



Incidência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amendoins

Incidence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts

RIALA6/1783

Maria Helena IHA MATIAS*, Marcelo Ferreira da CRUZ, Isaura Akemi OKADA, Rita de Cássia BRIGANTI, Maria Aparecida de OLIVEIRA

*Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto VI. Rua Minas, 877, Campos Elíseos, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP: 14085-410, Tel: 16 3625 5046. E-mail: maria.matias@ial.sp.gov.br

Recebido: 03.12.2018 - Aceito para publicação: 11.03.2020

RESUMO

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos e encontradas nos alimentos. As micotoxinas mais tóxicas são as aflatoxinas, produzidas, principalmente por *Aspergillus flavus*. Estudos realizados no país demonstraram alta incidência dessas micotoxinas em produtos de amendoim, que representa risco à saúde da população. O objetivo do estudo foi avaliar a incidência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amostras de amendoins comercializados na região Nordeste do Estado de São Paulo nos períodos de 1994-2001 e 2016-2017. O método utilizado para analisar as amostras no primeiro período foi extração líquido-líquido e cromatografia em camada delgada e no segundo foi utilizando colunas de imunoafinidade, cromatografia líquida com derivatização pós-coluna e detector por fluorescência. No levantamento de 1994-2001 das 82 amostras, 39% tiveram contaminação de aflatoxinas variando de 11 a 1556 µg/kg com 37% das amostras contendo níveis maiores que 20 µg/kg, enquanto na pesquisa de 2016-17, das 56 amostras, 38% apresentaram contaminação destas toxinas variando de 0,09 a 60,40 µg/kg com 13% das amostras contendo níveis maiores que 20 µg/kg. Os resultados dos dois períodos estudados indicam que houve uma diminuição na incidência e nível das aflatoxinas estudadas, embora esta contaminação em amendoim permaneça um problema de saúde pública.

Palavras-chave. aflatoxinas, *Arachis hypogaea* (amendoim), incidência.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic compounds produced by fungi found in food. The most toxic mycotoxins are the aflatoxins produced mainly by *Aspergillus flavus*. Studies carried out in Brazil showed a high incidence of these mycotoxins in peanut products, a fact that represents public health problems. The aim of the study was to evaluate aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in samples of peanuts sold in cities of the Northeast of the State of São Paulo in the period from 1994 to 2001 and from 2016 to 2017. The samples of the first period were analyzed using liquid-liquid extraction and thin-layer chromatography and the second using immunoaffinity columns, post-column derivative liquid chromatography and fluorescence detector. In the 1994-2001 survey, among 82 samples, 39% presented aflatoxins contamination ranging from 11 to 1556 µg/kg with 37% with levels greater than 20 µg/kg whereas, in the 2016-17 survey, 38% of the 56 samples presented contamination of aflatoxins ranging from 0.09 to 60.40 µg/kg and 7 samples 13% containing aflatoxins levels higher than 20 µg/kg. The results indicated there was a decrease in the incidence and level of aflatoxins, but the contamination of aflatoxins in peanuts remains a public health problem.

Keywords. aflatoxins, *Arachis hypogaea* (peanuts), incidence.

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são compostos naturais de baixo peso molecular produzidas por fungos. As aflatoxinas (AFs), constituem o principal grupo de micotoxinas, são tóxicas e carcinogênicas para humanos e animais. Sob condições climáticas adversas ou condições de armazenamento precárias, as AFs são produzidas por *Aspergillus* (principal produtor *A. flavus*) em uma grande variedade de produtos agrícolas, como milho, algodão, amendoim e certas nozes¹.

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer² classificou a aflatoxina B₁ (AFB₁) como um carcinógeno do grupo 1. A AFB₁ induz a fosforilação da proteína reguladora Src quinase e estimula a migração de células do câncer de pulmão³. A exposição de fetos no útero à AFB₁ está associada à metilação do DNA nos glóbulos brancos⁴. A exposição crônica a AFs pode levar à ocorrência de câncer hepático e para portadores do vírus da hepatite, pode haver uma sinergia entre o vírus e a toxina, que desencadeia mais facilmente o câncer. Em áreas de alta exposição a AFB₁, esta micotoxina interage sinérgica e multiplicativamente com o vírus da hepatite B para induzir o carcinoma hepatocelular⁵. Segundo Liu et al⁶, reduzir a exposição às AFs a níveis não detectáveis poderia reduzir os casos de carcinoma hepatocelular em áreas de alto risco em cerca de 23%.

Existem muitos relatos de contaminação por AFs em amendoins, incluindo artigos científicos da República Democrática do Congo⁷, Quênia⁸, Costa do Marfim⁹, e no Brasil. Nos últimos anos inúmeras pesquisas demonstraram a presença de micotoxinas nos alimentos, sendo, o amendoim, o alimento que apresenta as concentrações mais elevadas de AFs. A contaminação por AFs em amendoins e produtos de amendoim tem sido considerado por muitos autores como problema de saúde pública no Brasil¹⁰⁻¹³.

Dentre os métodos analíticos para analisar as AFs, a etapa de limpeza da amostra é a mais demorada, e geralmente consiste na extração com solvente¹⁴ ou a utilização de colunas de imunoafinidade (CIA)¹⁵. A cromatografia em camada delgada (CCD) está entre os métodos analíticos mais antigos, e é uma técnica simples e

barata, especialmente útil para análise de AFs em países em desenvolvimento. Com os avanços na instrumentação, começou-se a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por fluorescência, para a análise de AFs. Métodos hifenizados, como cromatografia acoplada a espectrometria de massa (MS) ou CLAE-MS/MS, também foram desenvolvidos para quantificação e confirmação de AFs. Novas tecnologias analíticas para a purificação e isolamento de AFs incluem o uso de extração assistida ultrassônica e QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)¹⁶. Neste estudo, a CCD foi utilizada para amostras analisadas no período de 1994 a 2001 e CLAE para as amostras pesquisadas no período de 2016 a 2017.

O objetivo deste estudo foi verificar a incidência e nível de aflatoxinas em amendoins durante o período de 2016 a 2017 e comparar com os resultados obtidos de 1994 a 2001 no mesmo tipo de produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Oitenta e duas amostras de amendoins foram coletadas pela Vigilância ou enviadas por consumidores ao Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto no período de 1994 a 2001 e analisadas pelo método de CCD. Durante o período de 2016 a 2017, 56 amostras de amendoim foram adquiridas em supermercados de municípios da região Nordeste do Estado de São Paulo: Ribeirão Preto e Araraquara, e analisadas por CLAE. As amostras de amendoim, a granel ou embaladas, eram compostas de: amendoim cru (com e sem casca), torrado, japonês, salgado, crocante, doce, com chocolate e confeitado.

Materiais, reagentes e solventes

Os reagentes químicos e suprimentos utilizados no estudo foram: padrões de AFs (A6636, A9887, A0138, A0263, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO); metanol e acetonitrila (grau cromatografia, EM Science, Gibbstown, NJ, EUA); coluna de imunoafinidade (Afla Star Fit 3 Romer Labs, Tulln, Áustria); cloreto de sódio, fosfato monopotássico, fosfato dissódico, cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre (CuSO₄), celite, clorofórmio,

tolueno, ácido fórmico, acetato de etila, acetona, benzeno e acetonitrila (grau PA, Merck, Alemanha ou Rio de Janeiro); cromatoplacas de alumínio (20x20cm, Merck, Alemanha), microseringa de 10, 100 e 1000 µL (Hamilton, Reno, EUA); béqueres, provetas, erlenmeyers e balões volumétrico de diversos volumes.

Soluções estoque de cada uma das AFs foram preparadas em acetonitrila, e suas concentrações foram determinadas de acordo com o método da AOAC 971.22¹⁷. Uma solução padrão estoque da mistura das quatro AFs foi preparada na concentração de AFB₁, 200 ng/mL; AFB₂, 50 ng/mL; AFG₁, 100 ng/mL; e AFG₂, 50 ng/mL em acetonitrila. Porções apropriadas da solução padrão estoque das AFs foram diluídas em fase móvel para preparar as soluções padrão de calibração com as seguintes concentrações: AFB₁, 0,40; 1,00; 2,00; 4,00 e 10,00 ng/mL; AFB₂ e AFG₂, 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,50 ng/mL; e AFG₁, 0,20; 0,50; 1,00; 2,00 e 5,00 ng/mL. A solução padrão utilizada para a contaminação das amostras para o estudo de recuperação apresentou uma concentração de AFs totais de 400 ng/mL.

Equipamentos

Os equipamentos usados foram: cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector por fluorescência (Shimadzu Instruments, Kyoto, Japão), injetor Rheodyne LP com loop de 50 µL (Rheodyne, Cotati, CA, EUA) e coluna C₁₈ de 4,6 x 250 mm, 5 µm (Shimadzu, Kyoto, Japão); sistema de derivatização pós coluna para AFT, PHRED célula (célula de derivação fotoquímica pós coluna; AURA Industries, Nova York, NY, EUA), espectrofotômetro (Hach, Loveland, CO); vortex (Fanem, São Paulo, Brasil); centrífuga (Fanem, São Paulo, Brasil); suporte de colunas (Supelco, Bellefonte, PA); agitador (Tecnal, Piracicaba, Brasil); balança analítica (Mettler Toledo, Suíça); liquidificador (Philips, São Paulo); banho-maria (Fanem, São Paulo); câmara escura de luz UV (λ=366nm, Linsa, São Paulo).

Análise de AFB₁ e AFG₁ pelo método CCD - amostras coletadas de 1994 a 2001

As amostras foram analisadas de acordo com Soares e Rodrigues-Amaya¹⁴. A amostra foi

extraída com metanol: KCl 4% (9:1, v/v), filtrada, juntamente com CuSO₄ 10%, através de celite seguida de partição duas vezes com clorofórmio. A CCD foi usada para separar as AFs dos interferentes da matriz, a fase móvel foi tolueno:acetato de etila: ácido fórmico (60:40:0,5, v/v/v). A quantificação foi por comparação visual das intensidades de fluorescência das manchas de AFB₁ e AFG₁ nas amostras com os pontos correspondentes dos padrões. As amostras positivas foram confirmadas com ácido trifluoracético.

Análise de AFs pelo método CLAE

Preparação e extração de amostras

O procedimento para análise de AFs em amostras de amendoim foi de acordo com Iha et al¹⁵. Um quilo de cada uma das amostras foi triturado e homogeneizado. Foram adicionados 20 mL de solução de extração (metanol:água, 6:4, v/v) em tubo contendo 5 g da amostra, esta mistura foi agitada durante 60 min e depois centrifugada durante 10 min a 600 g. Oito mililitros do sobrenadante foram utilizados para a purificação em CIA, como descrito no próximo item. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Purificação e isolamento utilizando CIA

Oito mililitros de sobrenadante filtrado foram adicionados a 24 mL de tampão fosfato, 10 mM, pH 7,4 e foram misturados. A mistura foi transferida para uma CIA. Depois esta CIA foi lavada duas vezes com 10 mL de água. As AFs foram eluídas utilizando 0,7 mL de metanol, duas vezes. O eluato contendo as AFs foi coletado em um frasco volumétrico de 2 mL e completado com água imediatamente antes da injeção cromatográfica.

Condições cromatográficas

A fase móvel utilizada foi uma mistura de água:acetonitrila:metanol (60:17:25, v/v/v) com vazão de 0,8 mL/min, temperatura da coluna 35°C. O detector de fluorescência foi ajustado em comprimento de onda de excitação de 362 nm e comprimento de onda de emissão de 440 nm, com derivatização pós-coluna, injeção cromatográfica de 50 µL. Os picos das AFs na amostra foram identificados comparando os tempos de retenção com os dos padrões. Após passar pela célula

PHRED, a AFG₁ e a AFB₁ são derivatizados para formar G_{2a} (derivado de G₁) e B_{2a} (derivado de B₁).

Estudo de Recuperação

Para o estudo de recuperação do método de CCD foi adicionado padrão de AFB₁ na amostra de amendoim livre de AFs, a concentração final foi de 17 µg/kg, em triplicata. Após 2 h, as amostras contaminadas artificialmente foram analisadas de acordo com o método.

Para o estudo de recuperação do método de CLAE, uma quantidade apropriada de solução padrão de AFs foi adicionada à amostras livre de AFs em diferentes níveis, AFB₁, 2,56; 5,20; 10,00 µg/kg; AFB₂ e AFG₂, 0,64; 1,30; 2,50 µg/kg; e AFG₁, 1,28; 2,60; 5,00 µg/kg, em triplicata. Após 2 h, as amostras contaminadas artificialmente foram analisadas de acordo com o método.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 1994-2001, apenas AFB₁ e AFG₁ foram quantificados, pois a legislação brasileira,

de 1976 a 2002, estabelecia a tolerância de 30 µg/kg para soma de AFB₁ e AFG₁¹⁸. A recuperação média de AFB₁ em concentração de 17,4 µg/kg (análise triplicata) foi de 90% e o limite de detecção (LD) foi de 2 µg/kg para as AFB₁ e AFG₁.

A **Tabela** mostra a ocorrência frequente e os altos níveis de contaminação das AFs em amostras coletadas de 1994 a 2001. Trinta e nove por cento (32 de 82 amostras) de amostras de amendoins continham AFs variando de 11 a 1556 µg/kg. Trinta amostras (37%) estavam contaminadas em níveis acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira (somatório de AFs = 20 µg/kg)¹⁹. A maior incidência de contaminação de AFs em amendoim (67%) ocorreu em 1999, enquanto o maior nível foi encontrado em 1996, 1556 µg/kg.

De 2016-2017 foi utilizado CIA, esta coluna tem sido amplamente utilizado para análise de AFs, sendo observados bons resultados. Os cromatogramas obtidos de amostras de amendoim livre de AFs e naturalmente contaminados com AFs são mostrados na **Figura**.

Tabela. Resultados do estudo de incidência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amostras de amendoins

Ano	Detectado (n)	Intervalo de concentração (µg/kg)	Concentração média (µg/kg)
1994*	2/10	11-39	25
1995*	4/13	27-995	511
1996*	6/12	49-1556	803
1997*	3/10	163-522	317
1998*	2/3	301-372	336
1999*	8/12	54-968	307
2000*	4/10	50-423	236
2001*	3/12	15-101	48
2016-17**	21/56	0,09-60,40	25

*soma de AFB₁ e AFG₁, amostras analisadas por CCD; **soma de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, amostras analisadas por CLAE; n = número de amostras analisadas

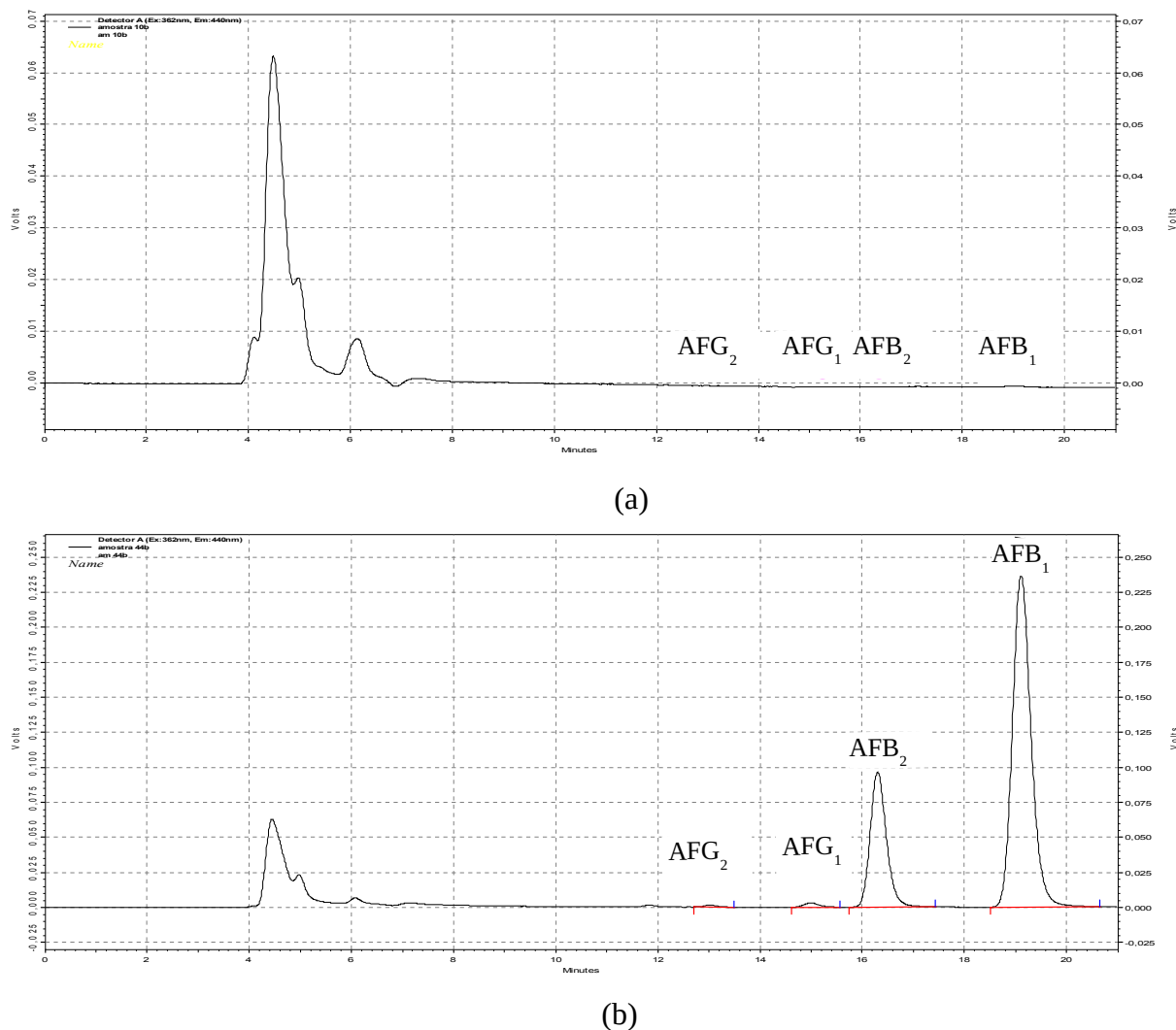


Figura. Cromatogramas das amostras de amendoim. (a) amostra de amendoim livre de AFs e (b) naturalmente contaminados com AFs

A recuperação média das AFs utilizando o método de CLAE, nos níveis adicionados variando de 0,64 a 10 µg/kg, foi de 88,6%, e a média do desvio padrão foi de 7,9%. O LD foi de 0,04 µg/kg para AFB₁, 0,02 µg/kg para AFG₁ e 0,01 µg/kg para AFG₂ e AFB₂, e foram determinados usando o valor médio das concentrações de AFs das amostras livres de AFs mais 2 desvios padrão. O limite de quantificação foi de 0,15 µg/kg para AFB₁, 0,07 µg/kg para AFG₁ e 0,04 µg/kg para AFG₂ e AFB₂ (cerca de 3 vezes o LD).

Os resultados dos níveis de AFs totais nas amostras de amendoins coletadas em 2016-17 são mostrados na [Tabela](#). Apesar dos dados terem sido obtidos com métodos diferentes, com diferenças nos limites de detecção e quantificação,

podemos observar que houve uma diminuição na incidência e nos níveis de AFs com relação ao período de 1994-2001. Vinte e uma amostras (38%) apresentaram contaminação de AFs em níveis variando de 0,09 a 60,40 µg/kg e 7 amostras (13%) em níveis acima de 20 µg/kg, limite máximo tolerado pela legislação brasileira¹⁹.

Durante este intervalo que separa os 2 períodos do estudo alguns fatores podem ter contribuído para a diminuição nos níveis de AFs nos amendoins, como por exemplo: o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas para a análise de AFs em amendoins, o que permitiu a quantificação destas toxinas em níveis mais baixos, com maior precisão e exatidão, melhorando o seu monitoramento, tanto pela própria indústria como pelos órgãos

fiscalizadores; alteração do valor máximo tolerado de AFs pela legislação, de 30 µg/kg (soma das AFB₁ e AFG₁)¹⁸ para 20 µg/kg (soma das AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂)²⁰; e em 2001 a Associação Brasileira das Indústrias de Chocolates, Amendoim e Balas (ABICAB), implementou o Programa Pró-Amendoim. As empresas que possuem o selo “Qualidade Certificada Pró-Amendoim-ABICAB”, atendem os requisitos da legislação em relação aos níveis de aflatoxina nos produtos que fabricam à base de amendoim²¹. Segundo Facca e Dalzoto²², esta diminuição nos níveis de AFs em amendoim deve-se, principalmente, às estratégias adotadas pelos produtores para manter a qualidade do processo de produção destes alimentos.

O estudo foi realizado com diversos tipos de amendoim, amendoim cru com e sem casca e os amendoins processados: torrado, japonês, salgado, crocante, doce, com chocolate e confeitado. Todos estes amendoins processados passaram por um aquecimento através da torração. No período de 1996 a 2001, 56% de amendoim cru e 27% do amendoim processado apresentaram contaminação por AFs, e no período de 2016-2017, 46% de amendoim cru e 31% do amendoim processado apresentaram contaminação por AFs, e esta diferença na quantidade de amostras contaminadas mostra que existe uma tendência de diminuição de AFs com o processamento do amendoim. Este resultado está de acordo com a revisão publicada por Kaushik²³ a respeito dos efeitos dos processamentos sobre as micotoxinas em grãos, o autor cita que geralmente os processos que utilizam as temperaturas mais elevadas ocasionam a redução na concentração de micotoxinas. Porém, mais estudos precisam ser realizados, pois existem controvérsias sobre este assunto.

Existem estudos no Brasil os quais mostram que a incidência de AFs em amendoim continua sendo um problema de saúde pública. Santos et al¹⁰ pesquisaram a presença de aflatoxinas em 104 amostras de amendoim comercializados no município de Maringá, 24% das amostras estavam contaminadas, com média de concentração de 13,4 µg/kg, sendo que 20 amostras estavam com níveis acima do máximo tolerado pela legislação brasileira. Martins et al¹¹ coletaram 119 amostras de amendoim no Estado de São Paulo, 12 amostras

apresentavam contaminação por AFs na faixa de 0,3 – 100 µg/kg. Silva et al¹³ detectaram a presença de aflatoxinas em amendoim cru e paçoca na cidade de Marília, e 5,3% das amostras de amendoim cru apresentaram AFB₁ acima do valor permitido pela legislação. Outro estudo sobre a incidência de AFB₁ e AFB₂ foi conduzido por Moreira et al¹², das 23 amostras analisadas 3 eram amendoins. Os autores encontraram 1 amostra de amendoim contaminada com AFB₁, 317,1 e AFB₂, 317,1 µg/kg, valor superior ao tolerado pela legislação.

CONCLUSÃO

Embora os resultados deste estudo indicaram uma diminuição da concentração das AFs, a contaminação por estas toxinas permanece um problema de saúde pública na região Nordeste do Estado de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Ames (IA): CAST; 2003.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). *Evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Some naturally occurring substances. Food items and constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Monographs, vol. 56. Lyon (France): IARC; 1993.
3. Cui A, Hua H, Shao T, Song P, Kong Q, Luo T et al. Aflatoxin B₁ induces Src phosphorylation and stimulates lung cancer cell migration. *Tumour Biol*. 2015;36(8):6507-13. <https://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-3341-2>
4. Hernandez-Vargas H, Castelino J, Silver MJ, Dominguez-Salas P, Cros MP, Durand G et al. Exposure to aflatoxin B₁ in utero is associated with DNA methylation in white blood cells of infants in The Gambia. *Int J Epidemiol*. 2015;44(4):1238-48. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv027>

5. Kew MK. Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2013;22(3):305-10.
6. Liu Y, Chang CCH, Marsh GM, Wu F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2125-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.009>
7. Kamika I, Takoy LL. Natural occurrence of Aflatoxin B₁ in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Food Control*. 2011;22(11):1760-4. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.010>
8. Mutegi CK, Ngugi HK, Hendriks SL, Jones RB. Prevalence and factors associated with aflatoxin contamination of peanuts from Western Kenya. *Int J Food Microbiol*. 2009;130(1):27-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.030>
9. Kouadio JH, Lattanzio VM, Ouattara D, Kouakou B, Visconti A. Assessment of mycotoxin exposure in Côte d'Ivoire (Ivory Coast) through multi-biomarker analysis and possible correlation with food consumption patterns. *Toxicol Int*. 2014;21(3):248-57. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.155336>
10. Santos AC, Souza AA, Silva MV, Nerilo SB, Souza APM, Bando E et al. Occurrence and exposure assessment to aflatoxins in peanuts commercialized in the northwest of Parana, Brazil. *Ciênc Rural*. 2018 48(6):e20170615. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170615>
11. Martins LM, Sant'Ana AS, Fungaro MHP, Silva JJ, Nascimento MS, Frisvad JC et al. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. *Food Res Int*. 2017;94:101-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.006>
12. Moreira MF, Oliveira TR, Vieira IGP, Freire FCO, Silva SC, Ribeiro LM et al. Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2016;75:e1698. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial75_completa/artigos-separados/1698.pdf
13. Silva RA, Yakamoto IT, Ferreira LO, Marques LRM. Detecção e quantificação de aflatoxinas em amostras de grãos de amendoim e derivados comercializados na região de Marília- SP, 2002-2009. *Braz J Food Nutr* 2013;24(1):61-4. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/2030/2030>
14. Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. 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.
15. Iha MH, Okada IA, Briganti RC, Mini CA, Trucksess MW. Aflatoxins in Brazilian peanut confection. *J AOAC Int*. 2016;99(3):830-4. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0256>
16. Berthiller F, Cramer B, Iha MH, Krska R, Lattanzio VMT, MacDonald S et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2016-2017. *World Mycotoxin J*. 2018;11(1):5-32. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2250>
17. AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18th ed., Gaithersburg (MD); 2010, Chapter 49, p. 1-51.
18. Ministério da Saúde (BR). Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução - CNNPA nº 34, de 1976. Fixar para os alimentos, tolerâncias de 30ppb (trinta partes por bilhão) para as Aflatoxinas, calculada pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B₁ e G₁. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 19 jan 1977. Seção 1.
19. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, Seção 1(46):66.
20. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho, constante do Anexo desta Resolução. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, [acesso 2019 Ago 27]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0274_15_10_2002.html
21. Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas. A ABICAB e o Programa Pró-Amendoim. [acesso 2019 Ago 27]. Disponível em: <http://proamendoim.com.br/>
22. Facca MCL, Dalzoto PR. Aflatoxinas: um perfil da situação do amendoim e derivados no cenário brasileiro. *Biológico*. 2010;72(1):25-9.
23. Kaushik G. Effect of processing on mycotoxin content in grains., *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(12):1672-83. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.701254>