

Análise Quantitativa de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em Ração para Aves de Corte por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência

Camila Suliani Raota[†], Marcelo Giovanela[†]

Resumo

A contaminação de rações animais por aflatoxinas causa inúmeros danos às aves de corte, sendo a detecção dessas toxinas de extrema importância para evitar prejuízos nos sistemas de produção. Dentro desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo determinar o sistema de extração mais adequado para a análise quantitativa das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em ração animal para aves de corte por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência. Os sistemas de extração avaliados foram o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e a Extração em Fase Sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*) com sílica gel e com coluna de fase reversa C18. Em geral, o sistema de extração QuEChERS apresentou o melhor resultado, com uma recuperação média de 102,5%, além de uma redução de 78% nos custos com reagentes e tempo de análise, em comparação à SPE. Os limites de detecção e de quantificação para este método, em termos de aflatoxinas totais, foram de 0,46 ppb e 0,56 ppb, respectivamente. Além disso, verificou-se que a utilização da CLAE com detecção por fluorescência e associada ao sistema de extração QuEChERS, é uma alternativa precisa, confiável e economicamente viável para a análise quantitativa de aflatoxinas em ração animal para aves de corte.

Palavras-chave

Aflatoxinas, Cromatografia líquida de alta eficiência, Fluorescência, Ração animal, Aves de corte.

Quantitative Analysis of Aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in Poultry Feed by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

Abstract

Contamination of animal feed by aflatoxins is harmful to poultry; therefore, detecting these toxins is extremely important to avoid losses in production systems. In this study, we aimed to develop a more feasible extraction system for the quantitative analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in poultry feed using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with fluorescence detection. The extraction methods evaluated were *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS) and *Solid-Phase Extraction* (SPE) packaged with silica gel and C18 reverse-phase column. The QuEChERS method was found to demonstrate better results than SPE and showed an average recovery of 102.5% with a 78% reduction in spent reagents and analysis time. The detection and quantification limits for this method, in terms of total aflatoxins, were 0.46 ppb and 0.56 ppb, respectively. Moreover, the use of HPLC with fluorescence detection in the QuEChERS method was found to be accurate, reliable, and economically viable for the quantitative analysis of aflatoxins in the animal feed for poultry.

Keywords

Aflatoxins, High-performance liquid chromatography, Fluorescence, Animal feed, Poultry.

I. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são compostos químicos produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasitus* em condições específicas de temperatura e umidade [1, 2]. Elas ocorrem naturalmente em grãos, contaminando o

alimento na colheita, na estocagem ou até mesmo no processamento. As principais aflatoxinas são a B₁, B₂, G₁ e G₂, cujas estruturas químicas encontram-se representadas na Figura 1 [3-6]. Essas substâncias são potencialmente carcinogênicas, provocando lesões especialmente de fígado e rins, além de induzirem a supressão no sistema imunológico [7].

[†]Universidade de Caxias do Sul - Centro de Ciências Exatas e da Tecnologia
E-mail: csraota@ucs.br, mgiovan1@ucs.br

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas varia consideravelmente entre as espécies animais. Na avicultura comercial, a susceptibilidade é maior em patos, seguida de perus, gansos, faisões e frangos [8]. Dentro de uma mesma espécie, a relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade, entre outros fatores [9]. Em muitas espécies, os machos são mais susceptíveis que as fêmeas, mas geralmente a sensibilidade aos efeitos tóxicos é maior quanto mais jovem for a ave [10].

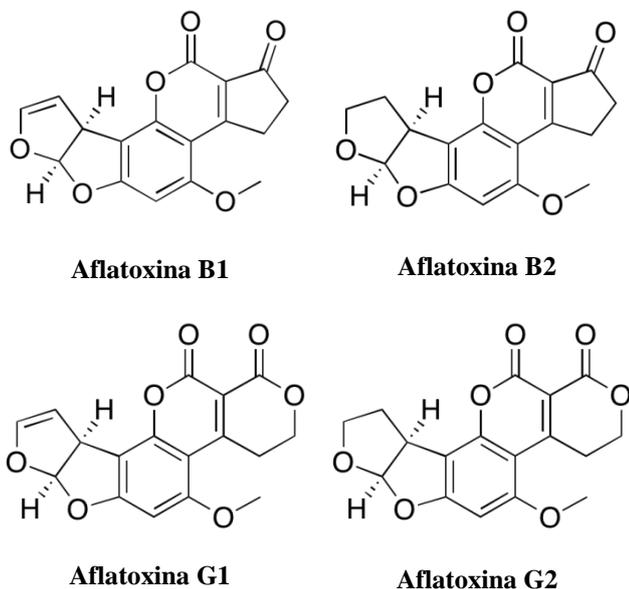


Figura 1. Fórmulas estruturais das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ [3-6]

Os efeitos deletérios das aflatoxinas em frangos são maiores na fase inicial de criação, até os 21 dias de vida; porém, o reflexo negativo sobre o ganho de peso é persistente até a fase final de criação [11]. Os efeitos tóxicos das aflatoxinas, por sua vez, dependem da dose e do tempo de exposição, determinando, assim, intoxicações agudas ou crônicas.

A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com altas concentrações de aflatoxinas, e os efeitos são observados rapidamente. O animal apresenta perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte [12]. Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença. A primeira mudança é alteração no tamanho dos órgãos internos como fígado, baço e rins, enquanto a “*bursa de Fabricius*” e o timo diminuem. Na síndrome crônica, o sinal mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens, ocorrendo quando o animal ingere concentrações pequenas de aflatoxinas por um longo período de tempo [13]. O crescimento de frangos de corte, por exemplo, é reduzido em 5% para cada 1,0 ppb de aflatoxina na ração [14].

De acordo com a Portaria do Ministério da Agricultura nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, o valor máximo permitido de aflatoxinas nas matérias-primas para composição de rações animais é 50 de ppb [15]. Mesmo com uma legislação específica, o controle das matérias-primas não é devidamente realizado. Iqbal et al. [16] evidenciaram em seu trabalho a presença de aflatoxinas em 35% das amostras de carne de frango e 28% dos ovos analisados. Além disso, mais de 10% dos produtos de origem avícola brasileira apresentam contaminação por

aflatoxinas totais [17].

Indiscutivelmente, o consumo de carne de frango é impulsionado pela alta nos preços da carne bovina, e a produção superou 13.000 t no ano de 2015 [18]. Sendo assim, essas toxinas representam um risco iminente para a saúde humana.

As aflatoxinas podem ser detectadas por diversos métodos, desde os mais simples como o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [16, 19], até os mais sofisticados como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) [20-22]. Pelas características de precisão, automação, seletividade e sensibilidade, a CLAE com detecção por fluorescência é a mais apropriada para a determinação e quantificação desses compostos [23].

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo determinar o sistema de extração mais adequado para a análise quantitativa de aflatoxinas totais em ração animal para aves de corte por CLAE, com detecção por fluorescência, analisando os sistemas de extração QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e Extração em Fase Sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*) com sílica gel e com coluna de fase reversa C18.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foi analisada uma amostra de ração animal para frangos no período anterior ao abate, proveniente de um agronegócio do Estado do Paraná. Essa variedade de ração é composta basicamente de milho, farelo de soja e farelo de trigo, que são conhecidos pelo histórico de contaminação com micotoxinas [2].

O padrão de referência utilizado para a quantificação das aflatoxinas foi o Aflatoxin Mix da marca Sigma-Aldrich, com pureza de 99%.

No que concerne aos reagentes, foram utilizados acetonitrila e metanol (ambos de grau cromatográfico) da marca Scharlau; ácido acético (grau cromatográfico) e ácido trifluoroacético (TFA) da marca Sigma-Aldrich; ácido fórmico (pureza > 98%) da marca Merck; e água ultrapura tipo I (água deionizada com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm), obtida a partir de um purificador de água da marca Elga, modelo Purelab Ultra.

Já os materiais utilizados foram o cartucho SPE-ed Sílica Gel 500 mg / 3 mL da marca Applied Separations, o cartucho SPE Cleanert ODS C18-N 500 mg / 3 mL da marca Agela Technologies, o *Extraction Kit* (AOAC) 50 mL e o *Cleanup Kit for Fruit & Vegetables* (AOAC) 15 mL da marca Perkin Elmer.

As análises, por sua vez, foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo Flexar) acoplado a um detector de fluorescência, ambos da marca Perkin Elmer.

A. Extração e Clean Up

A determinação da melhor metodologia de extração e *clean up* das aflatoxinas foi realizada comparando-se os resultados da extração de amostras fortificadas, utilizando cartuchos SPE empacotados com a fase reversa C18 e sílica gel, e com o kit de extração QuEChERS. Todas as

amostras foram tratadas com agente derivatizante e analisadas no sistema cromatográfico com detecção por fluorescência.

Cartuchos SPE C18 e Sílica Gel. A amostra de ração (12,5 g) foi alíquotada em triplicata, em tubos Falcon de 50 mL. Em seguida, as alíquotas foram fortificadas com o padrão de referência, visando uma concentração de aflatoxinas totais de 26,6 ppb.

Adicionaram-se 25 mL da solução de extração constituída de acetonitrila e água, nas proporções de 84% e 16%, respectivamente [24, 25]. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex, e colocadas em um multitorotador por 30 min. Ao término da agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4000 rpm.

Foram alíquotados, então, 10 mL do sobrenadante em um novo tubo Falcon de 50 mL, sendo esta solução evaporada até a secura, em um termobloco a 65 °C. Os sólidos restantes foram ressuspensos em 1 mL da solução acetonitrila/água/ácido acético (840:160:5, v/v), e encaminhados para a etapa de *clean up*.

É importante ressaltar que o *clean up* dos cartuchos SPE C18 tem por princípio a retenção do analito na fase estacionária da coluna previamente condicionada com água contendo 0,5% (v/v) de ácido acético e metanol, enquanto os demais constituintes da matriz são descartados na etapa de lavagem com água acidificada (pH ~ 4,0). A eluição é realizada com um solvente que apresenta alta afinidade com o analito, preferencialmente metanol [20].

A extração com cartuchos de SPE sílica gel é mais simples que a de C18, pois utiliza o princípio da interação da fase estacionária com os interferentes da matriz, fazendo com que o eluato da coluna contenha apenas o analito de interesse [25].

O fluxograma do *clean up* do extrato das amostras de ração por cartuchos SPE C18 e sílica gel é mostrado na Figura 2.

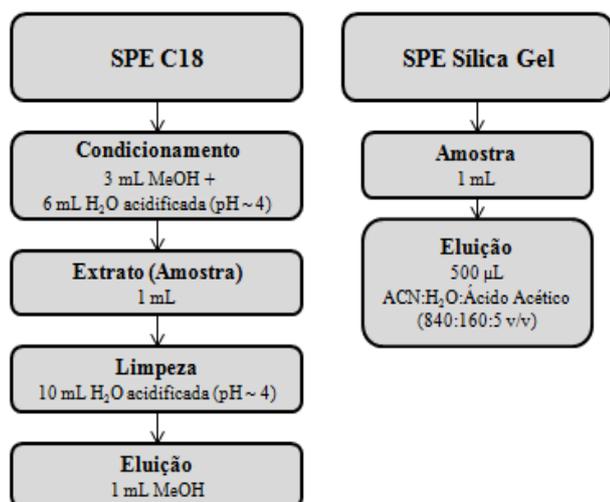


Figura 2. Fluxograma do *clean up* do extrato das amostras de ração por cartuchos SPE C18 e sílica gel

QuEChERS. O sistema de extração QuEChERS baseia-se na utilização de uma mistura de sais, cada um com uma função na extração do analito e limpeza da

matriz. Os sais utilizados foram o sulfato de magnésio, responsável por remover a água; o acetato de sódio, utilizado para estabilizar o pH do meio; e a amina primária secundária (PSA - Primary Secondary Amine) etilenodiamina-N-propil, que retém ácidos graxos livres, açúcares e pigmentos antocianicos [26]. Os kits de QuEChERS disponibilizados comercialmente possuem a mistura de sais na quantidade e proporção corretas, tendo a vantagem de eliminar o tempo de preparo dos reagentes para a extração.

A amostra de ração (10 g) foi alíquotada em duplicata e, após a adição de 10 mL de acetonitrila, o sistema foi agitado em vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados os sais de extração, seguido por nova agitação. Após a centrifugação, 4 mL do sobrenadante foram transferidos para o kit de *clean up*, sendo agitado em vórtex. Centrifugou-se novamente a amostra, e uma alíquota de 1 mL foi retirada para derivatização. O fluxograma do *clean up* do extrato da amostra de ração pelo método QuEChERS é mostrado na Figura 3.

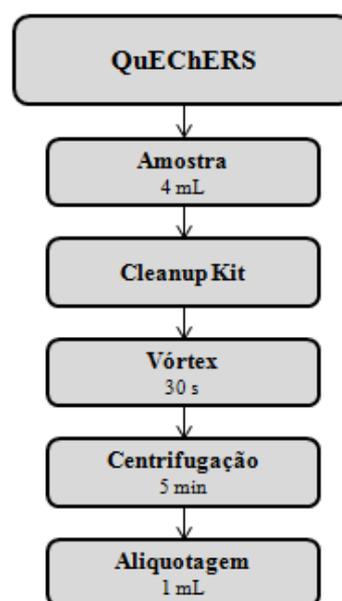


Figura 3. Fluxograma do *clean up* do extrato da amostra de ração por QuEChERS

B. Condições Cromatográficas

O método cromatográfico utilizado na quantificação das aflatoxinas é mostrado na Tabela 1 [25, 27, 28].

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas neste trabalho

Parâmetro	Descrição
Fase móvel A	Água ultrapura tipo I + 0,1% ácido fórmico
Fase móvel B	Acetonitrila + 0,1% ácido fórmico
Fluxo	0,5 mL/min
Coluna cromatográfica	Brownlee Hres C18 50 mm × 2,1 mm × 1,9 µm
Temperatura da coluna	50 °C
Comprimento de onda de fluorescência	Excitação: 365 nm Emissão: 450 nm
Volume de injeção	8 µL

O tempo total de cada corrida foi de 15 min, e a eluição ocorreu da seguinte forma: 0-2 min no modo isocrático em 80% da fase móvel A; 2-14 min no modo gradiente de 80% para 38% da fase móvel A; e 14-15 min no modo isocrático 38% da fase móvel A.

C. Derivatização

O detector de fluorescência tem a capacidade de analisar apenas moléculas que emitem fluorescência. As aflatoxinas são naturalmente fluorescentes, sendo a G₁ e a G₂ com forte intensidade, enquanto a B₁ e a B₂ apresentam intensidade discreta. Para obter menores limites de detecção, é usual realizar uma reação de derivatização, com o objetivo de agregar ao analito um radical fluorescente, facilitando sua detecção [21].

Desse modo, a derivatização foi realizada com uma solução de TFA/ácido acético/H₂O (20:10:70 v/v) [25]. A reação utilizou 20% da solução extraída da amostra de ração, 70% da solução derivatizante, e 10% de uma solução acetonitrila/água/ácido acético (840:160:5 v/v), por 10 min em um termobloco a 65 °C.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Extração e Clean Up

Cartuchos SPE C18. As amostras extraídas com cartuchos de SPE C18 apresentaram baixa recuperação para as aflatoxinas analisadas (em torno de 20%). Isso demonstra que não ocorreu uma interação suficientemente forte entre esses compostos e a fase reversa de C18, durante a passagem da amostra pelo cartucho, fazendo com que grande parte do analito se perdesse nessa etapa.

O procedimento de purificação com SPE C18 baseou-se no trabalho de Baquião [20], que utilizou cartuchos de C18-E da linha Strata, marca Phenomenex, cuja

composição básica é C18 *end-capped*. Esses cartuchos apresentam uma quantidade insignificante de grupos silanois residuais, e que responsáveis por interações mais fortes com compostos apolares [29].

Os cartuchos SPE ODS C18-N da marca Agela Technologies foram utilizados no presente trabalho, devido à sua disponibilidade no laboratório onde as análises foram realizadas. Esses cartuchos são de fase C18 não *end-capped* e apresentam uma quantidade maior de grupos silanois residuais, proporcionando uma maior interação com compostos polares [30]. Dessa forma, observa-se que o fato de a fase estacionária C18 não ser *end-capped* comprometeu o desempenho do cartucho de SPE neste estudo.

Cartuchos de Sílica Gel. As amostras purificadas com o cartucho de sílica gel apresentaram uma recuperação de 93,3%. Evidenciou-se que o processo de *clean up* não foi eficiente na remoção de interferentes, pela presença de inúmeros picos no cromatograma, dificultando a identificação e quantificação das aflatoxinas da fortificação. Outros trabalhos não mencionaram o aparecimento de interferentes nos cromatogramas obtidos pelo método [25].

QuEChERS. As amostras fortificadas e extraídas com o método QuEChERS apresentaram uma recuperação média de 102,5% e os cromatogramas da amostra de ração animal, tanto pura quanto fortificada, evidenciaram elevada eficiência para a retirada de interferentes. Além disso, foi possível identificar os picos cromatográficos relativos às aflatoxinas nas amostras puras, levantando a hipótese de que a amostra estivesse naturalmente contaminada. O cromatograma comparativo entre as réplicas da amostra pura e da amostra fortificada encontra-se na Figura 4.

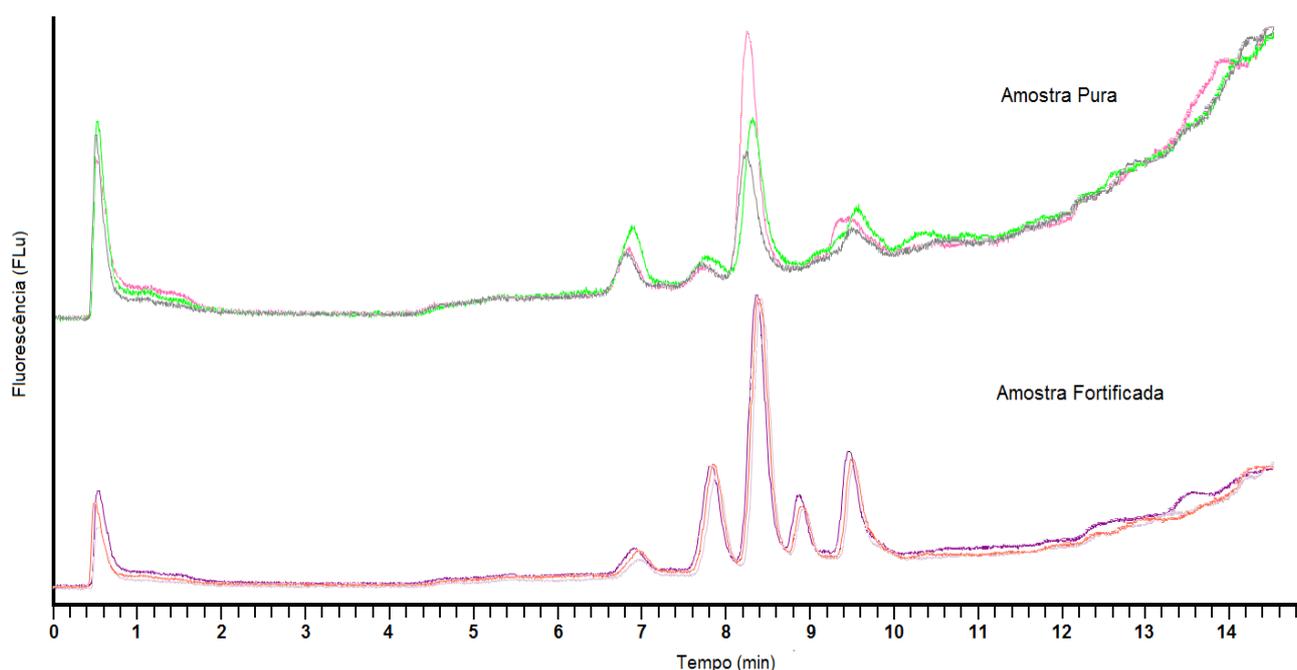


Figura 4. Cromatograma comparativo entre as réplicas da amostra pura e da amostra fortificada com padrão de aflatoxinas,

utilizando QuEChERS como *clean up*

O método QuEChERS tem sido utilizado por vários autores [31, 32], sendo escolhido neste trabalho como o método mais adequado de extração e *clean up* por apresentar melhor desempenho, custo e simplicidade. Um comparativo entre os sistemas avaliados é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Comparativo entre os sistemas de extração avaliados para a quantificação de aflatoxinas totais

Metodologia	Recuperação média (%)	Retirada de interferentes
SPE C18	20	Eficiente
Sílica gel	93	Ineficiente
QuEChERS	102	Eficiente

B. Recuperação

Inicialmente, foi realizada a extração de três réplicas da amostra de ração animal pura e de outras três réplicas fortificadas na concentração de 20 ppb de aflatoxinas totais.

Após a extração e *clean up*, pelo método QuEChERS, as amostras foram derivatizadas e injetadas no cromatógrafo. As recuperações obtidas variaram entre 99,1 e 105,7%. O percentual de recuperação encontrou-se dentro da faixa recomendada (de 70% a 120%) [33], indicando que o método de extração foi adequado para a quantificação de aflatoxinas totais na matriz de ração animal para aves de corte.

C. Curva de Calibração

A curva de calibração (Figura 5) foi construída em triplicata, com dez níveis de concentração cada, abrangendo a faixa de 1,36 ppb a 94,99 ppb de aflatoxinas totais.

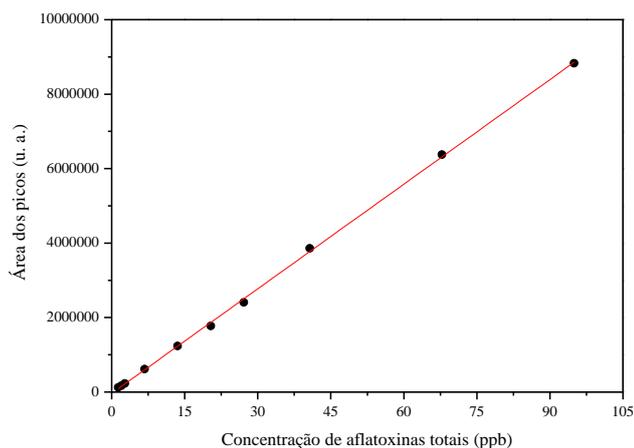


Figura 5. Curva de calibração em termos de aflatoxinas totais

A linha de tendência obtida confirma o comportamento linear da resposta do detector de fluorescência em função da concentração do analito ($R^2 = 0,9996$). O maior valor de RSD% foi de 6,29%, muito abaixo dos 20% recomendados pela literatura para esse

tipo de determinação [33].

D. Limites de Detecção e Quantificação do Método

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram calculados, utilizando-se o desvio-padrão do coeficiente linear e a inclinação da equação da reta inerente à curva de calibração [33].

Dessa forma, os LD e LQ (em termos de aflatoxinas totais) para esse método foram de 0,46 ppb e 0,56 ppb, respectivamente.

E. Comparativo de Custos

Um breve comparativo de custos entre os métodos de extração convencional (extração sólido-líquido), cartuchos SPE com fase reversa C18, cartuchos de sílica gel e QuEChERS é mostrado na Tabela 3, onde são considerados os valores associados aos reagentes, materiais, e ao custo por hora de mão de obra.

Tabela 3. Comparativo de custos entre os métodos de extração e *clean up*

Extração e <i>clean up</i>	Item	Custo total (R\$)
Extração convencional Cartuchos SPE C18	Acetonitrila	6,60
	Metanol	0,60
	SPE C18	7,00
	Mão de obra	96,70
	Total	110,90
Extração convencional Cartuchos sílica gel	Acetonitrila	6,60
	Sílica gel	7,58
	Mão de obra	93,22
	Total	107,40
QuEChERS	Acetonitrila	3,00
	<i>Extraction kit</i>	6,30
	<i>Cleanup kit</i>	8,01
	Mão de obra	6,97
	Total	24,27

O item com maior impacto no valor final do método é o custo com mão de obra, dado que a extração convencional demanda uma quantidade de tempo muito maior que no método QuEChERS.

Desta forma, além de apresentar os melhores resultados na extração e *clean up*, esse método ainda apresenta a maior viabilidade econômica, correspondendo a 22% do custo dos sistemas convencionais de preparo de amostra.

IV. CONCLUSÕES

Na avaliação dos métodos de *clean up*, o cartucho SPE com fase reversa C18 apresentou baixa recuperação na extração da amostra fortificada, causada pela baixa interação entre o analito e a fase estacionária. Nesse sentido, a utilização de cartuchos com sílica C18 não *end-*

capped comprometeu o desempenho do cartucho de SPE neste estudo. O cartucho de sílica gel, por outro lado, apresentou baixa interação com o analito; entretanto, houve baixa retenção de interferentes, praticamente impossibilitando a identificação dos compostos no cromatograma pelo excesso de picos cromatográficos.

Os melhores resultados para a extração e purificação do extrato foram obtidos pelo método QuEChERS, que não apresentaram retenção do analito e ainda retiraram praticamente todo o interferente do extrato. As recuperações obtidas por cada réplica desse método foram de 99,1%, 102,6% e 105,7%, respectivamente. Já os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para esse método, em termos de aflatoxinas totais, foram de 0,46 ppb e 0,56 ppb, respectivamente.

Finalmente, o método QuEChERS não apenas apresentou os melhores resultados na extração e purificação das aflatoxinas em rações animais para aves de corte, como também o menor custo, representando uma redução de 78% nos gastos com reagentes e tempo de análise.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Analitus Análises Biotecnológicas pela oportunidade de realização da pesquisa, fundamental para a conclusão deste trabalho, e à Profa. Valneide Luciane Azpiroz, do Centro de Ciências Humanas e da Educação da Universidade de Caxias do Sul, pela revisão textual.

V. BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Chauhan, et al. Recent advances in mycotoxins detection, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 81, pp. 532-545, 2016.
- [2] J. V. S. Cruz. *Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinias em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo*. Tese de Doutorado em Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- [3] LKT Labs. Aflatoxin B1. Disponível em <<https://www.lktlabs.com/product/aflatoxin-b1/>>. Acesso em 28 set. 2016.
- [4] LKT Labs. Aflatoxin B2. Disponível em <<https://www.lktlabs.com/product/aflatoxin-b2/>>. Acesso em 28 set. 2016.
- [5] LKT Labs. Aflatoxin G1. Disponível em <<https://www.lktlabs.com/product/aflatoxin-g1/>>. Acesso em 28 set. 2016.
- [6] LKT Labs. Aflatoxin G2. Disponível em <<https://www.lktlabs.com/product/aflatoxin-g2/>>. Acesso em 28 set. 2016.
- [7] M. T. Maziero and L. S. Bersot. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil, *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, vol. 12, no. 1, pp. 89-99, 2010.
- [8] S. M. Muller, et al. The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poults to graded levels of aflatoxin. *Poultry Science*, vol. 49, pp. 1346-1350, 1970.
- [9] R. A. Coulombre. Aflatoxins. In: R.P. Sharma; D. K. Salunkhe (Eds.). *Mycotoxins and Phytoalexins*. London: CRC Press, pp. 103-144, 1991.
- [10] M. Mclean and M. F. Dutton. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 65, pp. 163-192, 1995.
- [11] W. E. Huff, et al. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, vol. 65, pp. 1891-1899, 1986.
- [12] G. D. Osweiler. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? *Veterinary Medicine*, vol. 85, pp. 1009-1016, 1990.
- [13] S. Leeson, et al. *Poultry metabolic disorders and mycotoxins*. Guelph: University Books, 1995.
- [14] Y. Dersjant-Li, et al. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry, *Nutrition Research Reviews*, vol. 16, pp. 223-239, 2003.
- [15] Brasil. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da União. Brasília, 18 fev. 2011.
- [16] S. Z. Iqbal, et al. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs, *Food Control*, vol. 43, pp. 98-103, 2014.
- [17] T. L. M. Stamford, et al. Pesquisa micotoxicológica de produtos avícolas "in natura" e processados, *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, vol. 23, no. 1, pp. 135-160, Jan./Jun. 2005.
- [18] APINCO. Potencial de produção do primeiro semestre de 2016. Disponível em <<http://www.avisite.com.br/economia/index.php?acao=carnefrango>>. Acesso em 13 jun. 2016.
- [19] I. Kamika, et al. Occurrence of aflatoxin contamination in maize throughout the supply chain in the Democratic Republic of Congo, *Food Control*, vol. 69, pp. 292-296, 2016.
- [20] A. C. Baquião. *Fungos e micotoxinas em castanhas-do-Brasil, da colheita ao armazenamento*. Tese de Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- [21] N. Arroyo-Manzanares, et al. Aflatoxins in animal feeds: A straightforward and cost-effective analytical method, *Food Control*, vol. 54, pp. 74-78, 2015.
- [22] R. Kosicki, et al. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feeding stuffs, *Animal Feed Science and Technology*, vol. 215, pp. 165-180, 2016.
- [23] I. Hussain. Aflatoxin measurement and analysis. In: I. Torres-Pacheco. *Aflatoxins – detection, measurement and control*, Rijeka, Ed. Intech, 2011.
- [24] I. M. Castro and M. R. Anjos. *Comunicado Técnico 158 – Determinação de aflatoxinas em milho por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência – CLAE/DF*, EMBRAPA, Rio de Janeiro, dez. 2009.
- [25] C. A. Mallman, et al. *Comparação de metodologias analíticas e de amostragem para micotoxinas*. Universidade Federal de Santa Maria, 2011.
- [26] K. Sharmili, et al. Development, optimization and validation of QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of multimycotoxin in vegetable oil, *Food Control*, vol. 70, pp. 152-160, 2016.
- [27] L. A. Corcuera, et al. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin in a rat plasma, liver and kidney, *Journal of Chromatography B*, vol. 879, pp. 2733-2740, 2011.
- [28] F. M. Trombete, et al. Validação intralaboratorial de metodologia para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em trigo e produtos derivados, *Pesquisa Agropecuária Tropical*, vol. 44, no. 3, pp. 255-262, jul./sept. 2014.
- [29] Phenomenex. SPE Strata. Disponível em <<http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata>>. Acesso em 28 set. 2016.
- [30] Agela Technologies. SPE Cleanert S C18-N. Disponível em <<http://www.bonnaagela.com/product/detail/156>>. Acesso em 28 set. 2016.
- [31] L. C. Cabrera, et al. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos, *Scientia Chromatographica*, vol. 4, no. 3, pp. 227-240, 2012.
- [32] O. D. Prestes, et al. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo da amostra para a determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos, *Scientia Chromatographica*, vol. 3, no. 1, pp. 51-64, 2011.
- [33] A. N. Fernandes, et al. Determination of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in surface waters from a Brazilian subtropical hydrographic basin, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 92, pp. 455-459, 2014.