isso tenha ocorrido devido ao processo industrial pelo qual são submetidas as paçocas, conforme sugere o trabalho de Sylos *et al.* (1996).

Contaminação de Paçocas com *Aspergillus* spp. e Aflatoxinas

O gênero *Aspergillus* foi identificado e confirmado em apenas duas amostras de paçocas; no entanto, seis amostras apresentaram a presença de aflatoxinas, conforme indica a tabela 3.

Conforme demonstra a tabela 3, o maior nível de contaminação por aflatoxina foi encontrado na amostra de nº 8 (3,5 µg/kg de G1), embora essa não tenha evidenciado crescimento de *Aspergillus* spp. A presença de aflatoxina na ausência do fungo produtor, também, foi determinada nas amostras nº 2, 3, 4 e 6. A amostra nº 9, além de

revelar a presença de *Aspergillus* spp., apresentou contaminação com as aflatoxinas B1 e B2. Apenas a paçoca de nº 10 não apresentou contaminação por aflatoxinas, apesar de ter evidenciado a presença de *Aspergillus* spp.

Tabela 3 - Análise das amostras de paçoca em relação ao número de colônias fúngicas, de colônias de *Aspergillus* spp., gêneros observados e contaminação por aflatoxinas.

Amostra de paçoca	Nº Colônias (UFC/mL)	Gêneros observados	Nº Colônias <i>Aspergillus</i> spp.	Contaminação total aflatoxinas (µg/kg)	Tipo de aflatoxina
1	0	SEM CONTAMINAÇÃO	0	NÃO DETECTADO	--
2	0	SEM CONTAMINAÇÃO	0	1,5	B1 e B2
3	10	<i>Rhizopus</i>	0	3,0	B1, B2, G1 e G2
4	40	<i>Penicillium</i>	0	3,0	B1, B2, G1 e G2
5	0	SEM CONTAMINAÇÃO	0	NÃO DETECTADO	-
6	20	<i>Penicillium</i> <i>Rhizopus</i>	0	3,7	B1, B2, G1 e G2
7	20	SEM CONTAMINAÇÃO	0	NÃO DETECTADO	--
8	20	<i>Penicillium</i> <i>Rhizopus</i>	0	3,5	G1
9	40	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Rhizopus</i>	1	1,5	B1 e B2
10	300	<i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i>	1	NÃO DETECTADO	--

Os resultados não demonstraram haver relação entre a presença do fungo e as toxinas detectadas em paçocas ($P=0,52$), porém houve presença de aflatoxinas em 60% das amostras. Em estudo realizado por Nordin *et al.* (2000) sobre o teor de aflatoxinas em produtos de amendoim comercializados nos mercados de Porto Alegre, foram analisadas 37 amostras de paçocas, das quais 25 (67%) apresentaram contaminação por aflatoxinas e dessas 22 (88%) estavam acima do limite permitido pela legislação vigente na época (máximo de $30\mu\text{g}/\text{kg}$ para a soma das aflatoxinas).

No presente trabalho, das dez amostras de paçocas analisadas, nenhuma ultrapassou o limite permitido no Brasil ($20\mu\text{g}/\text{kg}$), o que demonstra uma melhora

nas condições de preparo e de armazenamento dos produtos. No entanto, nos países da União Europeia, o limite para amendoim e derivados é de 4 µg/kg para aflatoxinas totais (B1+B2+G1+G2), sendo que o máximo de aflatoxina B1 permitido é de 2 µg/kg. Essa discrepância recomenda a necessidade de estudos que avaliem e determinem a que concentrações as aflatoxinas, efetivamente, tornam-se nocivas aos seres humanos e animais.

Não foi evidenciada relação significativa entre a presença do fungo e de aflatoxinas em paçocas. No entanto, estudos de Sylos *et al.* (1996) indicam que o calor do processo de produção pode ter diminuído ou destruído a contaminação fúngica advinda das matérias primas, porém não tendo sido suficiente para degradar totalmente as aflatoxinas, uma vez que estas são extremamente resistentes ao calor.

Em um estudo realizado por Chalfoun *et al.* (2008), em rações para aves, foi verificado que em 50% delas havia presença de aflatoxina mesmo na ausência dos fungos, indicando que o crescimento do fungo ocorreu em etapas anteriores ao processamento, possivelmente tendo sido proveniente das matérias primas, constituídas de cereais e derivados.

Neste estudo, optamos por realizar as análises a partir da escolha aleatória de 15 grãos de amendoim (para o cultivo fúngico) e de 50g de grãos (para a verificação da contaminação por aflatoxinas), ambos extraídos de uma amostra original de 1 kg, enviada ao CIENTEC. Consideramos, no entanto, que apesar dos grãos submetidos aos testes (de cultivo fúngico e de contaminação por aflatoxinas) terem sido oriundos de um mesmo lote, representaram unidades amostrais distintas. Sendo assim, a comparação entre a presença de *Aspergillus* spp e de aflatoxinas, pela metodologia empregada, pode não ter sido fidedigna.

Entendemos que, como forma de se obter um resultado mais confiável, deveria ser feita a trituração e a homogeneização prévias de toda a amostra original e desta, então, serem retiradas as quantidades necessárias às análises.

CONCLUSÕES

As metodologias utilizadas neste trabalho se mostraram eficazes na detecção e quantificação das aflatoxinas, bem como para o crescimento de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, tanto nas análises de amendoim *in natura* quanto de paçoca.

Dentre as doze amostras de amendoim *in natura* analisadas, duas apresentaram contaminação acima do limite permitido pela legislação brasileira (de 20µg/kg na

soma das 4 aflatoxinas) e nenhuma das dez amostras de paçocas analisadas ultrapassou esse limite. Sendo que grãos de amendoim, aparentemente sadios, apresentaram contaminação por fungos com potencial toxigênicos.

Foi evidenciada relação entre a ocorrência de *Aspergillus* spp. e a presença de aflatoxinas em grãos de amendoim *in natura* ($P= 0,01$), porém o mesmo não foi observado na análise de paçocas.

Neste trabalho, ainda que os grãos utilizados para o cultivo do fungo e a extração de aflatoxina fizessem parte do mesmo lote, foram provenientes de amostragens distintas, o que pode ter influenciado nos resultados finais. Sugere-se, portanto, que em um futuro estudo, utilize-se uma metodologia em que todos os grãos do lote amostral sejam previamente moídos e homogeneizados, para que possam ser produzidos resultados mais confiáveis.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, K. A. et al. 2006. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, **26**(2):336-342.
- BALDISSERA, M. A. et al 1992. Aflatoxinas em amendoim e farinha de milho usados na alimentação humana – Santa Maria, RS – 1991. **Rev. Bras. Farm.**, **73**(4):87-90.
- CHALFOUN, Y. et al. 2008. Análises microbiológicas e de aflatoxinas no controle de qualidade de rações para cães. **Rev. Ciê. Vida Seropédica**, **28**:25-27.
- COLAÇO, W.; FERRAZ, U.; ALBUQUERQUE, R. L. 1994. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na Cidade de Recife, no período de 1989 a 1991. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **54**(1):1-4.
- FARIAS, A. X. et al. 2000. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesq. Agropec. Bras.**, **35**(3):617-621.
- FRANCO, B. D.; LANDGRAF, M. 2002. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182 p.
- MALLMANN, C. A. et al. 2003. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no Estado do Rio Grande do Sul. In: 2º SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003, Florianópolis. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/artigos.html>>. Acesso em: 15 mar. 2010.
- MARVIN, L. S. 1976. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 115 p.
- NÓBREGA, F. V. A.; SUASSUNA, N. D. 2004. Análise sanitária de sementes de amendoim em algumas áreas do estado de Paraíba – Universidade Estadual de Paraíba, Campina Grande, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, **4**(2):2-3.

- NORDIN, N. S. D. 1995. **Detecção de aflatoxinas e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 98p.
- NORDIN, N.; BRAGA, S. R.; RIBEIRO, F. 2000. Detection of aflatoxins in peanut products traded in Porto Alegre, Rio grande do Sul, Brazil. In: X INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá, Rio de Janeiro. p. 125.
- PRADO, G. et al. 2008. Determinação de aflatoxina B1 em pimenta (*Piper nigrum L.*) e orégano (*Origanum vulgare L.*) por cromatografia em camada delgada e densitometria. **Quim. Nova**, 31(3):514-517.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. 1997. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. Austrália: Springer, 503p.
- SABBADINI, A. M. et al. 2009. Ocorrência de fungos toxicológicos em grãos coletados no município de campo mourão e a relação destes com o desenvolvimento de doenças. In: VI EPCC ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 2009, Maringá, PR. Disponível em: <<http://www.cesumar.br/epcc2009/trabalhos.php>>. Acesso em: 10 fev. 2010.
- SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S. 2001. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):153-157.
- SHUNDO, L.; SILVA, R. A.; SABINO, M. 2003. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília – SP, Brasil no período de 1999-2001. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3):177-181.
- SWANSON, K. M. J. et al. 1992. Colony count methods. In: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. S. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, USA: American Public Health Association, p. 534-541.
- SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; PINTO, C. A. 1996. Comparação de imunodosagem e cromatografia e minicoluna para triagem de aflatoxinas e amendoim e milho. São Paulo. **Rev. Nutrição Alimentos**, 7:7-14.
- TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. 2001. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas, SP: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 82 p.
- VECCHIA, A. D.; CASTILHOS-FORTES, R. 2007. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciênc. Tecnol. Alimet**, 27(2):324-327.
- VISOTTO, L. E. et al. 2008. Isolamento de fungos toxigênicos em grãos de café (*Coffea arabica L.*) e avaliação da produção IN VITRO de ocratoxina A. **R. Bras. Armaz., Especial Café**, (10):49-57.