

COMPARAÇÃO ENTRE ELISA E CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA NA QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM

Guilherme PRADO*
Marize Silva de OLIVEIRA*

RIALA 06/871

PRADO, G & OLIVEIRA, M.S — Comparação entre Elisa e cromatografia em camada delgada na quantificação de aflatoxinas em amendoim. Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 99-104, 1999

RESUMO: Um método imunoenzimático (ELISA) e a cromatografia em camada delgada (CCD) com comparação visual, foram comparados na determinação de aflatoxinas em amostras de amendoim cru naturalmente contaminado. Para níveis de aflatoxina total até 50 µg/Kg não houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Para valores de aflatoxinas total superiores a 50 µg/Kg, a técnica de ELISA foi estatisticamente equivalente à cromatografia em camada delgada ($p < 0,001$) somente quando as amostras foram diluídas para obter níveis de aflatoxina total até o máximo de 50 µg/Kg. Não foram observados falsos positivos ou negativos por ELISA quando comparado com cromatografia em camada delgada.

DESCRIPTORIOS: amendoim; aflatoxinas; cromatografia em camada delgada; ELISA.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que contaminam as culturas no campo, os grãos durante o armazenamento e também os produtos alimentícios destinados ao consumo humano, apresentando atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica.³⁰

No Brasil, têm-se estudado a presença de aflatoxinas em vários alimentos de consumo humano, como amendoim, arroz, feijão, trigo, milho, mandioca, sendo que a maior contaminação com aflatoxinas ocorre em amendoim e milho.^{7,19,20,25,27}

Para um controle e monitoramento eficientes, as indústrias e os laboratórios oficiais dos Ministérios da Saúde e Agricultura devem dispor de métodos analíticos de boa sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de uso, além de boa exatidão e precisão.^{23,24}

A quantificação de aflatoxinas pode ser realizada por uma grande variedade de técnicas, sendo a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as mais utilizadas. A mais significativa vantagem da CCD é que é relativamente barata, fornecendo adequada resolução para um número considerável de amostras. A principal desvantagem é a falta de potencial para a automação e a natureza subjetiva da etapa de quantificação (para aqueles laboratórios que não possuem densitômetro). A metodologia para CLAE apresenta alta sensibilidade e um grande potencial para automação. Entretanto, requer equipamentos caros e pessoal altamente especializado para operação.^{18,22,31}

Dificuldades associadas com CCD e CLAE na análise de micotoxinas têm levado ao desenvolvimento de métodos imunológicos rápidos, como o teste enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). As vantagens

* Fundação Ezequiel Dias — Divisão de Bromatologia e Toxicologia — Núcleo de Micologia e Micotoxinas — Rua Conde Pereira Carneiro, 80 — Gameleira — Belo Horizonte / MG — 30510-010. Fone: (031) 3719462 Fax: (031) 3719463— E-mail: iommicol@funed.mg.gov.br

oferecidas envolvem redução do tempo de análise, procedimentos simples de extração e capacidade de processar um grande número de amostras em um tempo reduzido.^{4,11,14,16} O teste ELISA detecta e amplifica a reação antígeno-anticorpo pela ligação covalente entre enzima-anticorpo ou enzima-analito, cuja presença é posteriormente determinada pela adição de enzima no substrato. A quantidade de substrato convertido a um dado tempo é indicativo da concentração original do composto a ser analisado.^{1,2,8} No Brasil, apesar de alguns laboratórios de análise de micotoxinas, executarem a técnica de ELISA em seus procedimentos de rotina, seja como método de triagem ou de quantificação, existe uma deficiência de estudos comparativos com métodos oficiais ou com aqueles já tradicionalmente utilizados e recomendados.

O objetivo deste trabalho foi comparar técnicas de quantificação de aflatoxinas em amendoim em grão naturalmente contaminado: a cromatografia em camada delgada com quantificação visual, a mais utilizada no Brasil²⁹ e a técnica de ELISA.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Substrato

As amostras de amendoim em grão (1Kg) foram previamente moídas, homogeneizadas e passadas em tamiz 20 mesh. Posteriormente, fez-se o quarteamento até aproximadamente 300 g e acondicionadas em frascos plásticos e guardadas em freezer até o momento da análise (- 15°C).

2.1.2 Kit de ELISA

Foi utilizado o Kit Veratox para determinação quantitativa de aflatoxinas total ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) da Neogen Corporation. Esse material foi armazenado a uma temperatura de 2-8°C, conforme instrução do fabricante, e utilizado dentro do tempo de validade (06 meses).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação de aflatoxinas por

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica utilizada foi basicamente a descrita por VALENTE SOARES & RODRIGUES AMAYA²⁸ utilizada por um grande número de laboratórios no Brasil, e recomendado pelo Programa Nacional de Micotoxinas. A extração das aflatoxinas foi executada com amostras em duplicata, de acordo com o item 2.1.1, que foram colocadas em um copo de liquidificador com 270 mL de metanol e 30 mL de KCl a 4%. Após a mistura por 3

minutos em velocidade alta, filtrou-se em papel Whatman nº 4. Para purificação, adicionou-se 150 mL de sulfato de cobre a 10% e 50 mL de celite à 150 mL deste filtrado. Após homogeneizar, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 4. Esse segundo filtrado foi submetido a uma partição líquido-líquido, empregando-se alíquota de 150 mL do filtrado, 150 mL de água destilada e 10 mL de clorofórmio (duas extrações). A partir dos extratos clorofórmicos reunidos, transferiu-se 6 mL para um frasco âmbar. Seguiu-se a evaporação em atmosfera de nitrogênio até secura. Para a identificação e quantificação das aflatoxinas, o resíduo foi diluído em benzeno:acetonitrila (98:2), agitado por 1 minuto em ultrassom e aplicado em cromatoplaça de sílicagel G-60, de 250 mm de espessura e sem indicador fluorescente. O desenvolvimento da cromatografia foi feito em tolueno : acetato de etila : clorofórmio : ácido fórmico 90% (70:50:50:20) segundo GIMENO¹⁰. Após a corrida, a placa foi seca a 105°C por 10 minutos e examinada sob luz ultravioleta à 360 nm. A quantificação foi feita após comparação da intensidade das fluorescências das alíquotas da amostra, com a intensidade das fluorescências dos padrões de concentração conhecida. Os teores das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 foram somados, obtendo-se valores de aflatoxina total.

2.2.2 Determinação de aflatoxina por ELISA

A técnica utilizada foi um ensaio competitivo direto de ELISA que apresenta uma menor variabilidade na análise¹⁷. A extração das aflatoxinas foi feita em amostras de 50 g, em duplicata, preparadas como descrito no item 2.1.1, que foram colocadas em um copo de liquidificador com 250 mL de metanol a 70%, em água deionizada. Após a mistura por 2 minutos em alta rotação, foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 1, recolhendo-se pelo menos 150 mL do filtrado.

Para aquelas amostras, cujos níveis de aflatoxinas, determinados pela técnica de cromatografia em camada delgada (item 2.1.1), foram superiores a 50 µg/Kg, que é o valor máximo da curva padrão de aflatoxina utilizado pelo kit de ELISA da Neogen, foram feitas diluições dos filtrados com Metanol 70%, a fim de se obter níveis de aflatoxina dentro da curva padrão (até 50 µg/Kg)¹⁷. Desta forma foram obtidos para essas amostras dois resultados de aflatoxina por ELISA: um sem e outro com diluição do extrato.

Para amostras com valores de aflatoxinas inferiores a 50 µg/Kg, foram seguidos diretamente as instruções do fabricante a partir do filtrado, obtendo-se portanto um único resultado pela técnica de ELISA.

2.2.3 Análise estatística

Os valores de aflatoxinas obtidos pelas técnicas descritas, por apresentarem uma proporcionalidade entre

as médias e seus respectivos desvios padrões nos níveis acima de 50 µg/Kg e violação dos limites naturais entre as médias e desvios nos valores abaixo de 50 µg/Kg, sofreram uma transformação logarítmica para serem submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste t de Student a um nível de significância de 0,1%²⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de aflatoxina total ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) das amostras de amendoim com valores inferiores a 50 µg/Kg estão apresentados na Tabela 1. Em 27 amostras, 8 mostraram-se negativas, tanto pelo método ELISA como pelo método CCD. Observa-se que não foram registrados falsos negativos e falsos positivos quando se compara as técnicas de CCD e ELISA.

Na Tabela 2 são mostradas as médias totais e os respectivos desvios padrões das duas metodologias empregadas, sendo que por ELISA a média geral foi menor quando comparada à CCD. Resultados idênticos foram obtidos por CHU *et al*⁹. Verificou-se também que não houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os níveis de aflatoxina total obtidos por ELISA e CCD, após análise de variância efetuada com os dados transformados (item 2.2.3). AZER & COOPER³ compararam os resultados de aflatoxinas totais obtidos em amendoim e pasta de amendoim por ELISA e CLAE. Foi observado um coeficiente de correlação de 0,963 entre as duas técnicas, e o Test t de Student mostrou que não havia diferença significativa entre os resultados dos dois sistemas ($p < 0,001$). Entretanto, falsos negativos foram observados na faixa de 2-4 µg/Kg. CHU *et al*⁹ observaram também uma excelente correlação (0,91) entre níveis de aflatoxina B_1 , quando foi quantificada em diversos produtos agrícolas (milho, amendoim) por ELISA e CCD.

No Brasil, a presença de aflatoxinas em alimentos é regulada pela Resolução No. 34/76 do Ministério da Saúde⁶, que estabelece 30 µg/kg para a soma das aflatoxinas B_1 e G_1 , e pela Portaria No. 183 do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária⁵, que estabelece o limite máximo de 20 µg/kg, para a somatória das aflatoxinas B_1 , G_1 , B_2 e G_2 acompanhando o estabelecido pelos países do MERCOSUL¹³. Se seguirmos a legislação do Ministério da Agricultura e MERCOSUL teríamos uma correspondência de 92,6% entre os resultados apresentados por ELISA e CCD. Somente as amostras 6 e 7 da Tabela 1 estariam fora dos padrões legais se a metodologia utilizada fosse CCD. Pela técnica de ELISA essas amostras estariam aprovadas (menor que 20 µg/kg).

Tabela 1. Níveis de aflatoxina total ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) em amendoim em grão quantificados por cromatografia em camada delgada e enzyme linked immunosorbent assay (CCD e ELISA).

AMOSTRA	AFLATOXINA TOTAL (µg/Kg)*	
	CCD	ELISA
1	14	19,5
2	2	6,5
3	2	3,3
4	5,5	4,7
5	5,5	6,3
6	30,5	11,5
7	24	10,5
8	39,5	53,5
9	4,5	3
10	8	2,6
11	1,6	3
12	9,5	6
13	8,5	5,5
14	1,6	4,7
15	8	6,6
16	5	5
17	3	6
18	2,5	2
19	50	49,6

* Média de duplicata

Tabela 2. Média geral de aflatoxina total ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) em amendoim em grão quantificados por cromatografia em camada delgada e enzyme linked immunosorbent assay (CCD e ELISA).

Método	AFLATOXINA TOTAL (µg/Kg)*	
	Média Total	Desvio padrão Total
CCD	8,64 a	13,9
ELISA	7,77 a	13,4

* Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste t Student ao nível de 0,1% de probabilidade.

Os resultados de aflatoxina total ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) e as médias e desvios totais das amostras de amendoim com valores superiores a 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Observando-se os valores médios de aflatoxina total entre os diversos tratamentos verifica-se que não há diferença significativa ao nível de 0,1%, entre as técnicas de CCD e ELISA com diluição. Entretanto, valores de aflatoxina obtidos por essas técnicas diferem significativamente com os níveis determinados por ELISA sem diluição ($p < 0,001$). O fato da faixa de concentração da curva padrão da técnica de ELISA ser efetivamente de 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, quantificações fora deste intervalo possivelmente comprometem a exatidão das respostas obtidas. Esses resultados sugerem que em amostras com níveis elevados de contaminação, há uma maior competição entre o analito livre e o analito ligado a enzima com o anticorpo sensibilizado na cavidade de ELISA, podendo resultar em indicações de níveis falsamente menores de aflatoxina. Resultados idênticos foram obtidos por OLIVEIRA¹¹ quando aflatoxinas foram quantificadas em milho por ELISA e CCD.

Tabela 3. Níveis de aflatoxina total ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) em amendoim em grão quantificados por cromatografia em camada delgada e enzyme linked immunosorbent assay (CCD e ELISA com e sem diluição).

Amostra	AFLATOXINA TOTAL ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)*		
	CCD	ELISA c/dil.	ELISA s/dil.
20	440	512	283
21	161	93	27
22	727	436,5	170,5
23	602,5	777,5	272
24	53	45	10,5
25	573,5	244,5	157
26	821,5	810	352
27	192,5	85	52
28	152	75	4
29	458,5	572,5	281
30	119,5	92	31
31	613,5	800	229,5
32	1000,5	1135	268,5
33	1938	1010	510
34	1145,5	1545	374
35	260	222,5	123
36	653	795	294,5
37	232,5	337,5	173,5
38	89	96,5	28,5
39	65	95,5	61,5
40	834	587,5	485
41	229	322,5	232
42	275,5	279	283,5
43	118	77	73,5
44	2587	1465	807

* Média de duplicata

Tabela 4. Média geral de aflatoxina total ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) em amendoim em grão quantificados por cromatografia em camada delgada e enzyme linked immunosorbent assay (CCD e ELISA).

Método	AFLATOXINA TOTAL ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)*	
	Média Total	Desvio padrão total
CCD	573,7a	602,5
ELISA c/dil.	442,5a	442,5
ELISA S/dil.	223,4b	188,8

* Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste t Student ao nível de 0,1% de probabilidade.

Os coeficientes de variação (CV) dos ensaios foram 28% e 7,9% para valores de aflatoxina total inferior e superior a 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente. Os valores de CV encontrados estão próximos aos observados nos ensaios congêneres.^{9,12,15,21}

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem a utilização do teste de ELISA para quantificação de aflatoxinas em amostras de amendoim com níveis inferiores a 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Para valores superiores a 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, os extratos devem ser diluídos para a quantificação ou ELISA pode ser utilizado apenas como método de triagem. Entretanto, novos estudos devem ser executados com outros kits comerciais e testes de recuperação devem ser realizados com padrões em qualquer kit a ser utilizado, como uma rotina de controle de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério da Saúde e CNPq pelo apoio financeiro.

PRADO, G & OLIVEIRA, M.S — Comparison between ELISA and thin layer chromatography in the quantification of aflatoxins in peanut. Rev. Inst. Adolfo Lutz 58(2): 99-104, 1999

ABSTRACT: A method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a thin layer chromatography were compared to determine the aflatoxins in naturally contaminated peanut samples. For values of total aflatoxin concentration until 50 µg/Kg, a significant difference was not observed at the level of $p < 0.001$, when compared to the results obtained by the two methods. For values of total aflatoxin concentration higher than 50 µg/Kg, the ELISA method was only statistically equivalent to thin layer chromatography ($p < 0,001$) when the samples were diluted at maximum level of 50 µg/Kg. No false positives and negatives were obtained by ELISA when it was compared with thin layer chromatography.

KEY WORDS: peanut; aflatoxins; thin layer chromatography; ELISA.

REFERÊNCIAS

1. ALLEN, J. C. Thoughts for food. *Lab. Pract.*, 12: 10-12, 1986.
2. ALLEN, J. C.; SMITH, C. J. Enzyme-linked immunosorbent assay kits for routine food analysis. *Trends Biotechnol.*, 5: 193-199, 1987.
3. AZER, M.; COOPER, C. Determination of aflatoxins in foods using CLAE and a commercial ELISA system. *J. Food Protect.*, 54: 291-294, 1991.
4. BERNER, D. Aflatoxin: Test kit versus chemical methods. *Inform*, 3: 218-219, 1992.
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria No. 183 do Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. *Diário Oficial*, Brasília, 25 mar. 1996. Art. I Adotar Regulamento Técnico do MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, Amendoim e Milho, aprovado pela Resolução No. 56/94 do Grupo Mercado Comum do Sul de 01 de janeiro de 1995.
6. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução No. 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Sec. I pt.I, p.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
7. BRIGIDO, B. M.; BADOLATO, M. I. C.; FREITAS, V. P. S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas — S. P., por aflatoxinas durante o ano de 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55: 85-90, 1995.
8. CHU, F. S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. *J. Food Protect.*, 47: 562-569, 1984.
9. CHU, F. S.; FAN, T. S. L.; ZHANG, G.-S.; XU, Y.-C.; FAUST, S.; McMAHON, P. L. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ in agricultural commodities. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70: 854-857, 1987.
10. GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62: 579-585, 1979.
11. HANSEN, T. J. Immunochemical methods for mycotoxin detection in food products. *Trends Food Sci. Technol.*, 1: 83-88, 1990.
12. HORWITZ, W.; ALBERT, R. The reliability of aflatoxin assays. *Quart. Bull. Assoc. Food and Drug Off. United States*, 46: 14-24, 1982.
13. MERCOSUL. Regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas. [s.n.t.]. (Correspondência interna — MERCOSUL\GMC\Res no 56/94, 1994).
14. NEWSOME, W. H. Potencial and advantages of immunochemical methods for analysis of foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 919-923, 1986.
15. OLIVEIRA, MARIZE SILVA. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e de ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. Dissertação. Mestrado em Ciência de Alimentos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. 1996. 106p.
16. PEREIRA, L. M. & TOLEDO, M. C. F. Micotoxinas: Impacto na saúde humana e sua detecção pelo método de ELISA. *Cad. Téc. Esc. Vet.*, 13: 5-27, 1995.
17. PESTKA, J. J. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71: 1075-1081, 1988.
18. PRADO, G. Metodologias analíticas: tendências internacionais x experiência latinoamericana. In: CRUZ, L. C. H. (ed) *Micotoxinas: perspectiva latinoamericana*. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1996. p. 111-116.

19. PRADO, G.; MATTOS, S. V. M.; PEREIRA, E. C. C. Níveis de aflatoxina em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. *Ci. Tecnol. Alim.*, 9: 138-147, 1989.
20. PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; FERREIRA, S. O. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim comercializado na região metropolitana de Belo Horizonte — MG. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15-17 JULHO, 1988, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998, CD-ROM, cbcta 108.
21. RAM, B. P.; HART, L. P.; SHORTWELL, O. L.; PESTKA, J. J. Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B1 in naturally contaminated corn and cottonseed. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 904-907, 1986.
22. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. CCD vs CLAE: uma análise crítica e comparativa. In: CRUZ, L. C. H. *Micotoxinas: perspectiva latinoamericana*. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. p. 59-77.
23. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Técnicas analíticas para micotoxinas. In: IV ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4-8 outubro, 1988, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p. 245-247.
24. SABINO, M. Prevenção e controle de micotoxinas. In: IV ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4-8 outubro, 1988, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p. 239-244.
25. SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Mycotoxin research in Brazil. *Ciê. Cult.*, 45: 359-371, 1993.
26. SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada á experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
27. SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N.; CALDAS, E. D. Aflatoxinas em alimentos comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56: 49-52, 1996.
28. SOARES, L. M. V.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in brasilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73: 22-26, 1989.
29. VILDES, M. S. Metodologia analítica para micotoxinas. In: MOURA, N. R. (ed). *Micotoxinas em alimentos*. Florianópolis: Insular, 1998. p 83-93.
30. WHO (World Health Organization). *Mycotoxins*. Geneva: UNEP/WHO, 1979. 127 p. (Environmental Health Criteria 11).
31. WILSON, D. M. Analytical method for aflatoxins in corn and peanuts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 308-312, 1989.

Recebido para publicação em 26/03/1999