

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PARECER

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Wildes Maria Scussel e aprovada pela Comissão Julgadora em 14.12.84.
Campinas, 14 de dezembro de 1984.

Délia R. L. Ay

Presidente da Banca

ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM

AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.), MILHO (*Zea mays* L.)

E PRODUTOS DERIVADOS

WILDES MARIA SCUSSEL
Farmacêutica Bioquímica
Tecnóloga de Alimentos

ORIENTADORA:

Dra. DÉLIA RODRIGUEZ AMAYA

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Campinas - S.P. 1984

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICATÓRIA

À minha mãe que se sobrecarregou de renúncias e sacrifícios para que a minha caminhada até aqui se tornasse realidade.

À minha irmã pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

À FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de pós-graduação.

Ao Departamento Autônomo de Saúde Pública de Santa Catarina pela concessão de licença para a participação no curso.

À Divisão de Bromatologia do DASP/SC, nas pessoas do Professor Glauco Sanford Vasconcelos e Prof. Rogério Goulart, bem como, ao pessoal do Laboratório de Bromatologia pelo incentivo e compreensão.

Ao Prof. José Luiz Pereira pela orientação na execução das técnicas microbiológicas.

Ao Prof. William da Silva pela valiosa colaboração no fornecimento das amostras das cultivares de milho desenvolvidas no Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP.

À Yvelise T.C. Shebella e Jane M.S. Philippi pelo auxílio na datilografia.

À Senhora Irma N. Honório pela solicitude e ao pessoal do Laboratório de Análises de Alimentos da FEAA/UNICAMP que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À Célia Sylos pelo auxílio em algumas análises.

Às professoras Lúcia Valente Soares e Lyreni A.G. Gonçalves pela revisão do português.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação ABIA, pelas cópias.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Dra. Dêlia Rodriguez Amaya, por sua dedicação, empenho e estímulo prestados ao incentivar e acompanhar este trabalho, bem como, o voto de confiança e apoio recebidos, dentro do melhor critério e espírito científico, durante o desempenho das atividades.

A esta pessoa amiga de profunda compreensão e seriedade de trabalho, o carinho da estima e a lembrança grata.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - Perspectiva Histórica.....	4
2.2 - Propriedades Físicas e Químicas das Aflatoxinas...	9
2.3 - Fungos Produtores de Aflatoxinas.....	12
2.4 - Fatores que Influenciam o Desenvolvimento de Fungos e a Produção de Aflatoxinas.....	13
2.5 - Toxicidade.....	21
2.6 - A Pesquisa sobre Aflatoxinas no Brasil.....	27
2.7 - Desenvolvimento de Métodos Analíticos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 - Coleta e Preparo das Amostras.....	42
3.2 - Verificação dos Teores de Aflatoxinas durante Esto_ cagem	45
3.3 - Verificação da Possível Contaminação do Milho no Campo.....	46
3.4 - Estudo <u>in vitro</u> da Susceptibilidade de Quatro Cul- tivares de Milho à Contaminação por Aflatoxinas...	48
3.5 - Métodos Analíticos.....	49
3.5.1 - Métodos de Triagem.....	49
a) Método de Romer para produtos em geral "OFA" (AOAC, 1980).....	49
b) Método de Holaday-Velasco para milho "OFA" (AOAC, 1980).....	50

c) Método de triagem rápida para milho "OFA" (AOAC, 1980).....	50
3.5.2 - Métodos de Quantificação.....	51
a) Método I(CB) para amendoim e produtos de amendoim "OFA" (AOAC, 1980).....	51
b) Método II(BF) para amendoim e produtos de amendoim "OFA" (AOAC, 1980).....	52
c) Método para aflatoxinas do Instituto Adolfo Lutz (1976).....	53
d) Método para aflatoxinas do Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas (1982).....	55
e) Método de Romer (1975).....	55
f) Método para milho "OFA" (AOAC, 1980).....	56
3.5.3 - Métodos de Confirmação.....	56
a) Método de Przybylski (1975).....	56
b) Método de confirmação de aflatoxinas pelo uso de soluções aquosas à 25% de ácidos inorgânicos (Schuller <i>et al.</i> , 1967).....	57
c) Éter etílico (Nabney e Nesbitt, 1965).....	57
3.6 - Comparação de Métodos Analíticos.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 - Comparação dos Métodos Analíticos.....	59
4.1.1 - Métodos de Triagem.....	59
4.1.2 - Métodos de Quantificação.....	61
4.2 - Teores de Aflatoxinas em Amendoim e seus Produtos Comercializados em Campinas de 1980 a 1982.....	67
4.3 - Teores de Aflatoxinas em Milho e seus Produtos Comercializados em Campinas em 1982.....	73
4.4 - Produção de Aflatoxinas em Produtos de Amendoim Durante a Estocagem.....	76
4.5 - Possível Contaminação com Aflatoxinas em Quatro Cultivares de Milhos em Três Estádios de Maturação.....	84

4.6 - Estudo <u>in vitro</u> da Susceptibilidade de Quatro Cultivares de Milho.....	86
5. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	135

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Dose Letal de Aflatoxina B ₁ em Várias Espécies Animais....	23
2. Descrição e Procedência das Amostras de Amendoim e Produtos Derivados.....	43
3. Descrição e Procedência das Amostras de Milho e Produtos Derivados.....	44
4. Comparação dos Métodos de Triagem para Aflatoxinas....	60
5. Comparação dos Métodos de Quantificação para Aflatoxinas....	63
6. Características dos Extratos Obtidos de Vários Métodos....	64
7. Avaliação da Repetibilidade dos Métodos Quantitativos.	65
8. Avaliação da Reprodutibilidade dos Métodos Quantitativos..	68
9. Incidência de Aflatoxinas em Amendoim e seus Produtos Comercializados em Campinas (1980/1982).....	70
10. Teores de Aflatoxinas nas Amostras Positivas.....	71
11. Incidência de Aflatoxinas em Milho e seus Produtos Comercializados em Campinas em 1982.....	75
12. Produção de Aflatoxinas em Cultivares de Milho Inoculado com <u>A. parasiticus</u>	88

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Fórmulas estruturais das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	7
2. Fórmulas estruturais das aflatoxinas M ₁ e M ₂	8
3. Fórmulas estruturais das aflatoxinas B _{2a} e G _{2a}	9
4. Teores de aflatoxinas B ₁ e G ₁ em amendoim cru (in natura), preparado de matéria-prima contaminada.....	78
5. Teores de aflatoxinas B ₁ e G ₁ em amendoim doce, preparado de matéria-prima contaminada.....	79
6. Teores de aflatoxinas B ₁ e G ₁ em amendoim doce com chocola te, preparado de matéria-prima contaminada.....	80
7. Teores de aflatoxinas B ₁ e G ₁ em amendoim frito e salgado, preparado de matéria-prima contaminada.....	81

RESUMO

Foram comparados vários métodos oficiais de triagem e quantificação de aflatoxinas para amendoim, milho e produtos derivados com a finalidade de encontrar um método confiável, de baixo custo, apropriado para as condições laboratoriais brasileiras. O método de triagem e quantificação de Romer mostrou-se superior em todos os aspectos, ou seja, precisão, exatidão, sensibilidade e rapidez.

Utilizando o método escolhido, foi realizada uma avaliação da incidência de aflatoxinas em amendoim, milho e seus produtos comercializados na região de Campinas de 1980 a 1982. De 241 amostras de amendoim, 128 apresentaram resultado positivo, das quais 92 continham teores acima do limite de tolerância permitida pela legislação brasileira. Paçoca, amendoim japonês, amendoim cru sem casca e amendoim frito salgado foram os produtos que apresentaram maior contaminação. Por outro lado, de 83 amostras de milho coletadas durante o ano de 1982 somente 2 apresentaram aflatoxinas com valores de apenas 14 e 18 ppb.

Com o objetivo de verificar a possível produção de aflatoxinas sob condições normais de armazenamento, produtos de amendoim foram preparados a partir de amendoim já contaminado (teores iniciais médios de 48 ppb de B₁ e 24 ppb de G₁) e amendoim isento de aflatoxinas. Os produtos foram embalados em sacos plásticos e armazenados à temperatura ambiente na presença e ausência de luz. Foi utilizado amendoim cru como controle. Não se detectou aflatoxinas em quaisquer amostras de amendoim cru e produtos provenientes de amendoim isento de aflatoxinas durante todo o período de estocagem (270 dias). Nas amostras de produ-

tos preparados de amendoim contaminado, ocorreu elevação significativa dos teores de aflatoxinas B₁ e G₁ nos produtos estocados ao abrigo da luz, ao passo que pouca ou nenhuma mudança foi constatada nos produtos estocados à luz ambiente. Das amostras estocadas em ausência de luz, o amendoim cru (atingindo 302 ppb de B₁ e 251 ppb de G₁) e amendoim doce (atingindo 394 ppb de B₁ e 190 ppb de G₁) foram os que apresentaram o maior aumento de toxinas. Uma vez que o tratamento dos produtos foi suficiente para eliminar os fungos e seus esporos, a elevação dos teores de aflatoxinas se verificou aparentemente devido a uma nova invasão das sementes pelos fungos produtores de aflatoxinas após processamento.

A possível presença de aflatoxinas em quatro cultivares de milho (Cubano, Maya Normal, Maya Opaco e Nutrimaiz) foi verificada em três estádios de maturação (verde, pastoso e seco). Para cada cultivar, em cada estágio foram coletadas 200 espigas, em amostras estratificadas dos lotes isolados cultivados na área experimental do Departamento de Genética e Evolução, na UNICAMP. Não foram detectadas aflatoxinas em nenhuma das amostras. No estudo in vitro, os grãos das quatro cultivares no estágio seco foram inoculados com Aspergillus parasiticus e incubados em umidade relativa de 81 e 90% à temperatura de 30°C. O crescimento de fungos tornou-se visível somente após 40 dias de incubação. Neste período, a cultivar Maya Normal não apresentou aflatoxinas nas duas condições de umidade relativa. As outras três cultivares apresentaram contaminação, sendo os níveis de aflatoxinas maiores para a umidade mais alta. As cultivares Nutrimaiz e Maya Opaco, ambas com qualidade superior de proteínas, demonstraram maior produção de aflatoxinas.

SUMMARY

Various official methods for screening and quantitation of aflatoxins in peanut, corn and their products were compared with the view of finding a method that is reliable, inexpensive and appropriate to Brazilian laboratory conditions. The screening and quantitation method of Romer was found superior in all aspects, i.e. precision, accuracy, sensitivity and time of analysis.

Using the method chosen, an evaluation of the incidence of aflatoxins in peanut, corn and their products commercialized in Campinas from 1980 to 1982, was undertaken. Of 241 peanut samples, 128 were found positive, 92 of which had levels higher than the tolerance limit permitted by Brazilian legislation. Ground peanut bar, soypeanut, raw shelled peanut and fried salted peanut showed greater contamination. On the other hand, of 83 samples of corn collected during the year 1982, only two samples had aflatoxins at levels of 14 and 18 ppb.

To verify the possible production of aflatoxins under normal storage conditions, peanut products were prepared from a lot already contaminated, with initial average levels of 48 ppb of B₁ and 24 ppb of G₁, and another lot free of aflatoxins. The products were stored in plastic bags at ambient temperature in the presence or absence of light. Raw peanut was utilized as control. No aflatoxins were detected in any of the samples of raw and processed peanut derived from the aflatoxin-free lot during the entire storage period (270 days). In the products prepared from contaminated peanuts, a significant increase in the levels of aflatoxins B₁ and G₁ was observed in the samples

stored in the dark, while slight or no change was observed in the products exposed to light. Of the samples stored in the absence of light, the raw peanut (reaching 302 ppb of B₁ and 251 ppb de G₁) and sugar-coated peanut (reaching 394 ppb of B₁ and 190 ppb of G₁) presented the highest increase. Since the treatment received by the products was sufficient to eliminate the fungi and their spores, the rise in aflatoxin content was apparently due to recontamination of the seeds by aflatoxin producing fungi after processing.

The possible presence of aflatoxins in 4 cultivars of corn (Cubano, Maya Normal, Maya Opaco and Nutrimaiz) was also verified at 3 stages of maturity (milk, soft dough, hard dough). For each cultivar at each stage, 200 corn ears were collected as stratified samples from the entire isolation block at the Experimental Field of the Department of Genetics and Evolution at UNICAMP. Aflatoxins were not detected in any of the samples. In an in vitro study, corn grains of the 4 cultivars in the dry stage were inoculated with Aspergillus parasiticus and incubated at a relative humidity of 81% or 91% at a temperature of 30°C. Fungal growth became visible only after 40 days of incubation. At this time the Maya Normal cultivar did not present aflatoxins at both conditions of relative humidity. The other cultivars were contaminated, the aflatoxin levels being higher at the higher relative humidity. The Nutrimaiz and Maya Opaco cultivars, both possessing superior protein quality, demonstrated higher production of aflatoxins.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as micotoxinas encontradas em alimentos, as que causam maior dano aos animais e aos seres humanos são as aflatoxinas. A aflatoxina B₁ é considerada o mais potente composto hepatocarcinogênico conhecido. Junto com outros compostos do grupo, possui propriedades tóxicas incluindo mutagenese, teratogenese e toxicidade celular aguda. Podem ser fatais para recém-nascidos e crianças por estas serem mais susceptíveis que os adultos (Amla et al., 1970; Bourgeois et al., 1971).

As aflatoxinas pertencem ao grupo das di-furanocumarinas contendo em suas moléculas grupos lactona, carbonila e éter além de um anel aromático. São metabólitos secundários tóxicos de fungos que infectam vários produtos de origem vegetal. O fungo produtor destes metabólitos primeiramente isolado foi o Aspergillus flavus. Estudos posteriores, porém, comprovam a existência de outros fungos do gênero Aspergillus e Penicillium que produzem a toxina em quantidades variáveis. Estes fungos encontram-se espalhados na natureza, no solo, no ar, em ambientes que ofereçam condições para seu desenvolvimento como nos alimentos. Para o seu crescimento, há necessidade de condições propícias de umidade, temperatura, composição do substrato, inclusive condições físicas favoráveis, tais como danos mecânicos ocorridos durante a colheita, transporte, armazenamento e processamento de alimentos.

As condições ambientais favoráveis de umidade e temperatura são amplamente encontradas nas regiões tropicais e subtropicais. Inúmeros trabalhos alegam que os alimentos produzidos nos países localizados nestas regiões são os mais atingi-

dos pela invasão do fungo e conseqüentemente altamente contaminados por aflatoxinas.

Nos últimos vinte anos, as atividades neste campo tem sido bastante intensas e centenas de artigos científicos tem sido publicados, principalmente nos Estados Unidos e Inglaterra. Contudo, esta ameaça à saúde humana e animal ainda não encontrou soluções definitivas.

O Brasil é um país de clima predominantemente tropical com todas as condições que levam à contaminação dos alimentos por aflatoxinas. De fato, foi o país que historicamente deu início à toda a preocupação sobre estas toxinas por ter fornecido farelo de amendoim contaminado que provocou a morte de centenas de peruzinhos na Inglaterra em 1960.

[Dos poucos trabalhos realizados em nosso país em relação a aflatoxinas, a maioria envolve levantamento dos teores encontrados em alimentos e rações (Tango, 1965/1966; Menezes et al., 1965/1966; Fonseca, 1968, 1973 a,b,c, 1975, 1976 b,c,d,e; Fonseca e Del Nery, 1970; Pregnotato e Sabino, 1969/1970. Arckoll, 1977; Sabino, 1980; Sabino et al., 1982; Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas, 1982).] Os trabalhos ainda não alcançaram uma amostragem abrangente e significativa para definir a situação atual do país quanto à extensão do problema das aflatoxinas. Além disso, uma vez que as condições mudam de um ano para o outro, a constante monitoração dos níveis de aflatoxinas se faz necessária até que o problema seja solucionado.

[Foram somente três os trabalhos que abordaram as condições que influenciam a produção de aflatoxinas durante a estocagem, relacionando temperatura, conteúdo de umidade e umidade

relativa (Yokoya et al., 1970 e 1971; Tango 1972a e Costa et al., 1974).

Os objetivos do presente trabalho são: 1) Comparar métodos analíticos de triagem e quantificação quanto à sensibilidade, exatidão, economia e rapidez, a fim de escolher os métodos mais apropriados às condições e necessidades dos laboratórios nacionais. 2) Determinar os teores de aflatoxinas em amendoim, milho e seus produtos comercializados na cidade de Campinas. 3) Estudar a possível produção de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados sob condições naturais de armazenamento. 4) Verificar a possível contaminação por aflatoxinas de quatro cultivares de milho em três estádios de maturação no campo. 5) Estudar in vitro a susceptibilidade dos quatro cultivares à produção de aflatoxinas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Perspectiva Histórica

Uma doença de etiologia desconhecida responsável por elevada taxa de mortalidade em peruzinhos, foi relatada por Stevens et al. na Inglaterra em 1960, chegando a atingir 70% da criação e, em alguns casos, 100%. Os sintomas típicos relatados foram ingurgitamento e congestão renal com hemorragia ou necrose do fígado. As lesões encontradas no fígado mostraram-se semelhantes às encontradas nos Estados Unidos e Canadá em 1959 (Snoeyenbos et al.; Mongeau et al.).

No mesmo ano e no mesmo país, um grave acidente econômico ocorreu com a morte de mais de 100.000 perús de 4 a 6 semanas de idade, provocada por uma doença que apresentava sintomas semelhantes aos relacionados acima. Esta doença foi denominada, por não apresentar causa aparente, de "Turkey X Disease" (Blount, 1961 a,b). Apareceram mais tarde os mesmos distúrbios em faisões e patos.

Na mesma época, incidentes semelhantes ocorreram no Kênia e Uganda em patos e pintos de poucas semanas de idade, sendo observado que também outras aves domésticas eram susceptíveis a esta afecção (Asplin e Carnaghan, 1961; Blount, 1961; Carnaghan e Sargeant, 1961; Sargeant et al., 1961 a,b).

Siller e Osttler, (1961) e Wannop, (1961) afirmaram que a alteração histológica mais significativa ocorria no fígado e que a mesma desaparecia com a mudança da ração.

Em 1961, Blount verificou um ponto comum na morte dos peruzinhos e de outras aves de criação na Inglaterra: a inges-

tão de rações que continham farelo de amendoim de procedência brasileira. Posteriormente, constatou-se que farelos procedentes de outras regiões como Uganda, Kênia, Nigéria, África Ocidental, Gâmbia e Índia também eram responsáveis pelos mesmos sintomas clínicos e histopatológicos (Carnaghan e Sargeant, 1961).

Alterações semelhantes foram observadas em bovinos (Loosmore e Markson, 1961), suínos (Loosmore e Harding, 1961; Amaral, 1961) e em frangos de corte (Raimo et al., 1962) alimentados com rações à base de amendoim.

Ainda em 1961, surgiu a primeira evidência de efeito carcinogênico. Uma alta proporção de ratos alimentados com ração contaminada com níveis abaixo daqueles que causam sintomas de intoxicação aguda desenvolviam tumores malignos (Lancaster et al.). Dois anos depois, foram constatados hepatomas em trutas, de criações comerciais alimentadas com farelos de algodão (Wolf e Jackson, 1963).

Com estas observações, ocorreu grande mobilização por parte dos pesquisadores para isolar e identificar o agente tóxico.

Pelo grande número de hifas encontradas nas tortas de amendoim, julgou-se ser um fungo o responsável pelo fator tóxico. Sargeant et al. em 1961 demonstraram que a toxidez era devida a metabólitos de certas linhagens de Aspergillus flavus. O fungo, portanto, foi isolado e identificado como Aspergillus flavus Link ex Fries, de onde se origina o nome aflatoxina.

Vários pesquisadores mostraram que o fator tóxico após cromatografia em papel, separava-se em várias substâncias apresentando fluorescência azul sob iluminação ultravioleta. Ex-

traindo-as do papel e administrando-as a patos de um dia, apareciam os efeitos tóxicos (Sargeant et al., 1961).

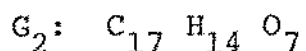
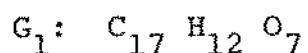
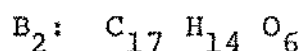
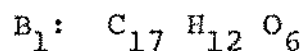
Mais tarde, Nesbitt et al. em 1962, utilizando cromatografia de camada delgada, separaram duas substâncias que apresentaram fluorescência azul-violeta e verde sob luz ultravioleta, de fórmula empírica $C_{17}H_{12}O_6$ e $C_{17}H_{12}O_7$ (pela análise elementar e espectrometria de massa), denominando-as aflatoxinas B e G.

De Iongh et al. em 1962 separaram várias zonas fluorescentes por cromatografia em camada delgada de um extrato tóxico proveniente de ração de amendoim contaminada e de um extrato obtido de cultura de Aspergillus flavus em meio líquido artificial. As quatro manchas fluorescentes separadas foram denominadas FB_1 , FB_2 , FG_1 e FG_2 . A FB_1 , que apresentava fluorescência azul, foi isolada e a sua fórmula bruta determinada como $C_{17}H_{12}O_6$ por espectrometria de massa.

Smith e Mc Kermann (1962) isolaram 12 componentes fluorescentes do extrato de uma cultura de Aspergillus flavus, sendo que cinco destes provocaram lesões hepáticas em patinhos. Duas apresentavam fluorescência azul esverdeada em contraste com o azul escuro das outras três.

Em 1963, Hartley et al. isolaram quatro toxinas por cromatografia em camada delgada, as quais denominaram B_1 , B_2 , G_1 e G_2 . A aflatoxina B_1 parecia idêntica à substância que De Iongh et al. (1962) designaram de FB_1 . Observaram, por ressonância nuclear magnética, que tanto a aflatoxina B_1 quanto a aflatoxina G_1 possuíam anel di-hidrofurano e grupo metoxila e que quando hidrogenados se transformavam em B_2 e G_2 (Chang, 1963). Por espec-

trometria de massa obtiveram as seguintes fórmulas:



Os espectros de absorção nas regiões ultravioleta e infravermelha mostraram-se bastante próximos, indicando uma grande semelhança entre as estruturas dos quatro compostos.

As fórmulas estruturais das aflatoxinas (Figura 1) assim como as propriedades físico-químicas foram determinadas (De Iongh, 1962; Nesbitt *et al.*, 1962; Van Der Zijden *et al.*, 1962; Chang *et al.*, 1963; Van Dorp *et al.*, 1963 e Asao *et al.*, 1963 e 1965).

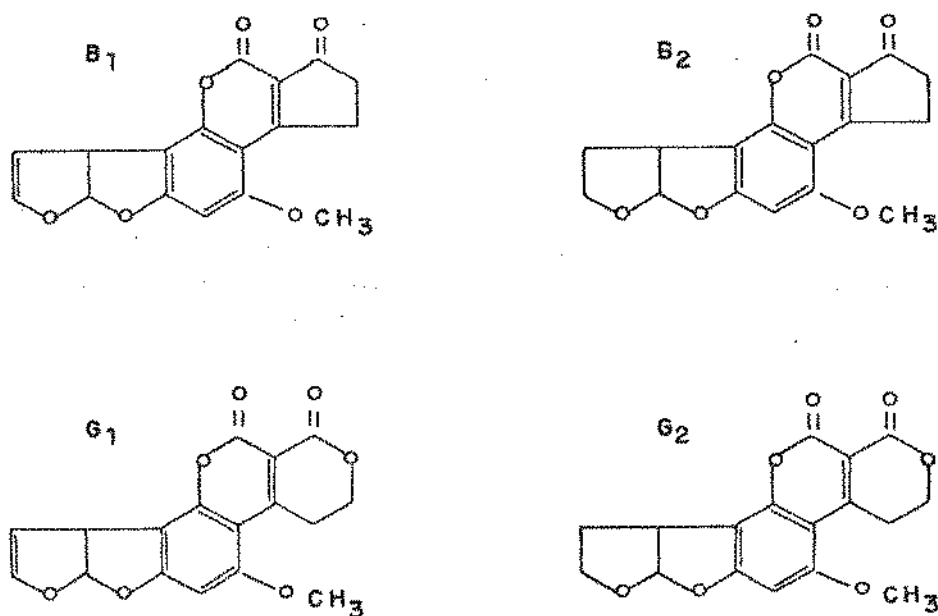
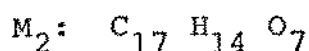
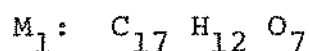


Figura 1 - Fórmulas estruturais das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

Allcroft e Carnaghan em 1963a observaram que o leite produzido por vacas alimentadas com ração tóxica de amendoim, causava os mesmos efeitos tóxicos que as aflatoxinas em patinhos. Van der Linde et al. (1965) demonstraram que a aflatoxina M aparecia no leite dois dias após a ingestão de ração tóxica pela vaca sendo que o total secretado era menor do que 0,5% da dose ingerida (8 µg/dia). A aflatoxina M pode ser também produzida por algumas linhagens de Aspergillus (Holzapfel et al., 1966). Campbell et al. em 1970 encontraram aflatoxina M₁ em urina humana.

Pela elucidação da estrutura da aflatoxina M por espectrometria de massa, ultravioleta, infravermelho e por ressonância nuclear magnética, duas substâncias foram identificadas:



A aflatoxina M é um hidróxido derivado da aflatoxina B₁, apresentando hidroxila no carbono C₄ do anel furano terminal. Apresenta fluorescência azul mais escura que a da aflatoxina B. A dose letal DL₅₀ para patinhos de um dia é de 16,6 µg para M₁ e de 62,0 µg para a aflatoxina M₂, portanto são tão tóxicas quanto as toxinas B₁ e B₂, respectivamente (Holzapfel et al., 1966).

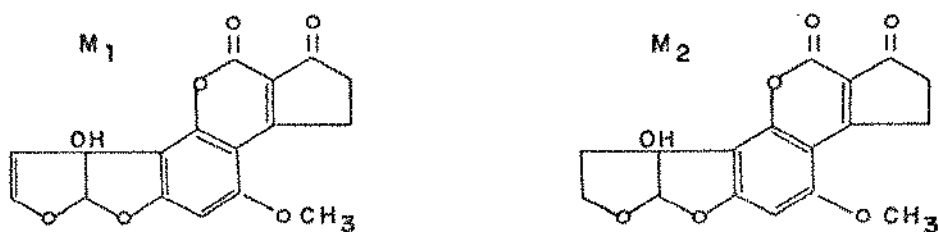


Figura 2 - Fórmulas estruturais das aflatoxinas M₁ e M₂.

As aflatoxinas B_{2a} e G_{2a} de fórmulas moleculares C₁₇H₁₄O₇ e C₁₇H₁₄O₈, também são hidroxiderivados das aflatoxinas B₁ e G₁ com grupo hidroxila na posição 2 do anel furano terminal e já foram isoladas de culturas de Aspergillus flavus (McLean e McLean, 1966; Donkerloot et al., 1968; Dutton e Heathcote, 1966 e 1968; Heathcote e Dutton, 1969; Magoon et al., 1970).

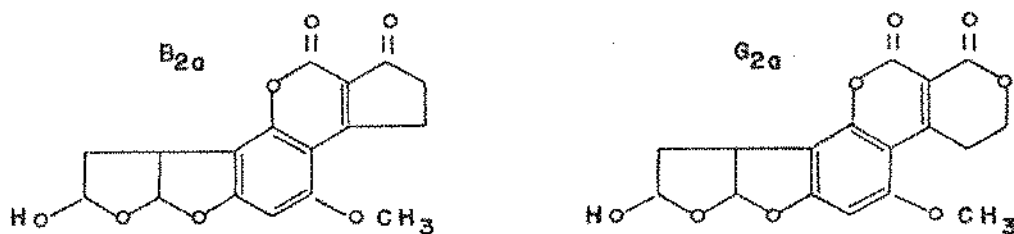


Figura 3 - Fórmulas estruturais das aflatoxinas B_{2a} e G_{2a}.

Outras aflatoxinas foram citadas também na literatura: GM₁, (Allcroft et al., 1966); BM₁ e B₃ (Magoon et al., 1970; Patterson, 1973), P₁ (Dalezios et al., 1971; Buchi et al., 1973), H₁ (Salhab et al., 1975); Q₁ (Buchi et al., 1974; Masri, 1974) e aflatoxicol (Detroy e Hesseltine, 1968, 1969, 1970; Magoon, 1970; Robertson et al., 1970; Patterson, 1973).

2.2 - Propriedades Físicas e Químicas das Aflatoxinas

As aflatoxinas têm ponto de fusão elevado. São bastante solúveis em solventes orgânicos polares como clorofórmio e acetona, moderadamente solúveis em éter de petróleo e podem ser recristalizadas facilmente.

No espectro de fluorescência as aflatoxinas apresentam intensidade de emissão muito variada. A fluorescência da B₂ por exemplo é oito vezes maior que a B₁, enquanto que a M₁ e a M₂ são três vezes mais fluorescentes que a B₁ e a B₂, respectivamente. As aflatoxinas B₁, B₂, M₁ e M₂ têm o mesmo peso molecular e sua emissão máxima é sempre igual ou próxima a 425 nm. Já as que apresentam moléculas maiores, ou seja, G₁ e G₂, a fluorescência é observada a 450 nm (Carnaghan et al., 1963; Coomes et al., 1965; Magoon et al., 1970).

Na região ultravioleta, as aflatoxinas em metanol, absorvem nos comprimentos de onda de 223, 265 e 363 nm. As aflatoxinas B₁ e G₂ absorvem mais intensamente do que B₂ e G₁. No comprimento de onda 363 nm, as toxinas B₂, G₂ e M₁ absorvem menos intensamente do que B₁, G₁ e M₂. Na presença de bases, a absorção em 363 nm das aflatoxinas B₁, B₂, M₁, M₂, G₁ e G₂ desaparece (Asao et al., 1965; Wogan, 1966).

No espectro infravermelho, em clorofórmio, todas as aflatoxinas apresentam banda em 1760, 1690, 1932 e 1598 cm⁻¹. A banda em 1760 cm⁻¹ é atribuída ao grupo δ lactona que também foi descrito para compostos di-furanolactonas sintéticos (Lang et al., 1967). O grupo hidroxila livre é indicado por uma banda em 3425 cm⁻¹ para M₁ e M₂ e em 3620 cm⁻¹ para B_{2a} e G_{2a}. A presença do anel lactônico é confirmada pelo desaparecimento gradual da banda em 1760 cm⁻¹, acompanhado pelo aparecimento gradual das bandas em 3425 cm⁻¹ e 3200 cm⁻¹ quando a aflatoxina G₁ é tratada com morfolina à frio. O grupo éter vinílico nas aflatoxinas B₁, G₁ e M₁ apresenta bandas adicionais em 3100, 1067 e 772 cm⁻¹ (Mathew, 1970; Magoon et al., 1970).

Pelo espectro de ressonância nuclear magnética, foi

constatado a presença de um sistema di-hidrofurano na B₁ e G₁ e um grupo metoxi em todas as aflatoxinas, um grupo hidroxila na posição quatro nas M₁, M₂ e GM₁ e na posição dois nas B_{2a} e G_{2a} (Van Der Zijden et al., 1962; Hartley et al., 1963; Asao, 1965; Holzapfel, 1966 e Magoon, 1970).

As aflatoxinas são estáveis ao calor sendo decompostas à temperatura de cerca de 220°C (Van Der Zijden et al., 1962). São destruídas por agentes oxidantes fortes e, devido à presença do anel lactona, são susceptíveis à ação de base (Magoon et al., 1970).

São parcialmente decompostas com conseqüente diminuição da fluorescência e mudança no espectro de absorção ultravioleta quando em contato com solventes hidrofílicos (água, metanol, etanol, ácido acético), particularmente na presença de oxigênio e irradiação com luz ultravioleta (Van Der Zijden et al., 1962). Soluções clorofórmicas parecem ser estáveis (Magoon et al., 1970).

A irradiação da aflatoxina B₁ e G₁ com luz ultravioleta resulta em outras espécies fluorescentes (Andrellos et al., 1966). A fotoconversão ocorre mais rapidamente na superfície da sílica gel que em solução metanólica.

As aflatoxinas B₁ e G₁ reagem aditivamente com grupos hidroxila sob ação catalítica de ácidos fortes (Pohland, 1968). O tratamento destas toxinas com ácido acético glacial ou ácido fórmico na presença de cloreto de tionila, ácido trifluoroacético ou ácido cítrico formam os hemiacetais B_{2a} e G_{2a}, por hidratação (Magoon et al., 1970; Przybylski, 1975).

2.3 - Fungos Produtores de Aflatoxinas

Por algum tempo, julgou-se que o Aspergillus flavus fosse o único fungo que produzia a aflatoxina, mas, sabe-se atualmente que existem outras espécies de Aspergillus e mesmo outros gêneros produtores destas toxinas..

Os fungos Aspergillus parasiticus Speare (Codner et al., 1963; Hodges et al., 1964 e Davis e Diener, 1968), Aspergillus niger, Aspergillus ruber, Aspergillus wentii Wehmer (Schroeder e Verret, 1969; Kulik e Holaday, 1966), bem como o Penicillium puberulum Bainer (Hodges et al., 1964); Penicillium citrinum Thom., Penicillium frequentans (Kulik e Holaday, 1966), Aspergillus ostianus Wehmer (Scott et al., 1967; Schroeder e Kelton, 1975) são capazes de produzirem aflatoxinas. Contudo, os fungos que produzem as aflatoxinas em maior quantidade e que são mais comumente encontrados nos alimentos e rações animais são do grupo Aspergillus flavus-orysae, ou seja, o Aspergillus flavus e o Aspergillus parasiticus (Wilson et al., 1968; Magoon et al., 1970 e Bogoroditskaya, 1980).

O Aspergillus parasiticus produz os dois metabólitos mais tóxicos, aflatoxina B₁ e G₁, além dos outros metabólitos menos tóxicos B₂ e G₂ (Hesseltine et al., 1968), porém, nunca produz a aflatoxina G₁ na ausência de B₁ (Hesseltine et al., 1968) e as aflatoxinas B₂ e G₂ sem B₁ e G₁. O Aspergillus flavus, por outro lado, produz apenas aflatoxina B₁. Há linhagens de Aspergillus flavus que sintetizam certa quantidade de aflatoxina M₁ além da aflatoxina B₁ (Holzapfel et al., 1966).

Hesseltine et al. (1966 e 1968) depois de estudarem um grande número de linhagens produtoras do grupo Aspergillus prove

nientes de vários países sugeriram que a linhagem toxigênica do Aspergillus parasiticus predomina nos países tropicais. Krogh e Hald em 1969, confirmaram esta suposição quando detectaram aflatoxinas B₁ e G₁ em amendoim e produtos de amendoim, importados pela Dinamarca, do Brasil, Nigéria, Senegal, Kênia, Argentina, Uganda, Congo, Sudão, Gana e Indonésia.

2.4 - Fatores que Influenciam o Desenvolvimento de Fungos e a Produção de Aflatoxinas

O crescimento do Aspergillus flavus ou de outros fungos produtores de aflatoxinas pode ocorrer no campo, tanto durante o amadurecimento quanto na colheita, e na estocagem devido a inúmeros fatores intrínsecos (inerentes ao substrato) e extrínsecos (inerentes às condições que envolvem o substrato). Estes fatores são classificados em três categorias: fatores físicos, químicos e biológicos (Jarvis, 1971). Os mais importantes que levam à invasão de fungos aflatoxigênicos e produção de aflatoxinas são a temperatura, conteúdo de umidade, umidade relativa (UR), linhagem do microrganismo toxigênico e a ocorrência de competição entre os diferentes microrganismos.

Em termos de umidade, os fungos podem ser classificados em dois grupos: 1) aqueles que normalmente ocorrem no campo e 2) aqueles que predominam na estocagem. Os fungos do campo invadem produtos com umidade de 22-23% e UR de 90-100%. Os fungos de estocagem requerem teores mais baixos de umidade (abaixo de 15%) e UR de 70% a 90%. O Aspergillus flavus, apesar de ser classificado neste grupo, está na categoria "overlapping" sendo um fungo tanto do campo como da estocagem (Shank, 1981). É fungo

mesófilo e requer para o crescimento UR entre 80 e 90% (Galloway, 1935; Panassenko, 1944). A umidade relativa mínima para o crescimento e germinação dos seus esporos é de 80%, embora, o mínimo para a esporulação seja 85% (Panassenko, 1944).

Para a produção de aflatoxina, a umidade relativa mínima requerida é de 80%-85% e a umidade relativa ótima é de 95%-99% (Frank, 1974) que corresponde a um conteúdo de umidade de 18,0%-18,5% e 22,0% em sementes amiláceas, de 9,0%-10,0% e 15,0%-18,0% em sementes oleaginosas e de 18,0%-19,5% e 22,0%-23,0% em leguminosas, respectivamente (Aniskin, 1967; Christensen, 1978; dados da All Union Cereal Research Institute, citados por Gorelova e Lvova, 1980 a,b).

A produção de aflatoxinas tem sido relatada em arroz quando estocado com conteúdo de umidade de 24,0%-26,0% e em milho com 19,6%-20,0% ($a_w > 0,90$) (Calderwood e Schroeder, 1968; Van Warmelo *et al.*, 1968).

O amendoim ainda no solo, contém cerca de 25,0% de umidade e a menos que seja seco a uma umidade inferior a 9,0% ($a_w = 0,75$), ocorrerá crescimento de Aspergillus flavus imediatamente após a colheita. A secagem do amendoim por exposição ao sol está sujeita à chuva ou tempo úmido, acarretando um aumento do conteúdo de umidade do produto e favorecendo o desenvolvimento do fungo e a formação de aflatoxina (Austwick e Ayerst, 1963).

O conteúdo de umidade de grãos e sementes durante a estocagem pode ser heterogêneo por várias razões: 1) produto estocado com elevado conteúdo de umidade resultante da secagem ineficiente; 2) presença de umidade secundária devido à precipitação ou absorção dos vapores de água; 3) difusão do calor e de umidade em alguns grãos não completamente secos, causada por gran

dientes de temperatura; e 4) atividade vital dos microrganismos, aumentando a temperatura e o conteúdo de umidade em grãos e sementes não completamente secos. Um conteúdo baixo de umidade não assegura uma estocagem eficiente de produtos alimentícios pois diferentes espécies de fungos, tais como Aspergillus restrictus, Aspergillus ochraceus, Aspergillus glaucus e Aspergillus candidus, podem se desenvolver e no seu processo de crescimento, liberar considerável quantidade de umidade e calor conforme a equação da respiração aeróbia: $C_6H_{12}C_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O + 677,2kcal$. O Aspergillus glaucus, durante seu crescimento, pode aumentar a temperatura do grão de 35°C a 40°C, resultando em aumento do conteúdo de umidade do grão onde o fungo está crescendo e um aumento maior nos adjacentes. Este aumento da temperatura e do conteúdo de umidade, como resultado do autoaquecimento, provê condições para o desenvolvimento da espécie Aspergillus flavus e síntese da toxina (Christensen e Kaufmann, 1974; Shotwell et al., 1975 a,b; Christensen, 1978; Gorelova e Lvova, 1980 a,b). É por isto que a estocagem de sementes e grãos deve ser feita com conteúdo de umidade que elimine o processo microbiológico intensivo, ou seja, abaixo da umidade crítica. O conteúdo de umidade deve ser reduzido de 1-2% abaixo da crítica para estocagem prolongada (Christensen, 1978 e Gorelova e Lvova, 1980b).

A temperatura é menos restritiva que a umidade no que diz respeito ao crescimento fúngico e produção da toxina; a maioria dos organismos pode tolerar e produzir metabólitos em uma larga faixa de temperatura. O Aspergillus flavus é classificado como fungo mesófilo com uma temperatura mínima de 6-8°C e máxima de 44-46°C. Porém, estas faixas de temperatura são afetadas por outros fatores como umidade, concentração de oxigênio do

ar e disponibilidade de nutrientes. A temperatura ótima de crescimento varia com a linhagem, numa faixa de 20-30°C (Davis e Diener, 1967; Schroeder e Hein, 1967; Schindler et al., 1967; Frank, 1974).

Em relação à aflatoxina, Austwich e Ayerst (1963) observaram máxima produção à 24°C. A temperatura ótima e o tempo mínimo para a formação de aflatoxinas pelo Aspergillus flavus em amendoim, previamente esterilizado, foram 30°C até 5-7 dias, 25°C até 7-9 dias e 20°C até 11-13 dias (Davis e Diener, 1966).

Rabie e Smalley (1965), relataram a temperatura ótima de 24°C para a formação de aflatoxina B₁, com pequenas quantidades sendo produzidas à 18 e 30°C. Já para G₁ a temperatura ótima era de 30°C com quantidades menores sendo produzidas à 24°, 36° e 42°C. Diener e Davis (1966 b) encontraram resultados semelhantes. A quantidade relativa de aflatoxina B₁ e G₁ é também modificada pela temperatura. Sorenson et al. (1967), estudando a formação de aflatoxina B₁ e G₁ em arroz, encontraram quantidades iguais em temperaturas baixas (15°-18°C), mas cada aumento de temperatura resultava em um aumento maior de B₁ que de G₁. À 25°C a relação B₁/G₁ era 2:1 e à 28°C era 4:1. À temperaturas mais altas (32°C) pouca G₁ era formada (12:1; B₁/G₁). Resultados similares foram relatados por Schroeder e Hein (1967) em sementes de algodão, arroz e amendoim.

O crescimento dos fungos não depende somente das condições de umidade e temperatura, mas também de outras condições ambientais e de microclima que envolve o substrato (Christensen, 1957). Os ambientes contendo CO₂ ou outros gases como N₂ afetam enormemente o crescimento de fungos que são tipicamente aeróbios.

Landers et al. em 1967 investigaram a influência de CO_2 , O_2 e N_2 no crescimento, esporulação e formação de toxinas pelo Aspergillus flavus incubados durante duas semanas à 30°C e 99% UR. Nenhuma redução visível do crescimento e esporulação foi observada quando a concentração de CO_2 aumentava de 0,03% (ar) para 20%, embora, notassem uma redução de 75% na formação de aflatoxina. Em concentração mais alta, o crescimento do fungo, a esporulação e a produção de aflatoxina eram reduzidos a cada aumento de 20% de CO_2 . Com 100% de CO_2 não havia crescimento ou produção de toxinas. Shih e Marth (1973), também relacionaram a influência de misturas de CO_2 , O_2 e N_2 em culturas de Aspergillus flavus e A. parasiticus produtoras de aflatoxina e obtiveram resultados semelhantes.

Sanders et al. (1968) estudaram o efeito combinado de CO_2 , umidade relativa, temperatura para o crescimento e formação da toxina por Aspergillus flavus em amendoim. Houve inibição em atmosfera de 20% de CO_2 , 86% UR à 17°C . Já sob atmosfera de 40-60% de CO_2 , 86% UR e à 25°C ocorreu inibição do crescimento, síntese de toxina e produção de ácidos graxos.

Com estas observações, ambientes com atmosfera controlada tem sido usados durante o transporte e no armazenamento de produtos vegetais, para prevenir o crescimento de fungos e formação de toxina.

Alguns trabalhos demonstraram a inibição da síntese da toxina quando culturas de Aspergillus flavus e A. parasiticus eram incubadas na presença de luz. A produção de toxina foi substancialmente maior no escuro (Hanna e Campbell, 1968; Joffe e Lisker, 1969 e Bennett et al., 1971). Estudos de Waliking têm mostrado que a luz visível é mais efetiva que a radiação ultravioleta ou infravermelha.

lha e que a luz do sol é o melhor agente para a total destruição da aflatoxina (Waltking, 1971).

Danos mecânicos de grãos, sementes e plantas favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão e a penetração de fungos no interior altamente nutritivo destes substratos. Isso leva ao desenvolvimento rápido dos fungos e conseqüente acúmulo de suas toxinas. Os danos podem ocorrer no campo, antes e durante a colheita, transporte e estocagem e são causados por insetos, pela ação de ventos violentos, quebra durante a secagem e uso de mecanização durante a colheita, secagem e descascamento (Lillehoj et al., 1975 a,b; 1976 a; 1977; 1980; Gray, 1982).

Lillehoj et al. (1976a) encontraram maior teor de aflatoxinas no germe de milho danificado por insetos que se difundiam depois ao endosperma. Em amendoins, tanto a casca quanto a testae intactas servem como barreira à invasão de fungos (Ashworth et al., 1965; Schroeder e Ashworth, 1965).

As aflatoxinas já foram encontradas sob condições naturais em um grande número de alimentos vegetais in natura e processados, tais como sementes oleaginosas (amendoim, semente de algodão) e leguminosas (soja), cereais (milho, arroz, trigo, centeio, sorgo e aveia), nozes, algumas frutas bem como nos alimentos processados. Estes, são considerados bons substratos, favorecendo em maior ou menor grau o crescimento de fungos aflatoxigênicos (Walbeck, 1973; Gorelova e Lvova, 1980 a,b).

Inicialmente, observações indicavam que todas as variedades de amendoim eram igualmente susceptíveis à produção de aflatoxinas, porém, Rao e Tulpule (1967) testando 60 variedades provenientes de 15 países encontraram uma variedade (U.S. 26) que repetidamente não produzia a aflatoxina.

Existem algumas discordâncias quanto a susceptibilidade de certos produtos, como no caso da soja. Vários investigadores encontraram pouca contaminação por aflatoxina em soja que foi atribuída a uma pequena quantidade de zinco livre, limitando a síntese destas toxinas (Borker et al., 1966; Kraybill e Shimkin, 1964; Gupta e Venkitasubramanian, 1975; Gorelova e Lvova, 1980 a,b). Já Hesseltine et al. (1966) encontraram teores de 109 µg/g de aflatoxina total em soja, ou seja, 50%-90% da quantidade produzida em milho, trigo, arroz, amendoim e sorgo. Eldridge (1967), por sua vez, obteve 300-376 µg/g da toxina em soja, aproximadamente a mesma quantidade produzida em amendoim sob condições semelhantes (Diener e Davis, 1967 e 1968).

Numerosos substratos naturais tem sido usados para produzir aflatoxina em laboratório. Estes substratos são normalmente umedecidos, esterilizados, inoculados e incubados a 25°-30°C por 5-14 dias. Já foram produzidas aflatoxinas em alimentos tais como: ovos, leite, leite condensado, leite em pó, queijo, pão, castanha do pará, nozes, côco, pêsego, ameixa, pera, figo, sucos de maçã, laranja e tomate, pimenta vermelha, pãprica, batata doce, produtos de batata, bacon defumado, mandioca, trigo, arroz, ervilha seca, feijão, lentilha, óleo de amendoim crú, óleo de oliva crú (Sargeant et al., 1961 a,b; Wilson e Wilson, 1962; Hesseltine et al., 1966; Frank, 1966, 1968; Wildman et al., 1967; Schindler e Eisenberg, 1968; Ong, 1975; Gorelova e Lvova, 1980 a,b e d. Felizmente a toxina tem sido observada como contaminante natural de um número relativamente limitado de alimentos.

Substratos artificiais preparados a partir de substâncias nutritivas tais como carboidratos, aminoácidos (glicina, ácido glutâmico, alanina, ácido aspártico e glutamina)

(Davis et al., 1967), sais minerais, ácidos graxos e outras substâncias também tem sido estudados (Mateles e Ayde, 1965; Lee et al., 1966; Davis e Diener, 1968; Gupta et al., 1974; Frank, 1974; Marsh et al., 1975; Magoon et al., 1977; Gorelova e Lvova, 1980 a e b; Abdolahi e Buchanan, 1981; Lenovich, 1981).

Embora tenha sido demonstrado apenas em estudos in vitro (Frank, 1968, 1974; Davis e Diener, 1966; Joffe e Lisker, 1969), os fungos são sensíveis também a valores de pH do substrato, tendo velocidade máxima de produção de toxinas numa faixa de 5 a 7. Este limite depende da composição do meio, peculiaridades da linhagem e duração do cultivo. Buchanan e Ayres em 1975, determinaram que o pH abaixo de 6,0 favorecia a síntese de aflatoxina B enquanto pH acima de 6,0 beneficiava a síntese de aflatoxina G. O acúmulo de aflatoxina B era mais fortemente inibido pela acidez desfavorável do que o acúmulo de G. Observaram que o máximo de crescimento do fungo e produção de aflatoxinas ocorria quando o pH inicial era 5,0 e 6,0, respectivamente.

A presença de fungos produtores de aflatoxinas nas plantas durante o desenvolvimento dos frutos, na colheita e estocagem pode ser prevenida ou controlada pelo uso de fungicidas. O ácido propiônico, combinações de ácidos propiônico e acético e ácido propiônico e formaldeído mostraram ser efetivos para grãos com alto teor de umidade usados na alimentação animal (Christensen e Kaufmann, 1974; Vandergraft et al., 1975; Brekke e Stringfellow, 1978; Coker, Jones e Nagler, 1980a). Os fungicidas para serem usados na estocagem tem sérias limitações, tais como toxicidade para animais, excessivo custo, dificuldade de aplicação, efeitos indesejáveis na qualidade do grão e pouca toxidez para os fungos de estocagem. Frequentemente são efetivos em combi-

nação com conteúdo de umidade, temperatura, tempo e concentração.

O número e o tipo de linhagens produtoras de aflatoxinas que contaminam os alimentos são diversificados (Hesseltine et al., 1966, 1968; Taber e Schroeder, 1967; Nakamura e Yokoya, 1970), tendo linhagens tais como de Aspergillus flavus, que apresentam desde produção nula até formação elevada de toxina (Hesseltine, 1970). Já a quantidade e tipo de aflatoxinas variam com a linhagem (Schroeder, 1966; Nakamura e Yokoya, 1970), substrato (Schroeder, 1966; Diener e Davis, 1968), temperatura (Sanders et al., 1968; Schroeder e Hein, 1967), umidade (Sanders et al., 1968; Diener e Davis, 1967) e presença de microrganismos capazes de degradar a toxina (Schroeder e Ashworth, 1965).

A existência de amendoim atóxico apesar de estar altamente contaminado por fungos aflatoxigênicos, bem como a queda brusca da quantidade de aflatoxina após a produção máxima, fizeram com que pensassem na existência de microrganismos resistentes à toxina, possivelmente aptos a inibir a sua produção ou degradá-la. Os primeiros a estudar a desintoxicação biológica pelo Flavobacterium aurantiacum, dentre outros microrganismos foram Ciegler et al. em 1966. Encontraram que o Flavobacterium aurantiacum absorvia aflatoxinas completamente e não produzia nenhum outro produto tóxico. Muitos outros microrganismos foram estudados entre fungos, bactérias, leveduras e algas como Nocardia asteroides (Ciegler et al., 1966a; Arai et al., 1967), Dactylium dendroides NRRL 2575 (Detroy e Hesseltine, 1969) e Tetrahymena pyriformis (Teunison e Robertson, 1967; Robertson et al., 1970).

2.5 - Toxicidade

O grande número de dados experimentais sobre a ativi-

dade das aflatoxinas levam à conclusão que a maioria dos mamíferos, incluindo os primatas (Madhavan et al., 1965 b e c), aves (Siller e Osttler, 1961), algumas espécies de peixes (Wolf e Jackson, 1963; Ashley et al., 1964; Sinnuber et al., 1965 e 1970), microorganismos (Lillehoj e Ciegler, 1969; Ames et al., 1973) e algumas plantas superiores (Lilly, 1965; Ong, 1975) são sensíveis em menor ou maior grau aos efeitos tóxicos das aflatoxinas. Danos no fígado tem sido a patologia mais acentuada (Asplin e Carnaghan, 1961; Wannop, 1961) encontrada em várias espécies animais (Allcroft e Carnaghan, 1963b) tais como macaco rhesus (Madhavan et al., 1965 b e c; Salhab e Shieh, 1975), boi (Loosmore e Markson, 1961), porco (Loosmore e Harding, 1961), galinhas (Smith et al., 1970 e 1971; Asplin e Carnaghan, 1961; Gumbmann et al., 1970), faisões (Blount, 1961a), ratos (Barnnes e Buttler, 1964; Wogan et al., 1967 a e b), perús (Siller e Osttler, 1961; Stevens et al., 1960) e patos (considerados os mais susceptíveis) (Asplin e Carnaghan, 1961).

De um modo geral a sensibilidade às aflatoxinas varia muito com a espécie animal e dentro da mesma espécie varia com a dose administrada (Asao et al., 1963), sexo, tipo de aflatoxina (Carnaghan et al., 1963) e decresce com a idade (Allcroft e Carnaghan, 1965; Wogan, 1966 e 1967a). Doses letais para vários animais estão apresentadas na Tabela 1. Os machos jovens são particularmente susceptíveis, porém, as fêmeas grávidas tornam-se mais sensíveis e podem transferir a toxina ao feto (Allcroft e Carnaghan, 1963b; Wogan e Newberne, 1967; Buttler et al., 1969).

O camundongo e o carneiro são exemplos de espécies animais resistentes (Allcroft e Carnaghan, 1963b; Platonov, 1964). Frangos são relativamente resistentes quando comparados com ou-

tras aves (Asplin e Carnaghan, 1961). Pintos New Hampshire são altamente sensíveis à ação das aflatoxinas, todavia, os pintos White Leghorne e White Rock possuem resistência à toxina. Os pintos resultantes do cruzamento de New Hampshire e White Leghorn apresentam relativa resistência à ação da aflatoxina B₁, sugerindo que a susceptibilidade à toxina seja um fator geneticamente controlado (Gumbmann et al., 1970).

Tabela 1 - Dose Letal de Aflatoxina B₁ em Várias Espécies Animais

Animal	Sexo	Idade ou Peso	LD ₅₀ (mg/kg)	Via
Patos	M ^a	1 dia	0,4	O ^c
Coelho	M, F ^b	desmamado	ca. 0,5	Ip ^d
Cão	M, F	adulto	ca. 0,5	O
Truta	M, F	100g	ca. 0,5	O
Cobaia		adulto	ca. 1,0	Ip
Rato	M, F	1 dia	1,0	O
	M	21 dias	5,5	O
Hamster	M	30 dias	10,2	Ip
Camundongo	-	21 dias	63,0	O
Carneiro	-	adulto	ca. 500	

Wogan, 1966, 1968; Walbeck, 1973

^aMacho - ^bFêmea - ^cOral - ^dIntraperitoneal

A toxicidade das aflatoxinas decresce de B₁ para G₁, ou seja B₁ > G₁ > B₂ > G₂. A G₁ possui metade e B₂ um quarto da toxicidade de B₁ (Carnaghan et al., 1963; Hartley et al., 1963; Ong, 1975). A aflatoxina B₁ é a mais tóxica para mamíferos, aves e peixes e a M₁ possui toxicidade semelhante à B₁ para patos de um dia, provocando as mesmas lesões no fígado. Já a aflatoxina M₂

apresenta uma toxidez comparável à B₂ (Purchase, 1967, 1972). Dutton e Heathcote em 1968 e Lillehoj e Ciegler, 1969 estabeleceram que o efeito tóxico das aflatoxinas B_{2a} e G_{2a} é diferente e bem menor ou quase nulo em comparação com o das B₁, B₂, G₁ e G₂.

O efeito tóxico causado pelas aflatoxinas pode ser agudo, sub-agudo ou crônico (Pozdnjakov, 1980). O quadro clínico na aflatoxicose aguda é caracterizado por desenvolvimento da flacidez, diminuição do crescimento, desordem na atividade do trato gastrointestinal, e a morte vem com o aparecimento dos sintomas neurotóxicos como convulsão e paralisia. Podem também ocorrer hemorragias múltiplas. Na biópsia, o fígado apresenta-se com necrose periportal em patos; já em macaco rhesus a necrose abrange várias áreas, apresentando também metamorfose gordurosa celular, proliferação do epitélio do ducto biliar e severa hemorragia. Na toxidez sub-aguda ou crônica o fígado torna-se hiperplásico e extremamente cirrótico com fibrose progressiva e/ou tumor, tendo como característica microscópica a presença de células do parênquima aumentadas, envolvidas por densa massa de ductos biliares e fibras de sustentação (Allcroft e Carnaghan, 1963b; Carnaghan et al., 1963).

Algumas evidências de toxidez aguda no ser humano foram citadas na literatura. Buttler em 1974 citou um trabalho feito por Serck-Hansen, relatando a morte com dano no fígado de um garoto em Uganda que consumiu mandioca altamente contaminada por aflatoxina. Na Tailândia a Síndrome de Reye, descrita como encefalopatia e deposição gordurosa nas vísceras em crianças, tem sido relacionada à ingestão de aflatoxina. Esta mesma síndrome foi reproduzida experimentalmente em macacos rhesus alimentados com aflatoxinas (Bourgeois et al., 1971).

Mais que a toxidez aguda, a preocupação maior, especialmente no ser humano, é o efeito carcinogênico provocado pela ingestão de níveis mais baixos de aflatoxina.

Desde o primeiro trabalho de Lancaster et al. em 1961, relatando a formação de hepatomas em ratos alimentados com ração contaminada, numerosos trabalhos apareceram na literatura sobre o assunto (Le Breton et al., 1962; Salmon e Newberne, 1963; Barnes e Buttler, 1964 e Wogan e Newberne, 1967. Também foram relatados estudos em patos (Carnaghan, 1965), camundongos (Veselinovitch et al., 1972, citado no livro de Shank, 1981), trutas (Ashley et al., 1964; Wolf e Jackson, 1963 e Sinnhuber et al., 1965) e em macacos (Adamson et al., 1973 citado por Hayes, 1978; Golapan et al., 1972).

Evidentemente, experiências no ser humano não podem ser feitas e, portanto, as evidências neste caso aparecem em dados indiretos e através de estudos epidemiológicos.

Vários estudos relatam a incidência de câncer primário do fígado em localização geográfica específica como é o caso das populações indígenas da África, sul do deserto do Saara e sudoeste da Ásia (Bonne, 1935; Higginson e Oettlé, 1960; Higginson, 1963; Bhamarapavati e Virranuvatti, 1966; Alpert et al., 1971 e Krishnamachari et al., 1977). Peers et al., em 1973, 1976 e 1977, e Higginson em 1963 observaram na África que a incidência de hepatocarcinoma é mais elevada no sexo masculino. Na Ásia e África o aumento de câncer do fígado é proporcional ao aumento de fígados cirróticos que se transformam em tumores malignos.

A patogenicidade do câncer do fígado no homem é desconhecida, porém, há evidência circunstancial que pode representar um processo em dois estágios no qual o dano no fígado quando

criança, possivelmente por desnutrição, pode predispor o órgão ao estímulo carcinogênico mais tarde (Higginson, 1963).

A incidência de cirrose em crianças na Índia tem sido estudada desde 1887, porém, ainda não foi encontrado o agente etiológico. Amla et al. em 1970 estudaram o possível efeito das toxinas nesta doença em crianças e encontraram alguns componentes em comum na dieta, tais como o arroz parbolizado e o óleo de amendoim cru. Encontraram aflatoxinas em todas as amostras de óleo cru coletadas das casas dos pacientes cirróticos e também aflatoxina no leite materno e urina das crianças. A histologia do fígado mostrou severa necrose com grande variedade de células hepáticas agigantadas e citoplasma granuloso. Os autores consideraram prematuro concluir que a aflatoxina é o agente responsável pela cirrose em crianças, porém, há forte evidência que estas crianças foram expostas à aflatoxinas.

Devido à alta incidência de câncer primário de fígado já descrito por muitos cientistas na África, Peers e Linsell (1973 e 1977); Peers et al. (1976) estudaram a relação entre esta doença e a dieta consumida pela população da cidade de Murang'a e várias regiões do Kênia assim como Suazilândia. Encontraram uma relação consistente entre a incidência de câncer hepático e ingestão de aflatoxina, especificamente no sexo masculino, e que a incidência decrescia com a altitude. Alpert et al. em 1971 também estudaram a relação aflatoxina/hepatoma em Uganda e encontraram 29,6% dos alimentos analisados contendo teores detectáveis de aflatoxina. Bababunmi et al. em 1978 na Nigéria, relataram fatos semelhantes.

A frequência de contaminação pela toxina mostrou-se particularmente elevada nas províncias com alta incidência de

hepatoma ou onde os fatores culturais e econômicos favoreciam a ingestão de alimentos mofados.

Le Breton em 1962 citou a desnutrição como fator que propicia a ação das aflatoxinas, aumentando ou levando ao aparecimento dos efeitos tóxicos e carcinogênicos. Os efeitos das aflatoxinas, por exemplo, são acentuados quando administradas junto com dieta carente em proteínas (Madhavan, 1965 a, b, c e 1967; Higginson, 1963; Wogan, 1968).

As aflatoxinas provocam, além dos efeitos tóxicos citados anteriormente, desordem nas reações imunológicas do organismo dos animais levando ao enfraquecimento das defesas imunológicas, ficando estes sensíveis às infecções (Pier, 1970, 1972, 1973; Thaxton et al., 1971, 1974; Paul et al., 1977 e Shaternikov e Marokko, 1980).

A atividade teratogênica da aflatoxina parece ser altamente específica nas espécies animais. Ong (1975) sugeriu que os diversos caminhos metabólicos desta toxina nos diferentes organismos animais, contribuem para esta especificidade.

2.6 - A Pesquisa sobre Aflatoxinas no Brasil

Apesar da potencial gravidade do problema das aflatoxinas em nosso país, são poucos os trabalhos sobre o assunto e a maioria foram realizados no Estado de São Paulo.

Dos levantamentos dos teores de aflatoxinas em alimentos, encontramos o trabalho de Tango et al. (1965) que relataram altos teores (acima de 2000 ppb) em amostras de amendoim da safra "das águas" e da safra "da seca", 24,3% e 14,3%, respectiva

mente. Os autores observaram uma estreita relação entre a ocorrência da toxina e infestação por fungos com o índice de acidez do óleo das amostras.

No mesmo ano, a ocorrência de aflatoxinas em sementes, tortas e farelos de amendoim no Estado de São Paulo, foi estudada por Menezes et al., encontrando mais de 90% das tortas e farelos com teores elevados de aflatoxinas. Somente 3,2% dos farelos e 3,0% das tortas estavam em condições de serem utilizadas na alimentação animal. Já 24,3% das sementes estavam com níveis de até 100 ppb de aflatoxinas e 63,5% acima de 500 ppb. Nenhuma correlação entre os teores de umidade e nitrogênio total com os níveis de aflatoxinas foi observada.

Fonseca realizou uma série de estudos sobre a contaminação de farelos, sementes, tortas e farinhas de amendoim provenientes da indústria de óleo de várias regiões do Estado de São Paulo.

Em 1968, estudou a incidência de aflatoxinas em 264 amostras de tortas e farinhas de amendoim oriundas de 40 indústrias paulistas de extração de óleo nas regiões de Paulista Nova, noroeste, araraquarense e sorocabana. Verificou também a influência da safra, época da colheita da mesma safra, influência da região para formação de aflatoxinas B e G, bem como a correlação na produção dos dois grupos de metabólitos pelo Aspergillus flavus Link ex Fries. Concluiu que a incidência de aflatoxina era geral no Estado de São Paulo, pois todas as amostras estavam contaminadas atingindo níveis de até 20 ppm. Encontrou 89,78% das amostras com mais de 1,0 ppm de aflatoxina e as amostras da safra "das águas" apresentaram níveis mais altos. As amostras das regiões de Paulista Nova e araraquarense apresenta-

ram maior toxidez. Todas tinham aflatoxina B e apenas três com aflatoxina G. A região araraquerense destacou-se por apresentar elevado teor de aflatoxina G chegando a 10,0 ppm, levando o autor a supor a existência de uma linhagem diferente de A. flavus ou um teor mais elevado de zinco nos solos da região.

Vários trabalhos em farelo de amendoim das safras de 1966 e 1967 também foram realizados e relatados em 1973 e 1975 abrangendo as regiões noroeste, Paulista Nova, sorocabana e araraquarense no Estado de São Paulo (Fonseca, 1973a, b, c, 1975). Todas as amostras estavam tóxicas com teores entre 0,1 e 20 ppm de aflatoxina, sendo que os níveis mais elevados foram encontrados na safra "das águas". A região de Paulista Nova apresentou teores mais altos com uma média de 5,50 ppm na época das chuvas. Apenas 8,33%, 10,35%, 4,54% e 16,07% das amostras das regiões noroeste, Paulista Nova, sorocabana e araraquarense, respectivamente, estavam em condições de serem utilizadas na alimentação animal. Mais uma vez, a região araraquarense destacou-se pelo elevado teor de aflatoxina G, maior que B em 6 amostras.

Já em 1976, o mesmo autor publicou quatro estudos (Fonseca, 1976b, c, d, e) sobre a incidência de aflatoxinas em amendoim em casca, referente à safra "das águas" de 1967/68, desde a colheita à industrialização (sementes e farelos), em quatro regiões do Estado de São Paulo. A maioria das amostras continha aflatoxinas, representando 90,0%, 85,0%, 98,3% e 98,3% do total nas regiões de Monte Alto, Matão, Santa Adélia e Fernandópolis, respectivamente. Os teores atingiram em média, no amendoim cru, 2,84 ppm em Santa Adélia; 2,49 ppm em Monte Alto; 2,14 ppm em Fernandópolis e chegando a 0,42 ppm em Matão. O amendoim já era tóxico quando entregue pelo lavrador à fábrica e os níveis

de aflatoxina cresceram durante armazenamento e regrediram após extração do óleo.

No período compreendido entre 1969 e 1970, Pregnolato e Sabino determinaram os teores de aflatoxinas em 32 amostras alimentícias tais como, amendoim cru, paçoca, pé de moleque, amendoim torrado, amendoim salgado, amendoim japonês, farinha de mandioca, milho, trigo, soja, sorgo, algodão, nozes, castanha do pará e castanha de cajú. Destas, 20 amostras estavam contaminadas com aflatoxinas. Por outro lado, de 130 amostras de ração animal, 104 estavam contaminadas. Além dos produtos de amendoim, as amostras de farinha de mandioca apresentaram-se altamente contaminadas. Os autores, porém, não apresentaram os teores encontrados.

Em 30 amostras de pastas de amendoim, sendo 20 nacionais e 10 dos Estados Unidos, Fonseca e Del Nery em 1970 encontraram 90,0% contaminadas com aflatoxinas. As amostras negativas eram de procedência estrangeira. Das amostras positivas, 69,9% tinham mais de 50 ppb. Concluíram que somente três das amostras nacionais estavam em condições de serem consumidas, ainda assim com restrições.

Purchio (1970) analisou 20 amostras de farinha de trigo, detectando aflatoxina B₁ em duas amostras nas concentrações de 1,84 e 0,36 mg/100g. Não foi encontrada nenhuma correlação entre a presença de aflatoxina B₁ e a existência de Aspergillus sp. que foi classificado apenas em gênero. Devido à presença de manchas fluorescentes similares às da aflatoxina em quase todas as amostras, o autor sugeriu a purificação do extrato com éter etílico na própria camada cromatográfica como já foi recomendado por Nabney e Nesbitt (1965).

Sabino continuou o levantamento do teor de aflatoxina B_1 em vários alimentos e rações animais comercializadas entre 1971 e 1979 no Estado de São Paulo (Sabino, 1980). Foram detectados teores de ND (Não Detectado) a 7800 ppb de aflatoxina no período de 1971 a 1975. Das 300 amostras analisadas, 37% apresentaram teores acima do limite tolerado pela legislação brasileira (30 ppb) (Resolução 13/78). Já de 1976 a 1977, 1978 e 1979 de 161, 61 e 50 amostras, 13,6, 13,0 e 10,0% estavam contaminadas com teores acima de 30 ppb. Os alimentos analisados foram amendoim e derivados, farinha de soja, milho, trigo, aveia, mandioca, arroz, alimentos preparados e vários tipos de ração num total de 572 amostras.

Arckoll, em 1977 afirmou na 29.^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, que praticamente todos os produtos derivados de amendoim, além da ração animal à venda no Brasil, estavam contaminados com níveis inaceitáveis de aflatoxina mesmo quando os produtos eram selecionados para consumo humano.

Foram analisados no Programa Nacional de Monitoração e Controle das Micotoxinas em 1982, amostras de amendoim crú e milho seco, do período "das águas" e "da seca", todos provenientes de 25 cidades do Estado de São Paulo. Das 307 amostras de amendoim analisadas, provenientes da safra "das águas", 52,0% estavam contaminadas com aflatoxinas B_1 e/ou G_1 . Por outro lado, das 79 amostras de amendoim analisadas da safra "da seca", somente 20,6% apresentaram contaminação por aflatoxinas B_1 e/ou G_1 . Já das 86 amostras de milho seco da safra "das águas", 4,7% estavam positivas para aflatoxinas e das 111 amostras da safra "da seca", 10,5% estavam contaminadas.

Em 1982, Sabino et al. analisaram 50 amostras de pasta de amendoim e 106 amostras de paçoca (amendoim torrado, pila do com farinha, açúcar e água) comercializadas no Estado de São Paulo. Os teores detectados de aflatoxina B₁ foram de 10 a 278 ppb. Foram encontrados teores de ND (não detectado) a 278 ppb para pastas, 10 a 220 ppb para paçoca industrial e de ND (não detectado) a 260 ppb para paçoca caseira.

Poucos foram os trabalhos relatados sobre o efeito das condições de estocagem de alimentos na prevenção da proliferação dos fungos produtores e formação de aflatoxinas.

Yokoya et al. (1970) verificaram as condições de armazenamento seguro para as amêndoas em casca da castanha do pará. O produto poderia ser armazenado durante um período tão longo quanto 6 meses, a 26-28°C e 70% UR, porém deteriorava a 80% UR. A 97% UR ou mais, as castanhas exibiram crescimento microbiano na superfície dentro de duas semanas de armazenamento e desenvolveram aflatoxina após três meses.

O mesmo estudo foi realizado utilizando a castanha do pará integral. Os autores encontraram que na temperatura de 26°C a 28°C, as castanhas parcialmente desidratadas com umidade de 6,8% poderiam ser estocadas a 80% UR por 6 meses. Mas, com 70% UR, o produto podia ser armazenado até 8 meses sem deterioração. A estocagem em UR de 94% ou mais gerou deterioração do produto com desenvolvimento de microrganismos na superfície das castanhas após dois meses, porém, a aflatoxina não foi produzida. Os autores sugeriram que a castanha não era um bom substrato para a produção de aflatoxinas pelos fungos por falta de algum nutriente essencial (Yokoya et al., 1971).

Tango et al. em 1972, avaliaram a influência de UR ambiente du

rante o armazenamento do amendoim em grão. Foram utilizadas UR de 10% a 100%. Determinações periódicas de acidez total, teor de umidade, aflatoxinas, número de bactérias e fungos indicaram que na faixa de 50% a 70% UR, haviam condições para armazenamento durante 9 meses. Nas amostras estocadas de até 65% UR, não houve produção de aflatoxinas. Com a UR de 80% a 90%, as amostras apresentavam-se completamente envolvidas pelo crescimento de fungos após 8 meses. As toxinas foram detectadas somente em amostras altamente contaminadas por fungos. Foram encontrados teores em torno de 30 ppb de aflatoxina total no 9º mês à UR de 70%, no 6º mês à UR de 80% e no 2º mês à UR de 90%. À UR de 100% a aflatoxina já aparecia desde o primeiro mês de estocagem.

Costa et al. (1974) estudaram também a influência da UR de 10% a 90%, porém, em relação a flocos de soja, à temperatura de 27°C. À 86,5% UR e 90% UR, houve formação de altos teores de aflatoxina. Em ambientes com UR \leq 80%, não houve desenvolvimento de fungos produtores de toxinas. Nas condições empregadas, o conteúdo máximo de umidade "seguro" demonstrou ser 9,5% para flocos de soja em armazenamento.

Alguns estudos sobre a linhagem do gênero Aspergillus de fontes naturais do Estado de São Paulo foram realizados por Nakamura e Yokoya em 1968 e Fonseca et al. em 1974. O primeiro trabalho comparou 41 linhagens do fungo Aspergillus, com linhagens obtidas dos laboratórios dos Estados Unidos e Inglaterra, em relação à capacidade de produzir aflatoxinas. As linhagens isoladas em seu laboratório produziram quase que unicamente a aflatoxina B₁, enquanto que as linhagens estrangeiras produziram quantidades apreciáveis de aflatoxina B e G. A linhagem brasileira mais produtiva formou 2553 mg de aflatoxina por 50 mL do meio. Já Fonseca

et al., isolaram e estudaram a produção de aflatoxina por espécies do gênero Aspergillus, principalmente as linhagens de Aspergillus flavus provenientes de amendoim da safra "das águas" e "da seca" da região araraquarense. Foram obtidas 102 culturas de Aspergillus flavus, 4 culturas de Aspergillus oryzae var. effusus, 2 culturas de Aspergillus oryzae, 2 culturas de Aspergillus parasiticus e uma cultura do grupo Aspergillus ochraceus. De 107 culturas de Aspergillus estudadas, somente 33 produziram aflatoxinas.

Eiroa e Arkcoll (1978) estudaram farinhas de trigo, milho, mandioca e soja, coletadas em estabelecimentos comerciais, quanto à contaminação por bolores potencialmente produtores de aflatoxinas, patulina e esterigmatocistina. Foram isoladas, principalmente, espécies de Penicillium, Aspergillus, Mucor e Fusarium. Não foram evidenciados bolores potencialmente produtores de aflatoxinas e nenhuma das amostras apresentou contaminação por aflatoxina, patulina ou esterigmatocistina.

Pesquisas sobre controle do crescimento dos fungos produtores de aflatoxinas em alimentos no campo e durante a estocagem foram realizadas por Fonseca et al. (1976a) e Tango e Tela (1971/1972b). Fonseca et al. utilizaram fungicidas (Ferban, Thiran, Ortofenilfenato de sódio e Captafol) nas vagens de amendoim após serem arrancadas do solo, durante 4 anos em regiões de Caiabu, Campinas, Marília, Pirapozinho e Ribeirão Preto. Concluíram que, dentro das condições experimentais, os tratamentos antifúngicos foram ineficientes nos anos em que houve chuvas na colheita, enquanto que em anos secos as próprias condições do tempo se encarregaram de inibir o Aspergillus flavus. Tango e Tela aplicaram 9 fungicidas logo após o arrancamento das plantas. As amos-

tras foram analisadas após secagem (8 dias) e os níveis de aflatoxinas em quatro repetições apresentaram-se sempre baixos ou nulos, quando foram utilizados Óleo nº 3, Maneb, Enxôfre 1%, água de cal 1% e TMTD 70%.

2.7 - Desenvolvimento de Métodos Analíticos

Desde a descoberta das aflatoxinas, ficou evidente a necessidade de métodos sensíveis e reprodutíveis capazes de detectar e quantificar aflatoxinas em quantidades extremamente pequenas.

Sargeant et al. (1961 a), conseguiram separar e detectar as aflatoxinas utilizando cromatografia de papel. Este método foi substituído posteriormente pela cromatografia de camada delgada em alumina e sílica gel (Nesbitt et al., 1962; De Iong et al., 1962; Coomes et al., 1964, 1965). Outros adsorventes e vários sistemas de solventes também foram estudados, procurando uma melhor separação das aflatoxinas.

Procedimentos baseados em espectrofotometria ultravioleta foram desenvolvidos por Asao et al. (1963), Hartley et al. (1963), Adye e Mateles (1964) e por Nabney e Nesbitt (1965). Utilizando cromatografia preparativa em placas de sílica gel G, separaram a aflatoxina B₁ do amendoim contaminado e determinaram a concentração da solução metanólica da toxina por diferença das densidades óticas em 363 nm e 420 nm.

Como as aflatoxinas são intensamente fluorescentes quando expostas à luz ultravioleta de comprimento de onda longo (365 nm), esta propriedade forneceu a base para os métodos físico-químicos de detecção e quantificação. A fluorescência emiti-

da permite sua detecção em quantidade igual ou menor que 0,5 ng (Kravchenko, 1980b).

Muitos métodos de extração e purificação foram propostos para amendoim e outros produtos com objetivo de fornecer extratos contendo o máximo de aflatoxinas presentes na amostra e com o mínimo de substâncias interferentes. Os procedimentos de extração eram baseados na solubilidade das aflatoxinas em solventes orgânicos como clorofórmio, acetona, metanol, acetonitrila e benzeno e sua insolubilidade em solvente menos polares como dietil-éter e hexano que são usados para remover lipídios e pigmentos lipossolúveis que interferem na detecção Eppley (1968); Pons et al. (1968 e 1972); Romer (1975); Thomas et al., (1975); Davis e Diener (1980); Roberts et al. (1981); Howell e Taylor (1981). Colunas cromatográficas empacotadas com alumina, celulose ou sílica gel e precipitação com acetato de chumbo foram utilizados para a limpeza dos extratos (Nesbitt et al., 1962; Eppley, 1968; Thomas et al., 1975; Hunt et al., 1976).

Quanto à quantificação, embora outros métodos tenham sido estudados, a comparação da fluorescência da aflatoxina da amostra com padrões na camada delgada permanece como o método mais utilizado.

Devido à dificuldade em distinguir pequenas diferenças de fluorescência nas placas, assim como a subjetividade envolvida no método visual e outras inconveniências, houve uma procura por métodos mais precisos e sensíveis.

A fluorodensitometria para a quantificação das aflatoxinas separadas em placas de camada delgada foi estudada em 1966 por Ayres e Sinnhuber. A cromatografia em fase gasosa foi também usada por Suzuki et al. em 1974.

Para diminuir o tempo de análise e permitir a triagem de grande número de amostras, a cromatografia em minicoluna de sílica foi introduzida por Holaday em 1968, onde uma banda fluorescente sob iluminação ultravioleta evidencia a presença de aflatoxina. Com esse método foi possível descartar rapidamente amostras negativas.

Em 1972 Velasco introduziu o uso na minicoluna de florissil como adsorvente da aflatoxina de sementes de algodão, junto com outros adsorventes com diferentes atividades para reter as impurezas. Sugeriu também a limpeza prévia com cloreto férrico gel. Em 1973 o mesmo autor fez uma avaliação do tempo e sensibilidade do método, encontrando a níveis de 5 ppb, uma acuidade de 99% e acima de 10 ppb, uma acuidade de 100%. Pons et al. e Holaday e Barnes em 1973; Romer em 1975 e 1976 desenvolveram outros métodos envolvendo minicoluna para a detecção de aflatoxinas.

Um método rápido, específico para milho, introduzido e muito utilizado nos Estados Unidos, envolve a fluorescência emitida pelos próprios grãos iluminados diretamente por uma lâmpada ultravioleta de comprimento de onda longa. A fluorescência característica é associada com a presença de Aspergillus flavus ou parasiticus ou possivelmente a micotoxina. O teste na realidade indica o crescimento de fungos que pode ou não resultar na produção da aflatoxina. A fluorescência é chamada "BGYF" ou fluorescência amarela esverdeada brilhante e foi primeiramente observada em amostras de milho naturalmente contaminado, coletado em 1969 e 1970 no sul dos Estados Unidos (Shotwell et al., 1972). A "BGYF" é resultado da ação de peroxidases lábeis da planta viva (milho, fibras de algodão etc.) sobre o ácido kójico produzi

do por espécies de Aspergillus flavus (Marsh et al., 1969). É específico para milho "in natura" pois o processamento pode inativar a enzima e outros produtos agrícolas podem não ter o mesmo sistema enzimático. Fluorescências interferentes amarelo brilhantes provenientes da ponta da semente e da espiga do milho podem ocorrer, levando a resultados falsos (Tuite et al., 1978). Trata-se, portanto, de uma verificação indireta da presença de aflatoxina e conseqüentemente, com confiabilidade questionável. Apesar das suas limitações, o método foi usado em grande número de levantamentos nos Estados Unidos.

Velasco em 1975 adaptou um fluorímetro específico NEO TEC (desenhado especificamente para minicoluna) para determinação semiquantitativa das aflatoxinas totais.

Davis e Diener em 1980, estudaram um método rápido para amendoim, usando um fotofluorímetro comum que quantificava a fluorescência de aflatoxina em solução metanólica, comparando-a com um extrato de amendoim isento de toxina como branco.

Mais recentemente, a utilização da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) na quantificação de aflatoxina tem sido destacada. Utiliza coluna de fase normal ou reversa e detectores de fluorescência e/ou de absorção da luz ultravioleta. Apresenta vantagens de não exposição das aflatoxinas à degradação pelo ar e luz, reprodutibilidade, seletividade e elevada sensibilidade. O limite de detecção dos métodos modernos de HPLC para aflatoxina B₁ em amostras é de 0,75 ppb, já a quantidade mínima detectável para aflatoxina pura é 0,01 ng. Pode ser facilmente adaptada para outras micotoxinas e tem alto potencial de automatização (Garner, 1975; Pons, 1975; Takahashi, 1977; Stubblefield e Shotwell, 1977; Pons e Franz, 1977; Knutti et

al., 1979; Haghghi et al., 1981; Shepherd et al., 1982; Francis et al., 1982).

Atualmente a cromatografia de alto desempenho em camada delgada (HPTLC) está sendo desenvolvida e vários estudos tem sido publicados com excelentes resultados (Lee et al., 1980). A amostra é aplicada automaticamente em quantidades muito pequena (ng), em placas de sílica gel apropriadas para este método. A placa é desenvolvida em cuba para cromatografia de alto desempenho com volume de 3 mL de solvente. A quantificação é feita através do fluorodensitômetro e com auxílio de integrador (Coker, Jones e Nagler, 1983d).

Após o relato de Austwick e Ayerst em 1963, que apenas algumas sementes de amendoim infectadas por fungos produtores de aflatoxina poderiam levar à rejeição de lotes inteiros, tornou-se claro que a obtenção de amostras representativas para a determinação da aflatoxina poderia ser um problema. A infecção que aparecia nestas sementes não era uniforme e sim ao acaso. Não foi possível colocar o problema em termos quantitativos até Cucullu et al. em 1966 relatarem um estudo mostrando a grande variabilidade em grau de contaminação de sementes individuais de amendoim. Analisando sementes individualmente, valores de traços a 1.100 µg/g de aflatoxina foram encontrados com média de 122 µg/g. O valor médio do grupo de sementes mais contaminado foi 500 µg/g. Tomando-se estes resultados como base para explicar o problema de amostragem, uma semente contaminada em 10.000, poderia resultar em nível de aflatoxina de 50 µg/g.

Whitaker et al. afirmaram que a amostragem constitui a maior fonte de erro na determinação de aflatoxinas, sendo que a subamostragem (misturar a amostra e reduzi-la a amostra analí

tica) constitui apenas 20% do erro e a própria análise, 13% (Whitaker, Dickens e Monroe, 1974).

Os métodos imunológicos para a determinação de aflatoxinas começam a ser usados com ótimos resultados. São métodos químico-biológicos, muito sensíveis e podem ser específicos onde a limpeza não é importante. Podem ser usados como métodos de triagem para fluídos biológicos com soro sanguíneo, plasma e urina bem como para tecidos animais onde a toxina apresenta-se em quantidade muito baixa. Estes métodos prometem ser muito usados em futuro próximo (Kravchenko, 1980; Coker, Jones e Nagler, 1983d).

A detecção das aflatoxinas baseadas nas propriedades cromatográficas e fluorescentes é inespecífica porque muitas substâncias fluorescentes tem Rf e valores de tempo de retenção similares. Portanto, há necessidade de testes adicionais de confirmação para identificá-las. Estes testes podem ser químicos ou biológicos.

Os métodos mais acessíveis são aqueles que obtêm derivativos químicos da toxina com propriedades cromatográficas modificadas. O ácido trifluoroacético é empregado como catalisador na obtenção de derivativos aquosos de aflatoxina B₁, G₁ e M₁ (Przybylski, 1975).

O tratamento das placas cromatográficas com reagentes químicos que mudam a cor das manchas fluorescentes tem sido também largamente empregado (Schuller *et al.*, 1967). A confirmação baseada nas propriedades físicas ou seja características de migração por cromatografia em camada delgada em duas dimensões é realizada com diferentes sistemas de solventes. O método mais específico para confirmar a identidade das aflatoxinas é por espectrometria de massa.

Pons et al. (1978) relataram um método de confirmação para aflatoxina utilizando dois tipos de detecção, ou seja, a partir da detecção em cromatografia em camada delgada, a toxina seria confirmada em HPLC por detectores UV e de fluorescência.

Quanto aos testes biológicos, foram os primeiros a serem utilizados na confirmação da aflatoxina. Podem ser feitos em patos, embrião de frango, Artemia salina, Bacillus megaterium além de outras espécies de microrganismos, larvas, bem como culturas de tecidos e células. Tem sido encontrado 100% de correlação entre o método que utiliza embrião de frango e os métodos químicos de confirmação (Verret et al., 1964; Arai et al., 1967; Brown, 1968; Jayaraman et al., 1968; Harwig e Scott, 1971; Archer, 1974).

Em resumo, os principais estágios das análises físico-químicas atuais são: 1) coleta de amostra representativa para análise (amostragem); 2) preparação da amostra; 3) extração das aflatoxinas; 4) limpeza do extrato; 5) separação das aflatoxinas; 6) detecção e quantificação e 7) confirmação da identidade da toxina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Coleta e Preparo das Amostras

Um total de 241 amostras de amendoim crú (in natura), com e sem casca (pericarpo) e produtos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) tais como amendoim frito salgado com e sem pele (testae), amendoim japonês, ovinhos de amendoim, creme de amendoim, amendoim doce colorido, amendoim doce com chocolate, paçoca e pê de moleque, de diversas marcas, foram coletadas de julho de 1980 a julho de 1982 em diversos supermercados e postos comerciais localizados na região de Campinas no Estado de São Paulo. A descrição destes produtos está apresentada na Tabela 2. A amostragem foi feita ao acaso, sendo que o peso inicial foi de um mínimo de 5 kg para o amendoim crú e 1 kg para os produtos.

Cada amostra foi finamente moída em moinho Braun e liquidificador. Por quarteamento o tamanho da amostra foi reduzido até um peso de 250 g. Desta amostra final homogeneizada foram retiradas as amostras de 50 g em duplicata para a análise.

O milho verde (in natura) e os produtos de milho (*Zea mays* L.) como fubá, farinha de milho branca, farinha de milho amarela, flocos de milho pré-cozido, e sêmola de várias marcas perfazendo um total de 83 amostras, foram coletados durante o ano de 1982 da mesma maneira que os produtos de amendoim. A descrição dos produtos está apresentada na Tabela 3. A amostragem foi a mesma que a dos produtos acima, partindo de 10 espigas (aproximadamente 1 kg) para milho verde e de 1 a 2 kg para os produtos. O preparo das amostras de farinha, fubá e flocos de milho pré-cozidos para análise foi realizado apenas por homogeneização e redução

Tabela 2 - Descrição e Procedência das Amostras de Amendoim e seus Produtos

Produto	Descrição	Procedência ^a
Crú com casca	Semente integral <u>in natura</u> , com pericarpo	Campinas - SP. Campinas - SP.
Crú sem casca	Semente integral <u>in natura</u> , sem pericarpo	Campinas - SP. São Bernardo - SP.
Doce colorido	Semente integral, torrada, com cobertura de amido, açúcar e corante	Marília - SP. Campinas - SP. (2)
Doce com chocolate	Semente integral, torrada, com cobertura de amido, açúcar e chocolate	Campinas - SP. (3) São Paulo - SP.
Frito com pele	Semente integral, frita e salgada	São Paulo - SP. Santo Amaro - SP. Sorocaba - SP. Campinas - SP.
Frito sem pele	Semente sem testae, frita e salgada	Santo Amaro - SP. São Bernardo - SP. Sorocaba - SP.
Japonês	Semente integral, frita ou torrada, com cobertura de amido e sal	Campinas - SP. (4) Rio de Janeiro - RJ. São Paulo - SP. (2)
Ovinhos de amendoim	Semente integral, frita ou torrada, com cobertura de clara de ovo, amido e sal	São Bernardo - SP. Sorocaba - SP.
Paçoca	Semente torrada e moída com gordura, açúcar e sal na forma de tablete	Campinas - SP. (4) Rio de Janeiro - RJ.
Pasta de amendoim	Pasta de semente moída com gordura, mel e sal	São Paulo - SP. (2)
Pé de moleque	Semente integral, torrada com açúcar caramelizado.	Campinas - SP.

^a Os números entre parênteses indicam o número de marcas da mesma procedência

Tabela 3 - Descrição e Procedência das Amostras de Milho e seus produtos

Produto	Descrição ^a	Procedência ^b
Milho verde	Milho integral in natura no estágio leitoso ("milk dough")	Campinas - SP.
Farinha de milho amarela	Milho amarelo desprovido de pericarpo e embrião, moído e torrado	São Bernardo - SP. Sorocaba - SP. (2)
Farinha de milho branca	Milho branco desprovido de pericarpo e embrião, moído e torrado	Piracicaba - SP. São Bernardo - SP. Sorocaba - SP.
Flocos de milho	Milho desprovido de pericarpo e embrião (add. xarope de milho), cozido, moído e torrado	Porto Alegre - RS.
Fubá	Milho integral triturado	São Bernardo - SP. Sorocaba - SP.
Sêmola	Milho integral triturado com granulação maior que fubá	São Paulo - SP.

^aReferência: Lima, 1983

^bOs números entre parênteses indicam o número de marcas da mesma procedência

de tamanho por quarteamento. As amostras de milho verde foram moídas em liquidificador e homogeneizadas sem quarteamento. Amostras em duplicatas de 50 g foram utilizadas para a análise.

3.2 - Verificação dos Teores de Aflatoxinas durante Estocagem

A partir de um lote de amendoim isento de aflatoxinas foram preparados amendoim torrado, amendoim torrado salgado, amendoim frito, amendoim frito salgado, amendoim doce, amendoim doce com fermento e amendoim doce com chocolate.

Os produtos foram preparados da seguinte maneira:

Amendoim torrado. Três kg de amendoim descascado foram espalhados em forma de alumínio e torrados no forno numa temperatura de 160°C até que o produto foi considerado pronto (35 minutos de torragem). O amendoim torrado foi separado em duas porções de 1 kg e uma delas foi salgada.

Amendoim frito. Três kg de amendoim foram colocados em óleo de soja fervente por 15 minutos. A temperatura atingiu 170°C durante a fritura. Após o preparo, tomou-se cuidado de retirar do produto o máximo possível do óleo que restou da fritura. O produto foi dividido em duas porções e uma delas foi salgada.

Amendoim doce. À 1,5 kg de amendoim, foram adicionados 250 g de açúcar e 50 mL de água em uma panela de alumínio. A mistura foi levada a ferver, mexendo sempre, até adquirir uma textura crocante. A temperatura atingida durante o processo foi de 130°C.

Amendoim doce com chocolate. Este produto foi preparado de maneira semelhante ao amendoim doce, porém, foram adicionados 3 g de chocolate em pó. A temperatura atingida foi de 130°C.

Usando um outro lote de amendoim já contaminado com teores médios de 48 ppb de aflatoxina B₁ e 24 de G₁, foram preparados amendoim frito, amendoim frito salgado, amendoim doce e amendoim doce com chocolate da mesma maneira descrita acima.

Após o preparo dos produtos, porções de 50 g foram acondicionadas em sacos plásticos e estocadas à temperatura ambiente. As amostras de cada produto foram divididas para estocagem na presença de luz e no escuro.

Amendoim cru dos dois lotes foram embalados e estocados nas mesmas condições para servir como controle. Durante 270 dias de estocagem, em períodos de 45 dias, amostras em duplicata foram retiradas para a determinação dos teores de aflatoxinas.

3.3 - Verificação da Possível Contaminação do Milho no Campo

A possível contaminação de quatro cultivares de milho (Maya Normal, Pajimaca, Cubano, Opaco e Nutrimaiz), em três estádios de maturação, coletadas no campo experimental do Departamento de Genética e Evolução da Unicamp foi verificada.

Em relação ao Maya Normal, as outras três cultivares se diferenciam da seguinte maneira (Sgarbieri et al., 1977, 1982; Silva et al., 1978; Tosello, 1978):

Pajimaca Cubano - teores elevados de polissacarídeos solúveis em água e de lipídios totais, os quais são proporcionais ao maior porcentual de germe da cultivar.

Opaco - teores elevados de lisina e triptofano.

Nutrimaiz - teores elevados de lisina, triptofano, polissacarídeos solúveis em água, bem como de lipídios totais (proporcionais ao maior porcentual de germe da cultivar).

A primeira coleta foi feita quando o milho estava no estágio verde (leitoso) ou seja 25 dias após a polinização. O milho pastoso e o seco foram coletados após 40 e 70 dias da polinização, respectivamente. Em cada período, 200 espigas de cada cultivar foram colhidas em amostras estratificadas dos lotes isolados de modo a se obter amostras representativas do campo inteiro. Esta coleta foi feita em campos de cultivo medindo de 14 a 16 metros de largura por 60 metros de comprimento, com plantas a cada 30 cm, formando fileiras que distavam um metro uma das outras. De cada duas fileiras foi coletada, de maneira alternada, uma espiga em intervalos de 15 plantas, iniciando a partir da primeira e da 15.^a planta, na primeira e segunda fileira, respectivamente.

Estas amostras foram descascadas, debulhadas e moídas em liquidificador (milho verde) ou cutter (milho pastoso e seco). As amostras de milho pastoso e seco foram homogeneizadas e divididas sucessivamente por um divisor de amostras "Jones riffle sampler" (Stoloff et al., 1969) até uma amostra final de 1 kg que foi submetida ao quarteamento para obter a amostra final de 50 g. O milho verde, após moagem, foi homogeneizado manualmente

e amostras finais de 50 g, em duplicatas, foram retiradas para análise.

3.4 - Estudo "in vitro" da Susceptibilidade de Quatro Cultivares de Milho à Contaminação por Aflatoxinas

Os grãos (250 g) das cultivares Cubano, Maya Normal, Maya Opaco e Nutrimaiz coletados no campo experimental no estádio seco, foram debulhados, tomando-se o cuidado de mantê-los intactos, e inoculados com uma suspensão de esporos de Aspergillus parasiticus. O inóculo foi preparado a partir de cultura de Aspergillus parasiticus cultivado em Agar Sabouraud e incubado à 30°C até que houvesse abundante formação de esporos (7 dias). Estes esporos foram removidos através da adição de 5 mL de solução Tween 80 à 5% sob agitação em agitadores de tubos "Ciclo Mixer" por 1 minuto e contados em câmara de Newbauer. Foram feitas diluições desta suspensão em água estéril de tal forma que a amostra após a inoculação contivesse $\approx 10^5$ a 10^6 esporos/grama, ou seja, utilizando inóculo de 5%.

As amostras já inoculadas foram colocadas em dessecadores contendo solução saturada de sulfato de amônio para obter uma umidade relativa de 81% ou solução saturada de sulfato de zinco heptahidratado para atingir uma umidade relativa de 90%. Os grãos foram colocados nos dessecadores em pequenos recipientes perfurados de modo a não entrarem em contacto com as soluções de sulfato de amônio e sulfato de zinco. A incubação foi realizada em uma estufa com a temperatura mantida a 30°C até que o crescimento do fungo se tornasse visível (40 dias).

3.5 - Métodos Analíticos

3.5.1 - Métodos de triagem

a) Método de Romer para produtos em geral "Official First Action" (AOAC, 1980).

Este método, descrito em 1975 por Romer, oficializado pela "Association of Official Analytical Chemists", em 1980, utiliza uma minicoluna empacotada com sulfato de cálcio anidro (Drierite, 20-40 mesh, W.A. Hammond Drierite Co.), alumina-neutra (100-200 mesh), sílica gel, florisil (100-200 mesh) e novamente sulfato de cálcio anidro em camadas de 8 a 10, 8 a 10, 16 a 20, 8 a 10 e 8 a 10 mm de altura, respectivamente.

As aflatoxinas foram extraídas da amostra por acetona-água (85:15). A limpeza do extrato após filtração foi realizada através de reagentes precipitantes: cerca de 3 g de carbonato básico de cobre e 200 mL de cloreto férrico gel preparado a partir de 170 mL de hidróxido de sódio 0,2N e 30 mL de cloreto férrico gel (cloreto férrico anidro 20 g/300 mL H₂O).

Uma segunda filtração foi feita com auxílio de terra diatomácea. Os 150 mL do filtrado foram colocados em funil de separação com ácido sulfúrico 0,03% (150 mL) e as aflatoxinas extraídas com duas porções de 10 mL de clorofórmio. Os extratos, coletados separadamente, foram lavados com solução de hidróxido de potássio 0,02 N e recolhidos em bequeres.

Dois mL do primeiro extrato foram colocados no topo da minicoluna e eluídos com clorofórmio-acetona (9:1). A amostra positiva apresenta, na camada de florisil, uma banda fluorescente sob iluminação ultravioleta. O restante do primeiro e

o segundo extrato foram guardados para posterior quantificação, caso a triagem fosse positiva.

b) Método de Holaday-Velasco para milho "Official First Action" (AOAC, 1980).

A preparação da minicoluna utilizada neste método apresentou pequena diferença com relação à utilizada no método do item 3.5.1., quanto à espessura da camada que foram: de 5 a 7, 5 a 7, 20, 10 a 15 e 5 e 7 mm de sulfato de cálcio anidro, florisil, sílica gel, alumina e sulfato de cálcio anidro, respectivamente.

A extração difere bastante do outro método. As aflatoxinas da amostra de milho previamente moída foram extraídas por uma solução de metanol e água (8:2) em liquidificador à alta velocidade. Em seguida foram filtradas e uma alíquota de 15 mL foi transferida para um frasco com tampa contendo 15 mL de uma solução salina (cloreto de sódio 600 g, acetato de zinco 600 g e ácido acético 15 mL em 4 L H₂O). Após agitação por 10 minutos, uma segunda filtração foi feita e 15 mL foram transferidos para um outro frasco com 3 mL de benzeno, deixando-se separar as fases. Da fase benzênica foi pipetado 1 mL, que foi aplicado à coluna e eluído com clorofórmio-acetona (9:1). As amostras positivas apresentam uma banda fluorescente no topo da camada de florisil, quando do exame da coluna sob iluminação ultravioleta a 365 nm.

c) Método de triagem rápida para milho "Official First Action" (AOAC, 1980).

A extração foi feita com 250 mL de clorofórmio e 25 mL de água e adição de terra diatomácea para auxiliar a filtração. Foram coletados os dois primeiros 50 mL separadamente. O primei

ro extrato foi guardado para a quantificação. O segundo extrato foi evaporado em banho maria e o extrato oleoso obtido aplicado imediatamente em quantidades de 5, 10 e 10 μL em placa previamente aquecida. Solução padrão de aflatoxinas foi aplicada tanto separadamente quanto sobre uma das manchas de 10 μL do extrato da amostra. A placa foi desenvolvida com éter anidro e depois com clorofórmio-acetona (9:1) em tanque não saturado. As amostras positivas apresentam manchas fluorescentes com mesmo Rf do padrão sob iluminação ultravioleta.

3.5.2 - Métodos de Quantificação

As determinações das aflatoxinas foram feitas com todo o cuidado para evitar degradação pela ação da luz e do calor. Os padrões foram verificados com relação à sua concentração a cada três meses.

a) Método I (CB) para amendoim e produtos de amendoim "Official First Action" (AOAC, 1980).

As aflatoxinas foram extraídas da amostra (50 g) com clorofórmio (250 mL) e água (25 mL). Após filtração com terra diatomácea, uma alíquota de 50 mL foi retirada e aplicada à coluna de sílica gel. As impurezas foram eluídas com hexano (150 mL) e éter anidro (150 mL) e descartadas. As aflatoxinas foram eluídas com metanol-clorofórmio (3:97) e o eluato (150 mL) evaporado até securo em banho-maria à 40°C. Com ajuda de clorofórmio as toxinas foram transferidas para um frasco menor e levado à securo novamente, em banho-maria, sob corrente de nitrogênio.

O extrato final foi dissolvido com benzeno e acetonitrila (98:2) até um volume de 200 μL , aplicado em placa de sílica gel e comparado com quantidades conhecidas de padrões de a-

flatoxinas sob iluminação ultravioleta. O sistema de solventes usado foi clorofórmio-acetona (9:1).

O cálculo foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$\mu\text{g/kg} = \frac{S \cdot Y \cdot V}{X \cdot W}$$

S - μL de aflatoxina padrão B_1 igual ao desconhecido.

Y - concentração de aflatoxina padrão B_1 ($\mu\text{g/mL}$).

V - μL da diluição final do extrato da amostra.

X - μL do extrato de amostra aplicada com intensidade de fluorescência igual a S (padrão B_1).

W - gramas de amostra aplicada à coluna (9 ou 10 g se 45 ou 50 mL, respectivamente, de extrato clorofórmico foram utilizados).

b) Método II (BF) para amendoim e produtos de amendoim "Official First Action" (AOAC, 1980).

Para a extração, a amostra (100 g) foi misturada com 250 mL de metanol-água (55:45), 200 mL de hexano e cloreto de sódio (4 g) em liquidificador por 1 minuto em alta velocidade e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. Dos 25 mL da fase metanólica, foram extraídas as aflatoxinas com 25 mL de clorofórmio em funil de separação. O extrato (25 mL) foi evaporado à secura sob corrente de nitrogênio e transferido para um frasco menor e evaporado novamente.

O extrato resultante foi diluído em volume conhecido de benzeno-acetonitrila (98:2) e aplicado na placa. O solvente foi o mesmo usado para a cromatográfica no item 3.5.2.a. O cálculo foi feito a partir da fórmula descrita no item anterior po

rém W = 10, não sendo necessária correção para a gordura extraída junto com as aflatoxinas.

c) Método para aflatoxinas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1976).

Este método utilizado pelo Instituto Adolfo Lutz é seguido pela maioria dos laboratórios oficiais de controle de alimentos dos Estados brasileiros.

As aflatoxinas foram extraídas da amostra de amendoim desengordurado com clorofórmio (100 mL) e água (10 mL) sob agitação durante 60 minutos. O extrato foi filtrado, transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e concentrado em banho-maria sob corrente de N₂ e o resíduo foi redissolvido em 10 mL de clorofórmio e aplicado em placa de sílica gel desenvolvida primeiramente por clorofórmio-metanol (97:3) e posteriormente em éter etílico. Após a visualização das manchas sob iluminação ultravioleta, a fluorescência de menor intensidade encontrada foi usada para o cálculo semiquantitativo. A mancha que apresentava fluorescência mais forte foi retirada da placa eluída em metanol e quantificada por espectrofotometria em 363 e 420 nm.

As fórmulas para os cálculos foram:

a) Aflatoxina B₁ (semiquantitativo)

$$\frac{400 \times D}{P \times V} = \text{ppb (ou } \mu\text{g/kg de aflatoxina)}$$

b) Aflatoxina G₁ (semiquantitativo)

$$\frac{300 \times D}{P \times V} = \text{ppb (ou } \mu\text{g/kg de aflatoxina)}$$

D = volume total em mL necessário para diluir o extrato de maneira que as fluorescências sejam apenas observadas. No caso de serem as alíquotas provenientes do extrato direto, sem diluições, ou concentrações, o D é igual a 100.

P = peso, em g, da amostra original contida no extrato final.

V = volume, em μ L, da menor alíquota em que foi apenas observada fluorescência.

c) Aflatoxina B₁ e B₂ (quantitativo)

$$\frac{(A_{363} - A_{420}) \times 4 \times 312}{22.000} = X \text{ mg de aflatoxina em 4 mL de metanol}$$

X mg de aflatoxina $\times \frac{10}{V} = y$ mg de aflatoxina em 10 mL de clorofórmio, que corresponde a 25 g de amostra.

Y mg aflatoxina $\times 40 =$ mg por quilo da amostra

Peso molecular aflatoxina B₁ = 312

Coefficiente molar extinção de B₁ = 22.000

V = volume em mL usado na cromatografia

As amostras (25 g) com teor de gordura acima de 4% sofreram uma extração prévia da gordura em aparelho de Soxhlet com éter de petróleo durante 6 horas. O teor de gordura no amendoim é cerca de 46,0% e no milho de 4,2%.

d) Método para aflatoxinas do Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas (PMC-Mic, 1982).

As aflatoxinas foram extraídas de 10 g de amostra de-sengordurada e seca com 100 mL de clorofórmio e 10 mL de água. Após filtração o extrato foi aplicado na placa diretamente sem concentração, em quantidades de 5, 10, 15 e 20 μ L. Cinco μ L do padrão ou mistura de padrões foram aplicados na mesma placa. O sistema de solventes usado foi clorofórmio-metanol (97:3). Após visualização da fluorescência, a placa foi novamente desenvolvi-da, desta vez com éter etílico para retirar possíveis fluores-cências interferentes.

Como no caso do método do IAL, as amostras (25 g) com teor de gordura acima de 4% sofreram uma extração prévia da gor-dura em aparelho de Soxhlet com éter de petróleo durante 6 ho-ras.

A técnica de quantificação usada foi "diluição por ex-tinção" tomando-se para o cálculo a mancha de menor intensidade de fluorescência, de acordo com as fórmulas citadas no item 3.5.2.c (semiquantitativo).

e) Método de Romer (1975)

Foram retirados 4 mL de cada um dos extratos menciona-dos no item 3.5.1.a e neutralizados em funil de separação com solução de ácido sulfúrico 0,03%. Destes, 6 mL foram coletados em um frasco pequeno e levados à secura em banho-maria à temperatu-ra de 40°C sob corrente de nitrogênio.

O extrato foi diluído com benzeno e acetonitrila (98:2) até um volume de 250 μ L. Aliquotas de 3,5; 5,0 e 6,5 μ L foram

aplicadas em placa de sílica gel juntamente com padrões também em quantidades de 3,5; 5,0 e 6,5 μ L. O sistema de solvente usado foi clorofórmio-acetona (9:1). A intensidade das manchas fluorescentes da amostra foi comparada com a dos padrões sob iluminação ultravioleta a 365 nm.

Os cálculos foram feitos a partir da fórmula do item 3.5.2.a, sendo que o W = 3,9 g.

f) Método para Milho "Official First Action" (AOAC, 1980).

Os 50 mL do primeiro extrato, mencionados no item 3.5.1c, foram aplicados à coluna de sílica gel seguindo todo o procedimento do método I (CB) item 3.5.2.a.

A fórmula utilizada para o cálculo foi a mesma do item 3.5.2a.

3.5.3 - Métodos de Confirmação

a) Método de Przybylski (1975)

O extrato da amostra contendo aflatoxinas B_1 e G_1 foi aplicado em placa em quantidade que contivesse cerca de 0,2 a 2,0 ng das toxinas. Quantidades semelhantes dos padrões B_1 e G_1 também foram aplicadas separadamente. Logo após, foram superpostos 2 mL de solução de ácido trifluoroacético e clorofórmio (1:1) nas manchas de extrato, extrato + padrão e padrão deixando-os reagir por 5 minutos. O cromatograma foi desenvolvido com clorofórmio-acetona (9:1) e água colocada separadamente em um pequeno recipiente dentro do tanque. Sob iluminação UV os derivados B_{2a} e G_{2a} apresentaram fluorescências azul e verde, respectiva-

mente, e valores de Rf mais baixos que os compostos originais.

b) Método de confirmação de aflatoxinas pelo uso de soluções aquosas à 25% de ácidos inorgânicos (Schuller et al., 1967).

Depois do cromatograma desenvolvido, a placa foi pulverizada com solução de ácido sulfúrico à 25% (ácido nítrico também pode ser usado). As manchas fluorescentes azul e verde das aflatoxinas mudaram para fluorescência amarela.

c) Éter etílico (Nabney e Nesbitt, 1965).

O cromatograma desenvolvido, após secagem, foi novamente desenvolvido com éter etílico. Sob iluminação UV, as substâncias interferentes mudaram de posição ou seguiam com a frente do solvente.

3.6 - Comparação de Métodos Analíticos

Com a finalidade de encontrar um método rápido, confiável e de baixo custo para as condições laboratoriais brasileiras e que pudesse ser utilizado como método de rotina, foram comparados métodos de triagem e quantificação para amendoim, milho e produtos derivados.

Os métodos de triagem para amendoim e produtos derivados estudados foram: 1) Método de Romer para produtos em geral "Official First Action" (AOAC, 1980) e 2) Método de Holaday-Velasco para milho "Official First Action" (AOAC, 1980). Já os métodos comparados para milho e produtos derivados foram: 1) Método de triagem rápida para milho "Official First Action" (AOAC,

1980); 2) Método de Romer para produtos em geral "Official First Action" (AOAC, 1980) e 3) Método de Holaday-Velasco para milho "Official First Action" (AOAC, 1980).

Para a quantificação das aflatoxinas em amendoim e produtos derivados os métodos comparados foram: 1) Método I (CB) "Official First Action" (AOAC, 1980); 2) Método II (BF) "Official First Action" (AOAC, 1980); 3) Método do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1976); 4) Método de Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas (PMC-Mic, 1980) e 5) Método de Romer (1975). Para milho os métodos comparados foram os mesmos mencionados acima com exceção do Método II (BF Method) "OFA" (AOAC, 1980).

Todos os métodos foram comparados com 10 repetições pelo mesmo analista, usando a mesma amostra de amendoim naturalmente contaminado e a mesma amostra de milho contaminado artificialmente com 20 ppb de aflatoxina B₁. Além disso, os métodos de triagem, bem como os métodos de quantificação I (CB) e II (BF) da AOAC foram avaliados por 10 analistas, perfazendo 10 determinações da mesma amostra contaminada artificialmente com 20 ppb de aflatoxina B₁.

Foram observadas a duração e eficiência das etapas de extração, limpeza, detecção e quantificação, aparência do extrato final, comportamento cromatográfico (formato de mancha, cauda e substâncias interferentes fluorescentes), além do custo do material e reagentes utilizados. Foram calculados também os coeficientes de variação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Comparação dos Métodos Analíticos

Nos estudos sobre aflatoxinas, uma preocupação fundamental é a confiabilidade dos resultados. Esta preocupação predominou no presente trabalho. Portanto, além de seguir estritamente as recomendações da AOAC e do Tropical Development and Research Institute, sobre amostragem, vários métodos analíticos foram utilizados e comparados a fim de escolher métodos confiáveis, mas apropriados às condições existentes nos laboratórios brasileiros. Cinco aspectos foram considerados de maior importância: sensibilidade, exatidão, precisão, economia e rapidez.

4.1.1 - Métodos de triagem

Uma vez que a presença de aflatoxinas na minicoluna é verificada simplesmente por uma banda fluorescente numa determinada região da coluna, qualquer outro composto fluorescente com polaridade semelhante pode ser confundido com as toxinas. Isso leva a um resultado chamado "positivo falso".

Dos dois métodos de triagem utilizados para amendoim e seus produtos, o método Holaday-Velasco (AOAC, 1980) demonstrou tendência a dar resultados positivos falsos (Tabela 4). Os demais requisitos de tempo, custo, equipamentos simples, segurança dos solventes e uso de operadores não treinados foram preenchidos por ambos os métodos.

A etapa de limpeza existente no método de Romer (AOAC, 1980) que impediu a presença de resultados positivos falsos foi pouco eficiente no método de Holaday-Velasco. Esta limpeza retirou interferências, produzindo um extrato límpido que ao ser e-

Tabela 4 - Comparação dos Métodos de Triagem para Aflatoxinas

Amostra	Método	Extração	Limpeza	Deteção	Falso Positivo (%)	Tempo (min)	Custo Relativo
<u>Amendoim e</u> <u>Produtos</u> <u>Derivados</u>	Romer-AOAC (minicoluna)	Acetona - H ₂ O (85:15) 250 mL	CuCO ₃ FeCl ₃ gel	Fluorescência na camada de Florisil	0	45	baixo
	Holaday-Velasco AOAC (minicoluna)	Metanol - H ₂ O (80:20)	NaCl Zn(OAc) ₂	Fluorescência na camada de Florisil	10	30	baixo
<u>Milho e</u> <u>Produtos</u> <u>Derivados</u>	Triagem rápida AOAC (camada delgada)	CHCl ₃ - H ₂ O (250:25)		Fluorescência da mancha correspondente ao padrão	30	60	baixo
	Romer-AOAC (minicoluna)	Acetona - H ₂ O (85:15) 250 mL	CuCO ₃ FeCl ₃ gel	Fluorescência na camada de Florisil	0	45	baixo
	Holaday-Velasco AOAC (minicoluna)	Metanol - H ₂ O (80:20)	NaCl Zn(OAc) ₂	Fluorescência na camada de Florisil	10	30	baixo

luído na minicoluna deixa as aflatoxinas totais absorvidas no topo da camada de florisil em uma banda de fluorescência azul nítida.

Como os próprios autores afirmaram, o limite de detecção para aflatoxinas totais destes dois métodos é 10 ppb para os produtos testados (amendoim, pasta de amendoim, milho amarelo e branco), valor este, que foi confirmado em nosso laboratório para amendoim e milho.

Para milho foram comparados três métodos de triagem (Tabela 4). No método por camada delgada (AOAC, 1980), o tempo de análise foi mais longo devido ao: 1) maior tempo requerido na aplicação da amostra e desenvolvimento da cromatograma e 2) etapa de concentração, inexistente nos dois outros métodos. Isto, sem considerar ainda o tempo gasto no preparo da camada, que certamente é mais longo que o preparo da coluna. O extrato, aplicado diretamente na placa sem sofrer limpeza continha muito óleo, pigmentos e outras impurezas fluorescentes, dificultando o desempenho do cromatograma e a visualização da fluorescência levando a resultados falsos. Resultados "positivo falso" também ocorreram no método por minicoluna de Holaday-Velasco devido à ineficiência da limpeza (AOAC, 1980). Já o método de Romer (AOAC, 1980) apresentou melhores resultados também para o milho devido à eficiente etapa de limpeza. Os outros requisitos para um bom método de triagem foram preenchidos pelos três métodos comparados.

4.1.2 - Métodos de Quantificação

Dos métodos de quantificação comparados neste trabalho, o que preencheu maior número de requisitos para ser consi-

derado um bom método foi o método de Romer (Tabelas 5, 6 e 7). É barato e rápido, principalmente quando usado em rotina com um número elevado de amostras, pois utiliza pequenas quantidades de solventes e reagentes e o volume de extrato a ser concentrado é menor (8 mL). A limpeza eficiente resulta em um extrato final claro e límpido, levando a um cromatograma com manchas simétricas, sem interferências fluorescentes. Outra vantagem deste método é que a quantificação por cromatografia em camada delgada pode ser feita com o mesmo extrato clorofórmico usado para a triagem, sem necessidade de uma outra extração e limpeza. O coeficiente de variação foi o mais baixo que indica uma ótima repetibilidade do método (Tabela 7). O valor médio obtido para amendoim e milho e a porcentagem de recuperação no caso do milho foram maiores do que as obtidas pelo método CB, indicando que não estavam havendo perdas significativas de aflatoxinas durante a limpeza.

O tempo de análise do método de quantificação I (CB), (AOAC, 1980), foi o segundo mais longo devido ao uso da coluna cromatográfica a qual requer um tempo prolongado para sua preparação e para as várias eluições feitas por solventes diferentes.

Além disso, o volume de 150 mL de extrato obtido para ser concentrado em banho-maria é muito grande, prolongando o tempo da análise e expondo o analista a seus vapores tóxicos, ainda que faça o uso de uma capela. O grande volume de éter etílico usado durante a cromatografia libera vapores que são nocivos quando inalados. O extrato concentrado obtido apresentou-se oleoso pela limpeza deficiente, dificultando o desempenho do cromatograma pela formação de cauda e manchas assimétricas e tornando difícil a sua comparação com padrões pela intensidade de fluores-

Tabela 5 - Comparação dos Métodos de Quantificação para Aflatoxinas

Amostra	Método	Extração	Limpeza	Quantificação	Tempo (hs)	Custo Relativo
<u>Amendoim e Derivados</u>	I (CB) AOAC	CHCl ₃ - H ₂ O (250:25)	Coluna de sílica gel	Visual-comparação com padrão	5,0	alto
	II (BF) AOAC	MeOH - H ₂ O (55:45) 250 mL	Extração com hexano	Idem	3,0	alto
	IAL semiquant. espectrof.	CHCl ₃ - H ₂ O (100:10)	Extração da gordura. Separação de interferentes na placa de sílica gel por éter etílico	Visual-diluição ao ponto de extinção Espectrofotometria em (363 e 420 nm)	9,0 9,5	baixo alto
<u>Milho e Derivados</u>	PMC-Mic.	CHCl ₃ - H ₂ O (100:10)	Idem	Visual-diluição ao ponto de extinção	8,0	baixo
	Romer	Acetona-água (85:15) 250mL	CuCO ₃ Cu(OH) ₂ FeCl ₃ gel	Visual-comparação com padrão	3,5	médio/baixo
	I (CB) AOAC IAL semiquant. espectrof.	CHCl ₃ - H ₂ O (250:25) CHCl ₃ - H ₂ O (100:10)	Coluna de sílica gel Extração da gordura. Separação de interferentes na placa de sílica gel por éter etílico	Visual-comparação com padrão Visual-diluição ao ponto de extinção Espectrofotometria em 365 nm	5,0 9,0 9,5	alto baixo alto
<u>PMC-Mic.</u> Romer	CHCl ₃ - H ₂ O (100:10)	Idem	Visual-diluição ao ponto de extinção	8,0	baixo	
	Acetona-água (85:15) 250 mL	CuCO ₃ Cu(OH) ₂ FeCl ₃ gel	Visual-comparação com padrão	3,5	médio/baixo	

Tabela 6 - Características dos Extratos Obtidos de Vários Métodos

Método	Volume do Extrato Antes da Conc. (mL)	Aparência do Extrato Final	Comportamento Cromatográfico		
			Formato da Mancha	Cauda	Fluorescência Interferente
<u>Amendoim e Produtos Derivados</u>					
I (CB) AOAC	150	oleoso/claro	assim./sim.	com/sem	pres./ausen.
II (BF) AOAC	25	oleoso/claro	assim./sim.	com/sem	pres./ausen.
IAL	100	sujo/claro	assim./sim.	com/sem	pres./ausen.
PMC-Mic.	100	claro	simétrico	com/sem	pres./ausen.
Romer	8	claro	simétrico	sem	ausente
<u>Milho e Produtos Derivados</u>					
I (CB) AOAC	150	oleoso	assimétrico	com	presente
IAL	100	sujo	assimétrico	com	presente
PMC-Mic.	100	claro	assim./sim.	com	presente
Romer	8	claro	simétrico	sem	ausente

Tabela 7 - Avaliação da Repetibilidade dos Métodos Quantitativos
(Mesmo Analista - 10 Repetições da Mesma Amostra Homogênea)

Método	Média (ppb)	CV (%)
<u>Amendoim^a</u>		
Método I (CB) AOAC	32	14
Método II (BF) AOAC	30	16
Método IAL		
Semiquantitativo	28	19
Espectrofotométrico	37	16
Método PMC-Micotoxinas	28	20
Método Romer	35	8
<u>Milho^b</u>		
Método I (CB) AOAC	17 (85) ^c	17
Método IAL		
Semiquantitativo	15 (75)	23
Espectrofotométrico	21 (105)	18
Método PMC-Micotoxinas	15 (75)	20
Método Romer	18 (90)	10

^a Mesma amostra de amendoim naturalmente contaminada e devidamente homogeneizada.

^b Amostra de milho artificialmente contaminada com 20 ppb de aflatoxina B₁ e devidamente homogeneizada.

^c Os números entre parênteses indicam porcentagem de recuperação.

cência mesmo assim foi obtido um coeficiente de variação de 14%, indicando um método de boa reprodutibilidade.

Já o método II(BF), (AOAC, 1980) foi o mais rápido, levando 3 horas para a conclusão da análise. Porém, o uso de centrífuga de grande porte devido ao volume a ser centrifugado (700 a 800 mL) o torna um método caro e nem todos os laboratórios possuem ou tem condições para adquiri-la. O ponto crucial deste método é a formação de emulsão, quando o produto tem alto teor de óleo. Mesmo centrifugando, muitas vezes a emulsão não é quebrada levando a erros no resultado final. O CV obtido foi razoável (16%).

O método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1976) que é seguido pela maioria dos laboratórios de fiscalização de alimentos no Brasil, é um método considerado caro pela necessidade de espectrofotometro com faixa ultravioleta. A necessidade de extrair a gordura previamente durante 6 horas torna o método moroso, apesar da possibilidade de extração simultânea de várias amostras. Além disso, o volume (100 mL) do extrato a ser concentrado em banho-maria também é grande. A obtenção de bons resultados depende do desenvolvimento de um cromatograma com boa resolução, pois se alguma outra substância com absorção no mesmo comprimento de onda estiver nas proximidades da aflatoxina e for também retirada da sílica junto com a toxina, o espectrofotometro a registrará. Isso foi indicado pelo maior valor médio obtido para a amostra de amendoim e confirmado pela recuperação de 105% no caso de milho artificialmente contaminado com 20 ppb de aflatoxina B₁. Já o método semiquantitativo é mais barato.

O método idealizado pelo Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas (1980) que tem sido utiliza-

do em levantamentos dos teores de aflatoxinas em amendoim crú e milho seco no Estado de São Paulo e em alguns outros Estados, é o método mais barato, razoavelmente rápido dependendo da concentração da aflatoxina na amostra, já que, o volume de 100 mL de extrato é utilizado sem concentração prévia. A ausência de limpeza, porém, deixa impurezas junto com as aflatoxinas. O CV foi o mais alto em amendoim e o segundo mais alto em milho, tendo 20% em ambos os casos, estando no limite de CV considerado aceitável para aflatoxina (Horwitz e Albert, 1982).

Em outra comparação (Tabela 8), realizada por 10 técnicos de vários países no "Tropical Development and Research Institute" (TDRI, antigo TPI), no qual a autora participou, a superioridade do método de Romer em relação aos métodos CB e BF foi mais uma vez demonstrada em termos de CV e recuperação. A reprodutibilidade deste método foi bem melhor em milho em comparação com o método CB, embora a recuperação pareça ser levemente menor.

As várias considerações acima indicam, portanto, o método de Romer como o mais apropriado tanto para triagem como para quantificação. Para um levantamento econômico e eficiente dos níveis de aflatoxinas em alimentos é recomendável efetuar primeiramente uma triagem em minicoluna, permitindo a avaliação de um grande número de amostras. Descartando amostras negativas, a posterior quantificação e confirmação das aflatoxinas em amostras positivas são realizadas em camadas delgadas.

4.2 - Teores de Aflatoxinas em Amendoim e Seus Produtos Comercializados em Campinas de 1980 a 1982.

Com intuito de se obter resultados bem representativos do que ocorre num centro urbano da região Sul, limitou-se a amostragem à cidade de Campinas.

Tabela 8 - Avaliação da Reprodutibilidade dos Métodos Quantitativos
(10 Analistas - 10 Determinações da Mesma Amostra Homogênea)

Método	Média (ppb)	CV (%)
<u>Amendoim^a</u>		
Método I (CB) AOAC	15 (75) ^c	26
Método II (BF) AOAC	15 (75)	28
Método Romer	18 (90)	24
<u>Milho^b</u>		
Método I (CB) AOAC	18 (90)	33
Método Romer	17 (85)	24

^a Mesma amostra de amendoim artificialmente contaminada com 20 ppb de aflatoxina B₁ e devidamente homogeneizada.

^b Mesma amostra de milho artificialmente contaminada com 20 ppb de aflatoxina B₁ e devidamente homogeneizada.

^c Os números entre parênteses indicam a porcentagem de recuperação.

tudo, os resultados podem refletir a situação em outras cidades do Estado de São Paulo.

Do total de 241 amostras analisadas durante dois anos, do segundo semestre de 1980 ao primeiro semestre de 1982, 53,1% estavam contaminadas com aflatoxinas, sendo que 38,2% apresentaram teores acima do limite de tolerância de 30 ppb estipulado pela legislação brasileira (Tabela 9).

Os produtos que apresentaram as mais altas incidências de contaminação foram paçoca, amendoim cru sem casca, amendoim japonês e amendoim frito salgado com pele (testae), com 61,5%, 55,0%, 50,0% e 42,5%, respectivamente, de amostras tendo teores de aflatoxinas acima de 30 ppb.

Comparando amendoim cru com e sem casca, verificou-se que a incidência foi maior no último. Uma explicação para isto foi fornecida pelos próprios agricultores e comerciantes, os quais descascam aqueles que não terão aceitação no mercado como amendoim em vagem, por serem imaturos ou por apresentarem cascas danificadas (quebradas mecanicamente na colheita, mofadas e/ou de coloração alterada). Outra possível explicação é o descasque mecânico, que alguns comerciantes utilizam, causando danos nas sementes e favorecendo a recontaminação na estocagem e mesmo durante a comercialização.

As amostras de amendoim com cobertura doce colorido e com chocolate tiveram pouca contaminação por aflatoxinas, podendo ser explicada pela menor quantidade de amendoim no seu peso total.

A situação torna-se mais alarmante quando consideramos os teores (Tabela 10). A paçoca por exemplo, alcançou níveis de

Tabela 9 - Incidência de Aflatoxinas em Amendoim e seus Produtos Comercializados em Campinas (1980/1982)

Produto	Marca	Número de Amostras Analisadas	Número de Amostras Positivas	Número de Amostras Acima de 30 ppb
<u>Crú com casca</u>	A	10	05	02
	B	10	03	02
Total		20	08	04
<u>Crú sem casca</u>	A	10	07	06
	B	10	06	05
Total		20	13	11
<u>Doce colorido</u>	A	05	01	00
	B	05	01	01
	C	05	00	00
Total		15	02	01
<u>Doce com chocolate</u>	A	05	02	00
	B	05	01	01
	C	05	00	00
	D	05	02	02
Total		20	05	03
<u>Frito salgado com pele</u>	A	05	01	01
	B	10	06	04
	C	05	04	02
	D	05	02	01
	E	05	05	05
	F	10	06	04
Total		40	24	17
<u>Frito salgado sem pele</u>	A	05	02	01
	B	05	01	00
	C	05	02	01
Total		15	05	02
<u>Japonês</u>	A	05	01	01
	B	05	04	03
	C	04	02	02
	D	05	03	02
	E	05	05	04
	F	05	03	03
	G	05	03	02
Total		34	21	17
<u>Ovinhos de amendoim</u>	A	05	01	00
	B	05	02	01
Total		10	03	01
<u>Paçoca</u>	A	30	26	23
	B	05	03	02
	C	05	04	03
	D	05	03	02
	E	02	00	00
	F	05	03	02
Total		52	39	32
<u>Pasta</u>	A	05	04	01
<u>Pê de moleque</u>	A	05	02	01
	B	05	02	02
Total		10	04	03
Total Geral		241	128	92

Tabela 10 - Teores de Aflatoxinas nas Amostras Positivas

Produtos	Aflatoxinas (ppb)								
	B ₁		B ₂		G ₁		G ₂		
	Faixa ^a	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	
<u>Amendoim cru com casca</u>	A	14 - 90	38	13 - 18	9	23	-	ND	-
	B	28 - 64	39	ND	-	92	-	28	-
<u>Amendoim cru sem casca</u>	A	10 - 1904	446	73 - 95	84	37 - 48	42	69	-
	B	10 - 197	104	180	-	33 - 69	51	24	-
<u>Amendoim frito salgado com pele</u>	A	476	-	51	-	69	-	64	-
	B	14 - 238	70	33	-	35 - 128	30	37 - 48	42
	C	13 - 238	144	99	-	10 - 95	65	45 - 83	64
	D	20 - 28	24	ND	-	14	-	ND	-
	E	73 - 256	122	51	-	48 - 183	115	197	-
	F	14 - 197	61	28	-	64 - 83	79	51 - 64	58
<u>Sem pele</u>	A	28 - 73	51	ND	-	ND	-	ND	-
	B	26	-	ND	-	ND	-	ND	-
	C	10 - 69	40	ND	-	10	-	ND	-
<u>Amendoim japones</u>	A	167	-	ND	-	ND	-	ND	-
	B	10 - 200	03	83	-	33 - 95	64	69	-
	C	238	-	179	-	48	-	ND	-
	D	10 - 90	40	83	-	26 - 333	180	26	-
	E	9 - 256	96	ND	-	128 - 366	247	69 - 91	80
	F	20 - 1026	428	69 - 138	104	39 - 51	45	48	-
	G	26 - 49	37	ND	-	69	-	ND	-
<u>Ovinho de amendoim</u>	A	30	-	ND	-	ND	-	ND	-
	B	10 - 18	14	ND	-	28	-	ND	-
<u>Pasta de amendoim</u>	A	10 - 37	22	ND	-	ND	-	ND	-
<u>Amendoim doce colorido</u>	A	28	-	ND	-	26	-	ND	-
	B	51	-	ND	-	35	-	ND	-
	C	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<u>Amendoim doce com chocolate</u>	A	14 - 28	21	ND	-	ND	-	ND	-
	B	33	-	ND	-	64	-	ND	-
	C	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
	D	37 - 169	103	ND	-	51	-	ND	-
<u>Paçoca</u>	A	24 - 183	79	ND	-	14 - 129	-	99	76
	B	49 - 1282	191	28 - 138	77	35 - 476	94	64 - 90	-
	C	18 - 256	167	26 - 92	40	28 - 138	71	45 - 67	56
	D	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
	E	26 - 179	103	51	-	95 - 119	107	37	-
	F	14 - 735	266	10 - 83	36	26 - 180	103	10 - 51	31
<u>Pê de moleque</u>	A	10 - 48	29	ND	-	ND	-	ND	-
	B	49 - 138	94	69	-	45	-	ND	-

^a Os valores únicos indicam a detecção de aflatoxina em uma amostra.

ND - Não detectado.

1282 ppb de B₁ e 476 ppb de G₁, indicando a má qualidade do amendoim utilizado no processamento. Sendo um produto triturado, a qualidade da matéria prima fica mascarada no produto final. O amendoim cru sem casca chegou a apresentar valor de 1904 ppb de B₁ e 69 ppb de G₁. O amendoim japonês por sua vez atingiu 1026 ppb de aflatoxina B₁ e 366 ppb de G₁ em determinadas amostras, um resultado pouco esperado, considerando que o produto se constitui apenas de 50% de amendoim. Em algumas determinações feitas, separando o amendoim da cobertura, os resultados confirmaram o teor mais elevado no amendoim em relação ao produto integral. O amendoim frito com testae também alcançou níveis elevados de aflatoxina chegando a 476 ppb de B₁ e 183 ppb de G₁, enquanto que o mesmo produto sem testae apresentou menor incidência, sendo positivo acima de 30 ppb em 13,3% das amostras analisadas com teores de até 79 ppb.

Desde 1965 a incidência de aflatoxina em amendoim cru no Estado de São Paulo já foi demonstrado pelos trabalhos de Tango et al. e Menezes et al. Em 1976 Fonseca reiterou a contaminação do amendoim em casca, afirmando que já eram contaminados quando entregues à fábrica (Fonseca, 1976b, c, d, e). Mais recentemente, o Programa Nacional de Monitorização e Controle de Micotoxinas (1980) constatou a presença de aflatoxinas B₁ e/ou G₁ em 52,0% de 307 amostras de amendoim da safra "das águas" e 20,6% de 179 amostras da safra "da seca".

Pregnoiato e Sabino já afirmaram também em 1970 a alta contaminação de produtos derivados de amendoim, porém, sem apresentarem os teores encontrados. Trabalhando especificamente com pasta de amendoim (30 amostras) Fonseca e Del Nery, no mesmo ano, encontraram 90% de contaminação. De 1971 a 1974 Sabi-

no (1980) analisou vários tipos de alimentos e ração animal, num total de 572 amostras. O grupo denominado amendoim e derivados (total de 79 amostras) apresentou os maiores teores em 1971/1975 e em 1979, atingindo níveis de 7.800 ppb e 2.500 ppb, respectivamente. Não foram especificados os derivados de amendoim incluídos no levantamento. Arckoll em 1977 relatou que praticamente todos os produtos derivados de amendoim, à venda no Brasil, estavam contaminadas com níveis inaceitáveis de aflatoxinas. Recentemente Sabino et al. (1982) analisaram 50 amostras de pasta de amendoim e 106 de paçoca, encontrando teores de até 278 e 260 ppb, respectivamente.

Uma vez que os trabalhos têm sido feitos no Estado de São Paulo, cabe salientar que um estudo a nível nacional se faz necessário. O Programa Nacional de Monitoração de Controle de Micotoxinas tem como objetivo o alcance nacional, embora tenha encontrado dificuldade de condições laboratoriais, pessoal treinado e conscientização para que este controle se torne efetivo.

4.3 - Teores de Aflatoxinas em Milho e seus Produtos Comercializados em Campinas em 1982.

Depois do amendoim, o milho é o produto mais citado na literatura quanto à contaminação por aflatoxinas (Yahl et al., 1971; Nagarajan e Bhat, 1972; Rambo et al., 1975; Shotwell et al., 1975a, b; Lillehoj et al., 1975a, b, 1976 a,b, 1978, 1980; Hunt et al., 1976; Widstrom et al., 1976; Balzer et al., 1977; Lillehoj e Hesseltine, 1977; Calvert et al., 1978; Benett, 1978; Kwolek e Shotwell, 1979; Karki et al., 1979; McMillian et al., 1980). Nos Estados Unidos, mais precisamente no sul, o problema

de contaminação pela toxina é considerado crítico (Shotwell et al., 1975a, b; Lillehoj et al., 1976 a e b; Hunt et al., Cobb, 1979; Gray et al., 1982). O problema também existe em outros países, tais como a Índia e Nepal (Krishnamachari et al., 1977; Bilgrami et al., 1981; Karki et al., 1979). Num estudo feito na Espanha com milho de procedência argentina (18 amostras) e americanas (13 amostras), foi constatado que 82,3% e 89,0% das amostras estavam contaminadas com concentração superior a 20 ppb de aflatoxina (Almenar et al., 1980).

Diante destes fatos os resultados do presente trabalho foram inesperados (Tabela 11). Das 83 amostras de milho verde e de 5 tipos de produtos derivados de milho (farinha de milho amarela, farinha de milho branca, flocos de milho, fubã e sêmola) analisadas durante 1982, somente duas amostras de fubã estavam contaminadas com teores bem abaixo do limite permitido (14 a 18 ppb de B₁).

Apesar de serem muito consumidos existem poucos estudos desenvolvidos sobre a incidência de aflatoxina nestes produtos no país. Pregnolato e Sabino (1969/1970) Eiroá (1978) e Sabino (1980) estudaram entre outros alimentos a farinha de milho, não encontrando toxina em nenhuma das amostras. Já Sabino (1980) analisando vários alimentos, relatou teores altos de aflatoxinas no grupo "arroz, milho, aveia e trigo", porém, sem especificar o produto que apresentou a contaminação mais alta e o teor alcançado especificamente pelo milho.

O fato de maioria dos produtos derivados de milho terem apresentado valores negativos, pode ser explicado pelo uso de milho não contaminado e também pelo tipo de processamento. A farinha de milho amarela, farinha de milho branca e os flocos

Tabela II - Incidência de Aflatoxinas em Milho e seus Produtos Comercializados em Campinas em 1982.

Produto	Marca	Número de Amostras Analisadas	Aflatoxinas (ppb)	
			B ₁	G ₁
Farinha de milho				
amarela	A	5	ND	ND
	B	5	ND	ND
	C	5	ND	ND
	D	5	ND	ND
Farinha de milho				
branca	A	5	ND	ND
	B	5	ND	ND
	C	5	ND	ND
Flocos de milho				
cozido	A	5	ND	ND
	B	5	ND	ND
	C	5	ND	ND
Fubá				
	A	5	ND	ND
	B	3	ND	ND
	C	5	14	ND
	D	3	ND	ND
	E	5	18	ND
Milho Verde				
	A	5	ND	ND
	B	5	ND	ND
Sêmola				
	A	2	ND	ND

ND - Não detectado

de milho são preparados atualmente a partir da canjica, ou seja, do milho desprovido de película (pericarpo) e de germe que são partes mais susceptíveis à invasão pelo fungo e à formação da toxina (Lillehoj, 1976a; Gorelova e Lvova, 1980). Yahl et al. em 1971 encontraram que 30-38% das aflatoxinas estavam nas fibras, 13,3-17,0% no gluten e 6,6-9,9% no germe e apenas 1,0 a 1,2% se encontrava no amido. Já o fubá é preparado a partir de grão integral, podendo explicar os resultados positivos. A farinha e flocos precozidos também sofrem aquecimento no seu preparo, que pode ou não reduzir o teor de aflatoxinas, dependendo da temperatura, tempo e outras condições de aquecimento. Por outro lado, a farinha permanece um tempo relativamente longo (2-3 dias) em tanques de maceração, que provoca uma fermentação natural, podendo favorecer o crescimento do fungo e produção de toxina.

4.4 - Produção de Aflatoxinas em Produtos de Amendoim Durante a Estocagem.

A presença das aflatoxinas em amendoim e seus produtos tem sido atribuída principalmente à contaminação no campo. A produção das toxinas durante a estocagem foi demonstrada, porém em condições controladas (Codner et al., 1963; Ashworth et al., 1965; Davis e Diener, 1967; Hansen e Jung, 1973 e Wilson et al., 1977) para favorecer o crescimento de microrganismos produtores e a síntese das toxinas. Uma exceção é o trabalho de Fonseca (1976b, c, d, e) que demonstrou o aumento de aflatoxina durante o armazenamento de amendoim cru com casca nas indústrias de óleo.

Com o objetivo de verificar a possível produção de aflatoxinas sob condições naturais de armazenamento, produtos de

amendoim foram preparados a partir de amendoim isento das toxinas e amendoim já contaminado e a formação de aflatoxinas foi a acompanhada durante todo o período de estocagem.

Não foi encontrada contaminação por aflatoxinas ao longo de 270 dias de estocagem em todos os produtos preparados a partir de lote isento de aflatoxinas, bem como, no amendoim usado como controle (total de 96 amostras), estocados tanto na presença quanto na ausência de luz. Isso demonstra de maneira clara e definitiva que o armazenamento em condições normais não aumenta o problema com aflatoxinas, desde que os produtos sejam elaborados com matéria-prima de boa qualidade e isenta de toxinas.

Não houve também um aumento significativo nos teores de aflatoxinas durante a estocagem no controle e em produtos preparados a partir de amendoim contaminado (teores médios de 48 ppb de B₁ e 24 ppb de G₁ baseados em 10 determinação) estocados na presença de luz (total de 48 amostras). Uma única exceção foi a amostra de amendoim frito e salgado analisada no 45º dia de estocagem. Isto poderia ser um reflexo da conhecida heterogeneidade da contaminação por aflatoxinas nas sementes, considerando que as duplicatas neste caso forneceram resultados bastante diferentes (42 e 333 ppb de B₁).

Já nos produtos e amendoim controle, estocados na ausência de luz, observou-se um grande número de amostra altamente contaminadas, com níveis acima dos teores iniciais (Figuras 4, 5, 6 e 7). Aplicando o teste F, o nível de contaminação foi significativamente maior que nas amostras expostas à luz a nível de 0,5%. Este resultado está de pleno acordo com alguns estudos in vitro, demonstrando a inibição da síntese da toxina em culturas de A. flavus e A. parasiticus quando incubados na presença de luz.

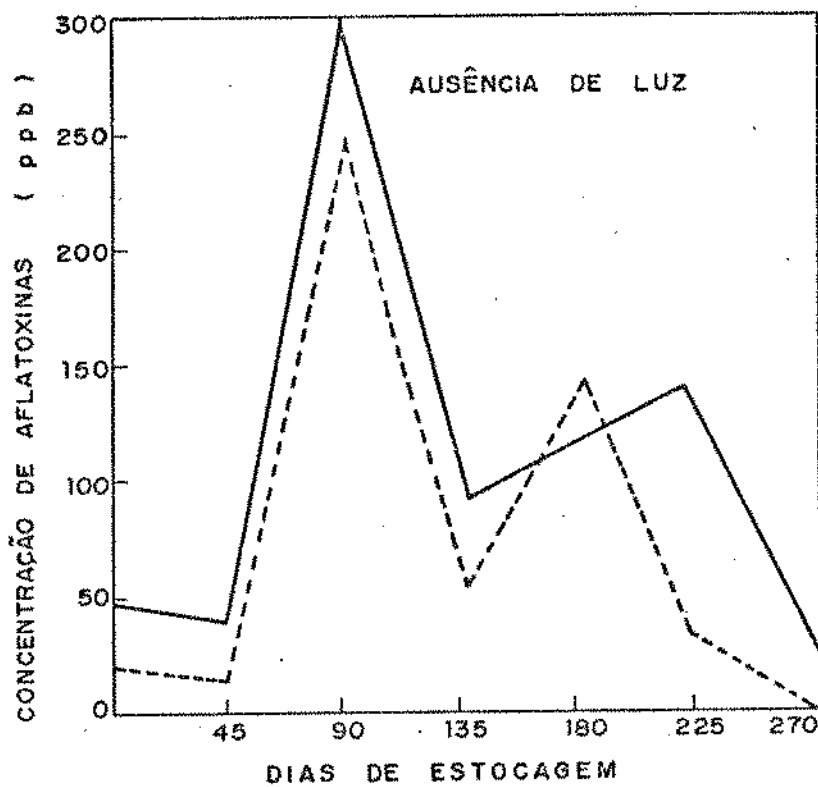
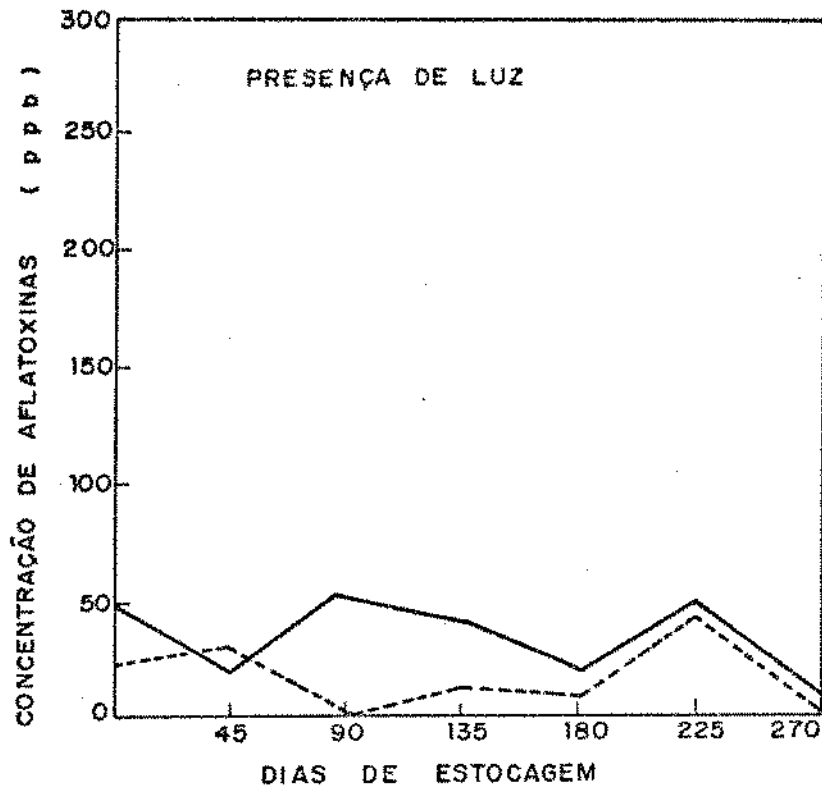


Figura 4. Teores de aflatoxinas B₁ (—) e G₁ (---) em amendoim crú (*in natura*), preparado de matéria-prima contaminada.

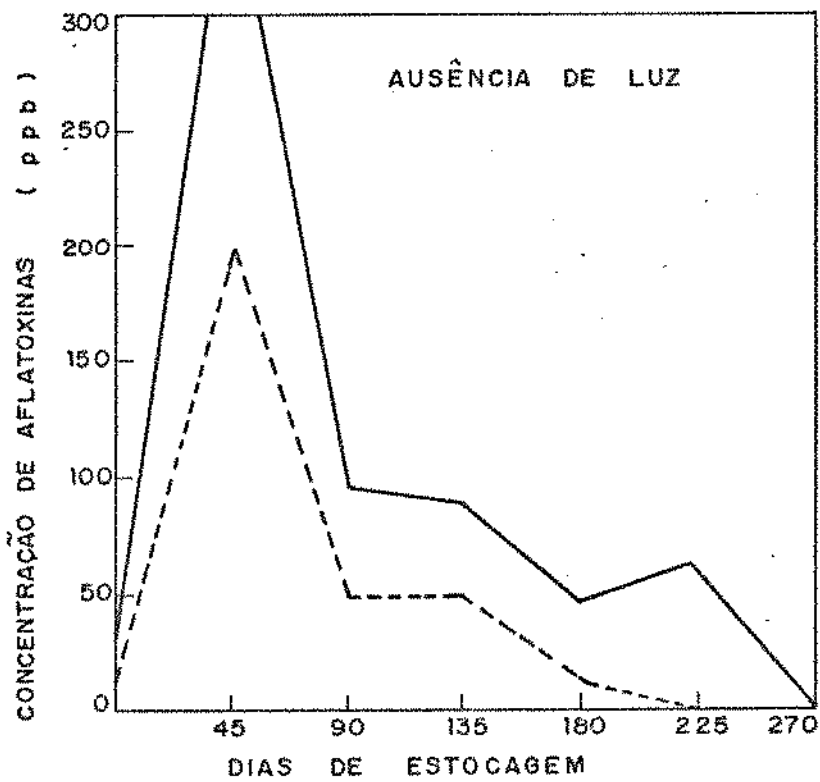
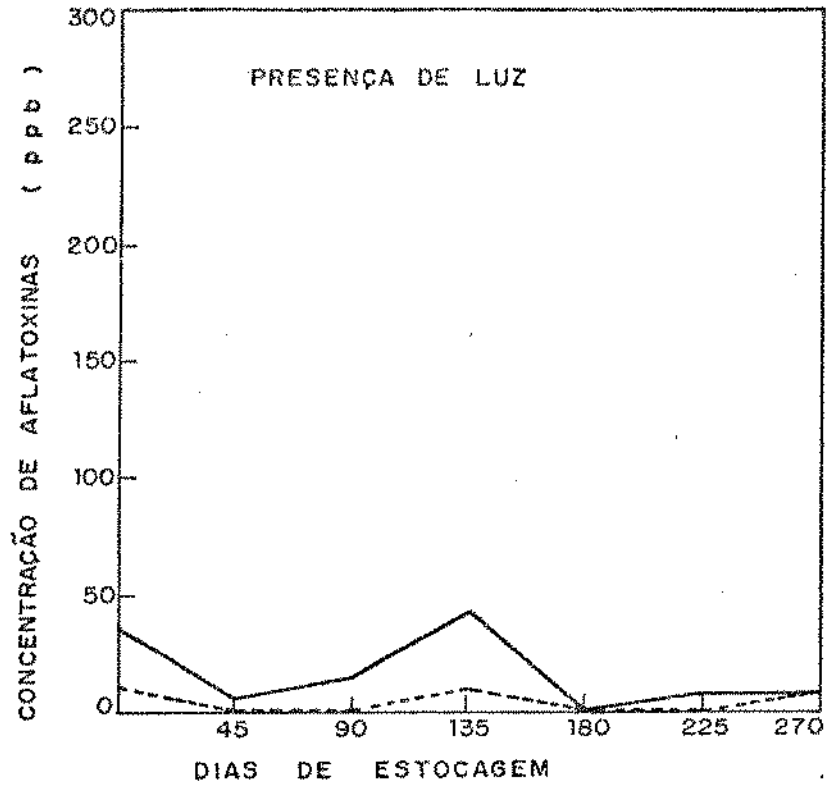


Figura 5. Teores de aflatoxinas B₁ (—) e G₁ (---) em amendoim doce, preparado de matéria-prima contaminada.

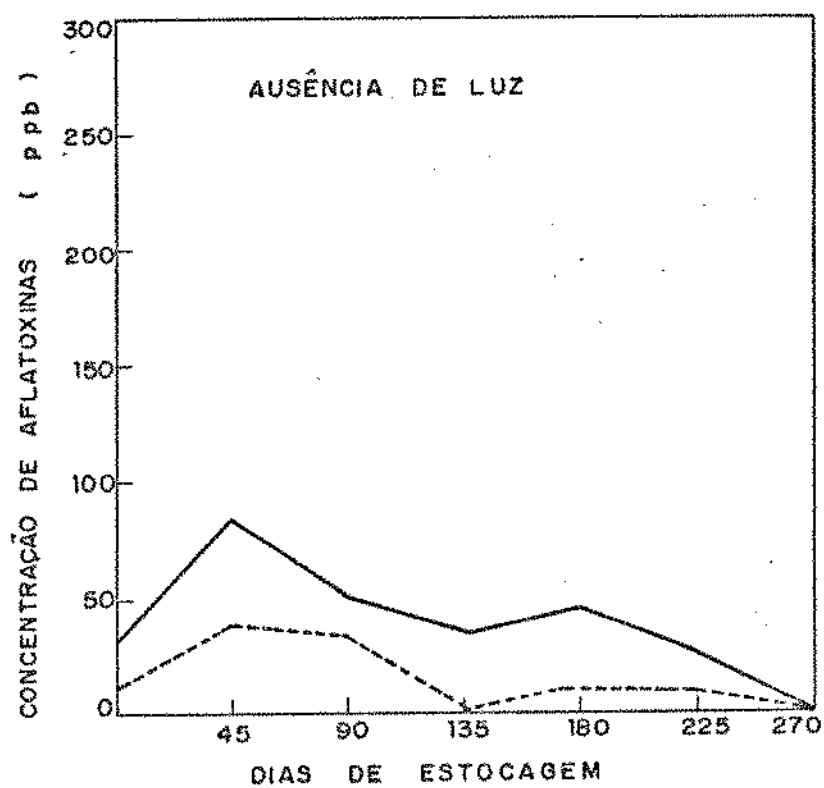
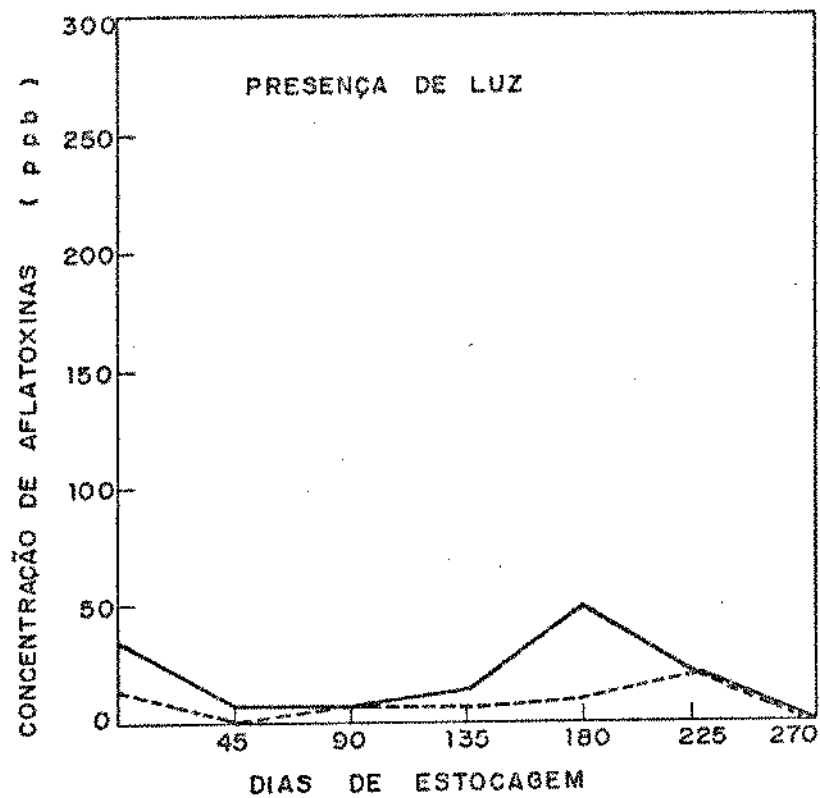


Figura 6. Teores de aflatoxinas B₁ (—) e G₁ (---) em amendoim doce com chocolate, preparado de matéria-prima contaminada.

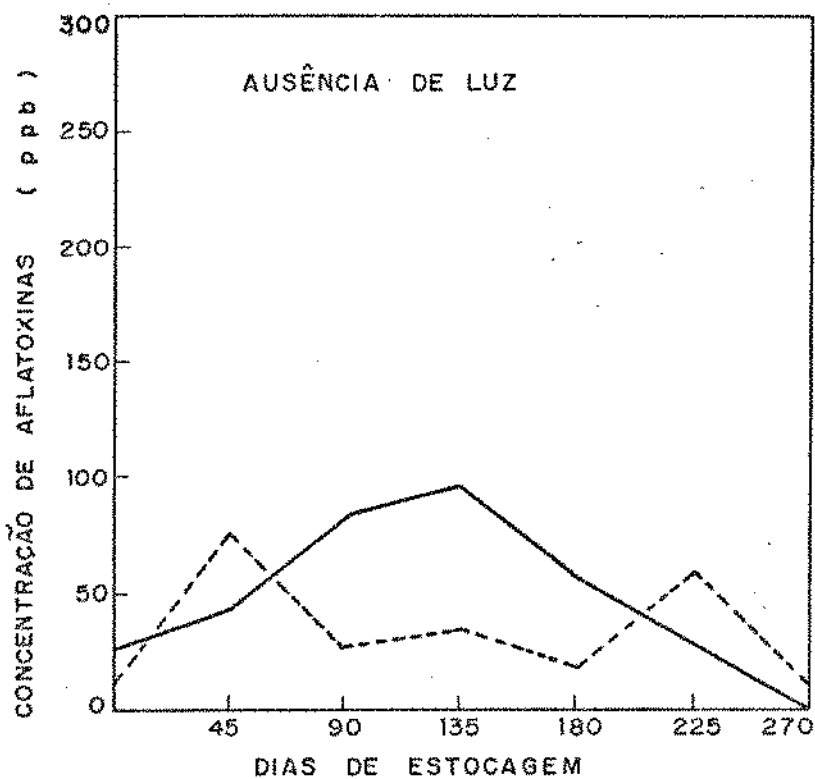
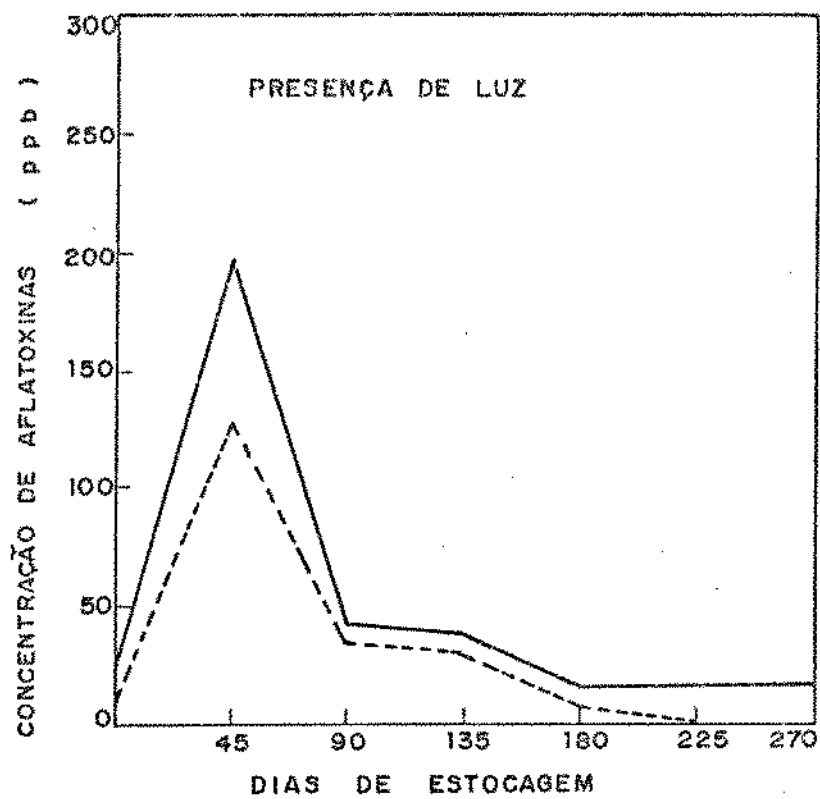


Figura 7. Teores de aflatoxinas B₁ (—) e G₁ (---) em amendoim frito e salgado, preparado de matéria-prima contaminada.

As temperaturas atingidas durante os processamentos estiveram em torno de 150°C, temperatura esta suficiente para destruir os esporos, embora insuficiente para destruir a toxina completamente (Austwick e Ayerst, 1963; Lee et al., 1968). Portanto, a aparente elevação dos teores de aflatoxinas nos produtos durante a estocagem no escuro poderia ser explicada em termos de uma nova invasão dos fungos produtores.

Vários fatores podem ter favorecido esta reinfecção tais como: temperatura ambiente (média de 26°C), conteúdo de umidade das sementes durante a estocagem (cerca de 11% no final do experimento) e a qualidade das sementes utilizadas. Destes, o último é o fator mais provável considerando que as condições de estocagem foram as mesmas para ambos os lotes.

O amendoim do primeiro lote era de boa qualidade contendo sementes novas, de casca e testae intactas com coloração e tamanho uniformes, portanto, com a resistência natural intacta. Por outro lado, o lote contaminado apresentava cerca de 40% de cascas quebradas, com sementes sem uniformidade de tamanho e cor, sendo que muitas apresentavam também testae danificadas. Este lote, que já sofrera invasão por fungos anteriormente, estava com sua resistência natural muito baixa, portanto, susceptível a uma nova invasão, particularmente na ausência de luz.

Cabe salientar que a microflora da semente está sempre presente em condições naturais, não podendo penetrar devido à proteção da testae. Porém, danos provocados por insetos, roedores ou pela ação da umidade, destroem esta proteção e permitem a penetração dos esporos no interior da semente (Bogoroditskaya, 1980). Schroeder e Ashworth, também observaram que sementes, mesmo intactas, contidas em cascas quebradas continham toxinas, em-

bora em níveis menores que quando ambas (semente e casca) apresentavam-se danificadas (Schroeder e Ashworth, 1966 e Ashworth, 1966).

A idéia de processar vários tipos de produtos surgiu como tentativa de verificar o efeito do processamento bem como o efeito de composição na produção de aflatoxina. A cafeína, por exemplo, já foi citada como inibidora da produção das aflatoxinas, tornando assim produtos como café, cacau e chá substratos pobres (Scott, 1968; Campbell, 1969; Stollof, 1970; Nartowicz et al., 1979 e Lenovich, 1981). No caso do sal, à temperatura de 0°C em concentração de 8% pode evitar o desenvolvimento de fungos, porém, à temperatura ambiente (20-25°C) é necessária uma concentração de 12% para se obter o mesmo efeito (Montes, 1977). Dado à distribuição heterogênea das aflatoxinas e as limitações nas condições de trabalho, permitindo a análise de um número pequeno de amostras, os resultados não permitiram uma afirmação segura em relação ao tipo de processamento e à composição do produto, embora, amendoim doce e amendoim cru tenham atingido valores mais altos de aflatoxinas que o amendoim frito e salgado (cerca de 5% de sal) e amendoim coberto com chocolate (contendo cafeína). Comparando o amendoim processado com amendoim cru (controle), constatou-se maior contaminação neste último, uma vez que não foi submetido à ação da temperatura de processamento (em torno de 150°C para os produtos) portanto, não sofreu redução das toxinas (os produtos processados sofreram cerca de 20% de redução das aflatoxinas totais), nem destruição dos esporos já existentes.

Farah et al. relataram em 1983 um estudo sobre amostras de amendoim cozido e salgado, comercializado na cidade de Recife, não encontrando contaminação em nenhuma das amostras analisadas. Os autores sugeriram que uma remoção ou redução de

aflatoxina poderia ocorrer quando o amendoim fosse cozido em solução aquosa de NaCl 5%.

Numa tentativa de comparação, foram analisadas três amostras de 1 kg cada de amendoim com casca cozido e salgado proveniente do Recife. Além disso, um lote foi estocado à temperatura ambiente no escuro durante uma semana, retirando-se amostra para análise de 2 em 2 dias. Mesmo com alto teor de umidade e crescimento intenso de fungos não foram encontradas aflatoxinas em nenhuma das amostras, tanto antes quanto depois do armazenamento. Este assunto merece um estudo mais aprofundado.

4.5 - Possível Contaminação com Aflatoxinas em Quatro Cultivares de Milho em Três Estádios de Maturação.

Vários trabalhos (Lillehoj et al., 1975 a e b; Hunt et al., 1976, Lillehoj et al., 1976 a e b, 1978 e 1980, Lillehoj e Hesseltine, 1977 e McMillian et al., 1980) mostraram que a contaminação de milho ocorre no campo tanto antes como após a colheita, bem como durante a estocagem (Christensen e Kalfmann, 1974, Rambo et al., 1975, Shotwell et al., 1975 a e b, Lillehoj e Hesseltine, 1977, Bennett e Anderson, 1978 e Karki et al., 1979. Por isto, junto à verificação da presença de aflatoxinas em produtos comercializados, efetuou-se um estudo da possível contaminação de milho no campo. Foram analisadas quatro cultivares de milho (Cubano, Maya Normal, Maya Opaco e Nutrimaiz) em três estádios de maturação. Este tipo de trabalho avaliaria as diferentes susceptibilidades das quatro cultivares à contaminação e se esta ocorresse, poderíamos detectar em que estádio de maturação haveria maior incidência de contaminação.

Não foram encontradas aflatoxinas em nenhuma amostra

das quatro cultivares de milho cultivadas no campo experimental do Departamento de Genética e Evolução da Unicamp em nenhum dos estádios de maturação.

Poderia ser alegado que a ausência de aflatoxinas nos milhos produzidos na Unicamp se devesse às condições ótimas de plantio, cultivo e colheita, condições estas que podem ser inexistentes nos campos comerciais. Cabe salientar que nossos resultados foram corroborados pelos resultados obtidos pelo Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas. Os teores encontrados no levantamento feito no Estado de São Paulo em milho seco proveniente das safras "das águas" e "da seca", foram muito baixos sendo a maioria das amostras negativas (PMC-Micotoxinas, 1982).

Muitos trabalhos citam como fatores que conduzem à contaminação do milho com aflatoxinas no campo: 1) umidade relativa ($\geq 85\%$); 2) temperatura elevada (30°C); 3) época de seca (terreno arenoso); 4) temperatura alta pós-infecção; 5) invasão por insetos no estádio seco ("hard dough"); 6) proteção limitada da palha e 7) longos períodos entre infecção pelo fungo e colheita que permitem maior síntese da toxina (Lillehoj et al., 1975 a e b; Widstrom et al., 1976; Krishnamachari et al., 1977; Mc Millian et al., 1980; Gray et al., 1982). O estádio de maturação também influencia na contaminação. Por exemplo, no estádio verde ("milk dough") o milho é bastante susceptível à infecção devido aos altos teores de umidade no grão, porém, é bem melhor protegido pela palha nesse estádio. Por outro lado, no estádio seco a espiga fica mais exposta sendo que a própria palha (brácteas) e barba (estilo estigma) envelhecidas transformam-se em bom substrato para bactérias, leveduras e fungos (Lillehoj et al., 1975 a e b, 1977; Hesseltine e Bothast, 1977).

Baseando-se nestas afirmações, várias explicações podem ser citadas para a aparente resistência do milho à contaminação por aflatoxinas no Estado de São Paulo, (Da Silva, W. J., 1984): 1) Uma vez que as espigas são deixadas para secar no campo, as variedades comerciais são selecionadas principalmente pela resistência a insetos e microrganismos patogênicos, tendo palha bastante protetora; 2) a umidade do milho seco no tempo da colheita situa-se em torno de 10% enquanto que a umidade crítica para a formação de toxinas em cereais incluindo milho é de 13,5 a 15,5%; 3) Em ano normal, onde não há grandes alterações na frequência de chuvas (inundações ou secas intensas), a colheita é realizada quando o clima é seco; 4) A mecanização, muito utilizada em países desenvolvidos, provocando danos nas sementes e propiciando a invasão pelos fungos, não é utilizada em nosso país que ainda recorre à prática de método manual de colheita; 5) A estocagem é curta ao contrário dos Estados Unidos e outros países onde a estocagem prolongada leva à formação de "hot spots" (grupos de sementes com maior teor de umidade no interior dos lotes armazenados, propiciando o desenvolvimento do fungo); Além desses pontos vale a pena lembrar que o milho cultivado nos países desenvolvidos, geralmente em regiões de alta latitude, tem estação curta de cultivo. Com isso tem que ser colhido com umidade ao redor de 15 a 18% devendo ser seco imediatamente após para ser armazenado.

Nossos resultados assemelham-se aos relatados por Balzer et al. em 1977 na Iugoslávia, os quais não encontraram aflatoxinas em 191 amostras de milho analisadas.

4.6 - Estudo "in vitro" da Susceptibilidade de Quatro Cultivares de Milho.

Nos últimos anos está sendo dada ênfase à influência da composição química em grãos e sementes na resistência à invasão

por fungos produtores de aflatoxinas, levando à susceptibilidades diferentes de várias cultivares. Por este motivo, quatro cultivares do milho, com composição química distinta foram submetidas à inoculação por Aspergillus parasiticus.

Neste estudo in vitro, amostras foram analisadas somente após 40 dias de inoculação quando o crescimento do fungo tornava-se visível. A cultivar Maya Normal apresentou pouco crescimento do fungo e nenhuma contaminação com aflatoxinas nas duas condições de umidade relativa (Tabela 12). As outras três cultivares apresentaram contaminação sendo que os níveis maiores foram encontrados em umidade relativa mais alta. As cultivares Nutrimaiz e Maya Opaco demonstraram ser mais susceptíveis que o Cubano. Pela composição das cultivares, o fator comum entre Nutrimaiz e Maya Opaco é a superior qualidade das proteínas com alto teor de lisina. A cultivar Nutrimaiz que apresentou maior contaminação reúne as propriedades desejáveis de Maya Opaco e Cubano tendo qualidade de proteína superior e alto teor de polissacarídeos solúveis em água.

Das duas cultivares com qualidade inferior de proteína, Maya Normal e Cubano, a última, que possui um teor mais elevado de açúcares, apresentou maior susceptibilidade.

Os resultados demonstraram claramente que a variação na composição química obviamente interfere na produção das aflatoxinas, como já está sendo enfatizado nos últimos anos. Tanto a qualidade da proteína (composição de aminoácidos) quanto o teor de açúcares são importantes na produção das toxinas. Porém o efeito do primeiro fator parece ser predominante, um resultado pouco esperado, diante da ênfase preponderante dada na literatura quanto ao papel dos carboidratos. Por outro lado, poderia ser pensado que em alimentos como o milho, que são ricos em car

Tabela 12 - Produção de Aflatoxinas em Cultivares de Milho Inoculado com Aspergillus parasiticus

Cultivar ^a	Aflatoxinas (ppb)							
	UR 81%				UR 90%			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Maya Normal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cubano	ND	ND	69	ND	476	239	183	ND
Maya Opaco	256	476	952	256	513	367	1905	1465
Nutrimaiz	571	476	1905	571	2381	524	2836	1026

^aAs cultivares foram analisadas após 40 dias de incubação

ND = Não detectado

bohidratos, assim já preenchendo a necessidade de fontes de carbono para o crescimento dos fungos, outros fatores (como o conteúdo de nitrogênio) tornam-se importantes. Esse assunto merece estudos mais profundos, mesmo porque não há ainda conclusões definitivas na literatura.

Nagarajan e Bhat (1972) retiraram e incorporaram diferentes extratos de duas cultivares de milho (Opaco-2 e Deccan) ao meio de cultura sintético e observaram a capacidade de produzir aflatoxina. Notaram que a presença de proteína de baixo peso molecular na fração globulina, retardava o acúmulo de aflatoxinas na cultivar Opaco-2, com alto teor de lisina.

Lillehoj et al. (1976) investigaram nos Estados Unidos, as diferentes susceptibilidades de milhos híbridos a fungos produtores de toxinas e encontraram que aqueles não adaptados ao sul do país eram mais susceptíveis à contaminação por aflatoxinas. Já La Prade e Manwiller (1977) encontraram produção de toxina significativamente mais alta em híbridos "short season" em campos da Carolina do Sul que em híbridos "long season" adaptados ao sul.

Em 1978, Calvert et al. citaram a obtenção de híbridos com espigas cobertas com palha espessa e bastante fechadas, que são mais resistentes ao ataque de insetos e conseqüentemente à ação dos fungos, como alternativa para diminuir a incidência de contaminação.

Alguns trabalhos têm sido relatados sobre novos híbridos de milho e amendoim que incorporam fatores de resistência à variações climáticas e ao ataque de insetos e fungos, na palha, na vagem (casca), na testae, ou mesmo na composição química da semente. (Mixon e Rogers, 1973; Brindley et al., 1975; Amaya et al., 1977; Wilson et al., 1977; Cobb, 1979; Souza et al., 1978; Amaya et al., 1980 e Gorelova e Lvova, 1980).

CONCLUSÕES

1. Dos métodos avaliados, o método de Romer para triagem e quantificação mostrou ser melhor em termos de sensibilidade, precisão, custo e rapidez.
2. A incidência e teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados na cidade de Campinas de 1980 a 1982, foram elevados especialmente em paçoca, amendoim japonês, amendoim frito salgado e amendoim crú sem casca.
3. A incidência de aflatoxinas em milho e seus produtos na cidade de Campinas em 1982 foi insignificante.
4. Nenhuma elevação dos teores de aflatoxinas ocorreu no amendoim crú e produtos derivados, provenientes de lote isento de aflatoxinas durante 270 dias de estocagem à temperatura ambiente na presença ou ausência de luz.
5. Um aumento significativo nos teores de aflatoxinas foi observado no amendoim crú e produtos derivados preparados à partir de amendoim contaminado, estocados à temperatura ambiente na ausência de luz.
6. Nenhuma contaminação foi constatada nas quatro cultivares de milho (Cubano, Maya Normal, Maya Opaco e Nutrimaiz) em três estádios de maturação (verde, pastoso e seco), colhidas no campo experimental do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas.
7. Em estudo in vitro, as cultivares Nutrimaiz e Maya Opaco, ambas com qualidades superior de proteína, mostraram ser mais susceptíveis à contaminação de aflatoxinas. A cultivar Maya Normal não apresentou aflatoxina mesmo à 90% de umidade relativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDOLLAHI, A. e BUCHANAN, R.L. 1981. Regulation of aflatoxin biosynthesis: Characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. *J. Food Sci.* 46: 143.
2. ADAMSON, R.H.P., CORREA, P. e DALGARD, D.W. 1973. Brief Communication: Occurrence of a primary liver carcinoma in a rhesus monkey fed aflatoxin B₁. *J. Natl. Canc. Inst.* 549.
3. ADYE, J. e MATELES, R.I. 1964. Incorporation of labelled compounds into aflatoxins. *Biochim. Biophys. Acta* 86: 418.
4. ALLCROFT, R., CARNAGHAN, R.B.A., SARGEANT, K. e O'KELLY, J. 1961. A toxic factor in brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.*, 73 (17): 428.
5. ALLCROFT, R. e CARNAGHAN, R.B.A. 1962a. Groundnut toxicity- Aspergillus flavus toxin (aflatoxin) in animal products: Preliminary communication. *Vet. Rec.* 74 (31): 863.
6. ALLCROFT, R. e CARNAGHAN, R.B.A. 1963a. Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet. Rec.* 75 (10): 259.
7. ALLCROFT, R. e CARNAGHAN, R.B.A. 1963b. Toxic products in groundnuts: Biological effects. *Chem. Ind.* 50 (January).
8. ALLCROFT, R. 1965. Aspects of aflatoxicosis in farm animals em "Mycotoxins in Foodstuffs" ed. G.N. Wogan, p. 153. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

9. ALLCROFT, R., ROGERS, H., LEWIS, G., NABNEY, J. e BEST, P.E.
1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the
"milk toxin". *Nature*, 209: 154.
10. ALMENAR, V.S., LUMBRERAS, A.S., HABA, J.H. e GIMENEZ, E. H.
1980. Contenido de aflatoxinas y Aspergillus flavus en si-
los comerciales. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 20 (3): 371.
11. ALPERT, M.E., HUTT, M.S.R., WOGAN, G.N., e DAVIDSON, C. S.
1971. Association between aflatoxin content of food and
hepatoma frequency in Uganda. *Cancer* 28: 253.
12. AMARAL, L.B.S. 1961. Torta de amendoim e morte de suínos.
Biológico 27: 63.
13. AMAYA-FARFÁN, J., YOUNG, C.T., MIXON, A.C. e NORDEN, A.J. 1977.
Soluble amino and carbohydrate compounds in the testae of
six experimental peanut lines with various degrees of As-
pergillus flavus resistance. *J. Agric. Food Chem.* 25 (3): 661.
14. AMAYA-FARFÁN, J., YOUNG, C.T., NORDEN, A.J. e MIXON, A.C. 1980.
Chemical screening for Aspergillus flavus resistance in
peanuts. *Oleagineux* 35 (5): 255.
15. AMES, B.N., DURSTON, W.E., YAMASAKI, E. e LEE, F.D. 1973.
Carcinogens are mutagens: a simple test system combining
liver homogenates for activation and bacteria for detec-
tion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (8): 2281.
16. AMLA, I., KUMARI, S., MURTHY, S.V., JAYARAJ, P. e PARPIA,
H.A.B. 1970. Role of aflatoxin in Indian childhood cir-
rhosis. *Ind. Pediatrics* 7 (5): 262.
17. ANDRELLOS, P.J., BECKWITH, A.C. e EPPLEY, R.M., 1966. Photo-
chemical changes of aflatoxin B₁. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*
49 (6): 1268.

18. AOAC, 1980. "Official Methods of Analysis". 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. cap. 26.
19. ARAI, P., ITO, T. e KOYAMA, Y. 1967. Antimicrobial activity of aflatoxins. J. Bact. 93 (4): 59.
20. ARCHER, M. 1974. Detection of mycotoxins in foodstuffs by use of chick embryo. Mycopathologia Applicata 54 (4): 453.
21. ARCKOLL, D.B. 1977. Alguns estudos sobre problemas da aflatoxina no Brasil. Apresentado na 29.^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Seção A: Ciência Aplicada - A.5. Tecnologia de Alimentos, Ciência e Cultura 29 (7): 130.
22. ASAO, T., BÜCHI, G., ABDEL-KADER, M.M., CHANG, S.B., WICK, E.L. e WOGAN, G.N. 1963. Aflatoxins B and G. J. Am. Chem. Soc. 85: 1706.
23. ASAO, T., BÜCHI, G., ABDEL-KADER, M.M., CHANG, S.B., WICK, E.L. e WOGAN, G.N. 1965. The structures of aflatoxins B and G. J. Am. Chem. Soc. 87 (4): 882.
24. ASHLEY, L.M., HALVER, J.E. e WOGAN, G.N. 1964. Hepatoma and aflatoxicosis in trout. Fed. Proc. 23: 105.
25. ASHWORTH, L.J. Jr., SCHROEDER, H.W. e LANGLEY, B.C. 1965. Aflatoxins: Environmental factors governing occurrence in spanish peanuts. Science 148: 1228.
26. ASPLIN, F.D. e CARNAGHAN, R.B.A. 1961. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Vet. Rec. 73: 1215.
27. AUSTWICK, P.K.C. e AYERST, G. 1963. Groundnut microflora and toxicity. Chem. Ind. 55 (January).

28. AYRES, J.L. e SINNHUBER, R.O. 1966. Fluorodensitometry of aflatoxin on thin layer plates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43: 423.
29. BABABUNMI, E.A., UWAIFO, A.O. e BASSIR, O. 1978. Hepatocarcigens in Nigerian foodstuffs. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* 28: 188.
30. BALZER, I. BOGDANIC, C. e MUZIC, S. 1977. Natural contamination of corn (*Zea mays*) with mycotoxins in Yugoslávia. *Ann. Nutr. Alim.* 31: 425.
31. BARNES, J.M. e BUTTLER, W.H. 1964. Carcinogenic activities of aflatoxin to rats. *Nature* 202: 1016.
32. BARRERA, B.B., CANLAS, B. e CUYEGHENG. 1958. *Philippine J. Cancer* 2: 189, citado no Wogan, G.N. 1968. Aflatoxin risks and control measures. *Fed. Proc.* 27 (3): 932.
33. BENNETT, G.A., LEE, L.S. e VINNETT, C. 1971. The correlation of aflatoxin and norsolinic acid production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48: 368.
34. BENNETT, G.A. e ANDERSON, R.A. 1978. Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products: A review. *J. Agric. Food Chem.* 26 (5): 1055.
35. BHAMARAPRAVATI, N. e VIRRANUVATTI, V. 1966. Liver diseases in Thailand. An analysis of liver biopsies. *Am. J. Gastroenterol.* 45: 267.
36. BILGRAMI, K.S., PRASAD, T., MISRA, R.S. e SINHA, K.K. 1981. Aflatoxin contamination in maize under field conditions. *Indian Phytopath.* 34 (1): 67.

37. BLOUNT, W.P. 1961a. Turkey X Disease and the labelling of poultry foods. Vet. Rec. 73 (9): 227.
38. BLOUNT, W.P. 1961b. The X Disease mystery. Agric. Merchant 41: 85.
39. BOGORODITSKAYA, V.P. 1980. Aflatoxin producers, their main characteristics and peculiarities. No "Food Contamination, with Special References to Mycotoxins Training course in the USSR - United Nations Environment Programme".
40. BOLLER, R.A. e SCHROEDER, H.W. 1966. Aflatoxin producing potential of Aspergillus flavus-oryzae isolates from rice. Cereal Sci. Today 11 (8): 342.
41. BONNE, C. 1935. Cancer in Java and Sumatra. Am. J. Cancer 25: 811.
42. BORKER, E., INSALATA, N.F., LEVI, C.P. e WITZEMAN, J.S. 1966. Mycotoxins in feeds and foods. Adv. Appl. Microbiol. 8: 315.
43. BOURGEOIS, C., OLSON, L., COMER, D., EVANS, H., KESHAMRAS, N., COTTON, R., GROSSMAN, R. e SMITH, T. 1971. Encephalopathy and fatty degeneration of the liver: a clinicopathologic analysis of 40 cases. Am. J. Clin. Path. 56: 558.
44. BREKKE, O.L. e STRINGFELLOW, A.C. 1978. Aflatoxin in corn: A note on ineffectiveness of several fumigants as inactivating agents. Cereal Chem. 55: 518.

45. BRINDLEY, T.A., SPARKS, A.N., SHOWER, S.W.B. e GUTHRIE, W.D.
1975. Recent research advances on the European corn borer
in North America. Ann. Rev. Entomol. 20: 221.
46. BROWN, R.F., WILDMAN, J.D. e EPPLEY, R.M. 1968. Temperature-
dose relationships with aflatoxin on the brine shrimp,
Artemia salina. J. Ass. Off. Anal. Chem. 51 (4) 905.
47. BUCHANAN, R.L. Jr. e AYRES, J.C. 1975. Effect of initial pH
on aflatoxin production. Appl. Microbiol. 30 (6): 1050.
48. BUCHI, G., SPITZNER, D., PAGLIALUNGA, S. e WOGAN, G. N.
1973. Synthesis and toxicity evaluation of aflatoxin P₁.
Life Sci. 13: 1143.
49. BUCHI, G., MULLER, P.M., ROEBUCK, B.D. e WOGAN, G.N. 1974.
Aflatoxin Q₁: a major metabolite of aflatoxin B₁ produced
by human liver. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 8: 582.
50. BUTLER, W.H. e WIGGLESWORTH. 1966. Acute toxicity for afla-
toxin B₁ in guinea pigs. J. Pathol. Bacteriol. 91: 277.
51. BUTLER, W.H., GREENBLATT, M. e LIJINSKY, W. 1969. Carcinogens
in rats by aflatoxin B₁, G₁ e B₂. Cancer Res. 29: 2206.
52. BUTLER, W.H. 1974. Aflatoxin. "Mycotoxins" vol. 2, p.1, ed. Pur-
chase Elsevier Scient. Publishing Co., Amsterdam, Oxf. NY.
53. CALDERWOOD, D.L. e SCHOEDER, H.W. 1968. Aflatoxin development
and grade of undried rough rice following prolonged stor-
age in aerated bins. U.S.D.A. Agr. Res. Serv. Rep. n° 52.

54. CALVERT, O.H., LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F. e ZUBER, M. S.
1978. Aflatoxin B₁ and G₁ production in developing Zea mays kernels from mixed inocula of Aspergillus flavus and parasiticus. Pythopath. 68: 501.
55. CAMPBELL, T.C. 1969. Report to joint AOAC-AOCS Committee on aflatoxins. No 83rd Annual Meeting of AOAC, Washington, D.C. Oct. 13.
56. CAMPBELL, T.C., CAEDO, J.P. Jr., BULATAO-JAYME, J. SALAMAT, L. e ANGEL, R.W. 1970. Aflatoxin M₁ in human urine. Nature 227: 403.
57. CAMPBELL, T.C. e HAYES, J.R. 1976. The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxicology and Applied Pharmacol. 39: 199.
58. CARNAGHAN, R.B.A., SARGEANT, K. 1961. The toxicity of certain groundnut meals to poultry. Vet. Rec. 73 (29): 726.
59. CARNAGHAN, R.B.A., HARTLEY, R.D. e O'KELLY, J. 1963. Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. Nature 200: 1101.
60. CARNAGHAN, R.B.A. 1965. Hepatic tumours in ducks fed a low level of toxic groundnut meal. Nature 208: 308.
61. CHANG, S.B., KADER, M.M.A., WICK, E.L. e WOGAN, G.N. 1963. Aflatoxin B₂: Chemical identity and biological activity. Science 142: 1191.
62. CHRISTENSEN, C.M. 1957. Deterioration of stored grains by fungi. Bot. Rev. 23: 108.

63. CHRISTENSEN, C.M. 1968. Toxicity to experimental animal of 943 isolates of fungi. Cancer Res. 28: 2293.
64. CHRISTENSEN, C.M. e KAUFMANN, H.H. 1974. Microflora. No "Storage of Cereal Grains and their Products" p.158, ed. Christensen. American Association of Cereal Chemists, St.Paul, Minn.
65. CHRISTENSEN, C.M. 1978. Storage fungi. No "Food and Beverage Mycology" p. 173, ed. Beuchat, Avi Publishing Co. Inc., West Port, Conn.
66. CIEGLER, A., LILLEHOJ, E.B., PETERSON, R.E. e HALL, H.H. 1966a. Microbial detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14: 934.
67. CIEGLER, A., PETERSON, R.E, LAGODA, A.A. e HALL, H.H. 1966b. Aflatoxin production and degradation by Aspergillus flavus in 20-liter fermentors. Appl. Microbiol. 14: 826.
68. CLIFFORD, J.I. e REES, K.R. 1966. Aflatoxin: A site of action in the rat liver cell. Nature 209: 312.
69. COBB, W.Y. 1979. Aflatoxin in the Southeastern United States: was 1977 exceptional? Ass. Food. Drug Off. Quarterly Bull. 43: 99.
70. CODNER, R.C., SARGEANT, K. e YEO, R. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of Aspergillus flavus-oryzae on sterilized peanuts. Biotechnol. Bioeng. 5: 185.

71. COKER, R., JONES, B.D. e NAGLER, M.J. 1983a. Mould spoilage in stored tropical foods. no "Mycotoxin Training Manual of Tropical Development and Research Institute", section A: 3.
72. COKER, R., JONES, B.D. e NAGLER, M.J. 1983b. The identification of appropriate assay methods for aflatoxin. No "Mycotoxin Training Manual of Tropical Development and Research Institute", section A:12.
73. COKER, R., JONES, B.D. e NAGLER, M.J. 1983c. Introduction to mycotoxins analysis. No "Mycotoxin Training Manual of Tropical Development and Research Institute", section A:11.
74. COKER, R., JONES, B.D. e NAGLER, M.J. 1983d. Theory of mycotoxin analysis and recent methodology. No "Mycotoxin Training Manual of Tropical Development and Research Institute", section A:15.
75. COKER, R., JONES, B.D. e NAGLER, M.J. 1983e. The analysis of mycotoxins. No "Mycotoxin Training Manual of Tropical Development and Research Institute, section A: 16.
76. COKER, R., JONES, B.D. e NAGLER, M.J. 1981. No "Mycotoxin Manual of Tropical Development and Research Institute". TDRI-Londres.
77. COOMES, T.J., CROWTHER, P.C., FRANCIS, B.J. e SHONE, G. 1964. The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials. Part III: Classification of aflatoxin B₁ levels. Analyst. 89: 436.

78. COOMES, T.J., CROWTHER, P.C., FRANCIS, B.J. e STEVENS, L. 1965. The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnuts materials. Part IV. Routine assesment of toxicity due to aflatoxin B₁. Analyst 90: 492.
79. COSTA, M.R.S., LEITÃO, M.F.F. e COSTA, S.I. 1973/1974. Estudo sobre o equilíbrio higroscópico, microflora predominante e formação de aflatoxina em flocos de soja. Col. ITAL 5: 95.
80. CUCULLU, A.F., LEE, L.S., MAYNE, R.Y. e GOLDBLATT, L.A. 1966. Determination of aflatoxins in individual peanuts and peanut sections. J. Am. Oil Chem. Soc. 43: 89.
81. DALEZIOS, J., WOGAN, G.N. e WEINREB, S.M. 1971. Aflatoxin P₁: A new aflatoxin metabolite in monkeys. Science 171:584.
82. DAVIS, N.D., DIENER, U.L. e ELDRIDGE, D.W. 1966. Production of aflatoxins B₁ and G₁ by Aspergillus flavus, in a semisynthetic medium. Appl. Microbiol. 14 (3): 378.
83. DAVIS, N.D., DIENER, U.L. 1967. Production of aflatoxin B₁ and G₁ in chemically defined medium. Mycopathol. Mycol. Appl. 31: 251.
84. DAVIS, N.D., DIENER, U.L. 1968. Growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus from various carbon sources. Appl. Microbiol. 16 (1): 158.

85. DAVIS, N.D., GUY, M.L. e DIENER, U.L. 1980. A fluorometric rapid screen method for aflatoxin in peanuts. J. Ass. Oil Chem. Soc. 109 (March).
86. DE IONGH, H., BEERTHUIS, R.K., VLES, R.O., BARRET, C.B. e ORD, W.O. 1962. Investigation of the factor in groundnut meal responsible for turkey X disease. Biochim. Biophys. Acta 65: 548.
87. DETROY, R.W. e HESSELTINE, C.W. 1968. Isolation and biological activity of a microbial conversion product of aflatoxin B₁. Nature 219: 967.
88. DETROY, R.W. e HESSELTINE, C.W. 1969. Net synthesis of ¹⁴C-labeled lipids and aflatoxins in resting cells of Aspergillus parasiticus. Dev. Ind. Microbiol. 10: 127.
89. DETROY, R.W. e HESSELTINE, C.W. 1970. Aflatoxicol: structure of a new transformation product of aflatoxin B₁. Can. J. Biochem. 48: 830.
90. DIENER, U.L., DAVIS, N.D., SALMON, W.D. e PRICKETT, C. O. 1963. Toxin-Producing Aspergillus isolated from domestic peanuts. Science 142: 1491.
91. DIENER, U.L. e DAVIS, N.D. 1966a. Aflatoxins serious problem in seeds feeds and food crops. Highlights of agricultural research Publ., Agricultural Expt. St. Auburn Univers. Auburn-Alabama 13 (3): 1p.

92. DIENER, U.L. e DAVIS, N.D. 1966b. Aflatoxin production by isolates of Aspergillus flavus. *Phytopathology* 56: 1390.
93. DIENER, U.L. e DAVIS, N.D. 1967. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by Aspergillus flavus in sterile peanuts *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44: 259.
94. DIENER, U.L. e DAVIS, N.D. 1968. Effect of environment on aflatoxin production in freshly dug peanuts. *Trop. Sci.* 10: 22.
95. DIENER, U.L. e DAVIS, N.D. 1969. Aflatoxin formation by Aspergillus flavus no "Aflatoxins" ed. Goldblat, Acad. Press, N.Y., London.
96. DONKERLOOT, J. A., HSIEH, D.P.H. e MATELES, R. I. 1968. Incorporation of precursors into aflatoxin B₁. *J. Amer. Chem. Soc.* 90: 5020.
97. DUTTON, M.F. e HEATHCOTE, J.G. 1966. Two new hydroxyaflatoxins. *Proc. Biochem. Soc.* 101: 21 p.
98. DUTTON, M.F. e HEATHCOTE, J.G. 1968. The structure, biochemical properties and origin of the aflatoxins B_{2a} and G_{2a}. *Chem. Ind.* 418 (March).
99. EDWARDS, C.S., RINTEL, T.D. e PARKER, C.M. 1975. Aflatoxicol as a possible prediction for species sensitivity to aflatoxins B₁. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* p. 133.

100. EIROA, M.N.U. e ARCKOLL, D.B. 1978. Investigaçãõ de aflatoxinas, patulina e esterigmatocistina em amostras de diversos tipos de farinhas. Bol. ITAL 57: 113.
101. EIROA, M.N.U. 1979. Micotoxinas e Micotoxicoses. Bol. ITAL 16 (4): 355.
102. ELDRIDGE, D.W. 1967. Personal communication citado por DIENER, U.L. e DAVIS, N.D., 1969. Aflatoxin formation by Aspergillus flavus no "Aflatoxin Scientific Background, Control and Implications" p. 13, ed. Goldblat, Academic Press, N. Y., London.
103. EPPLEY, R.M. 1968. Screening method for zearalenone, aflatoxin. and ochratoxin, J. Ass. Off. Anal. Chem. 51 (1): 74.
104. FARAH, Z., MARTINS, M.J.R. e BACHMANN, M.R. 1983. Removal of aflatoxin in raw unshelled peanut by a traditional salt boiling process practised in the North east of Brasil. Lebensm. Wiss. Technol. 16: 122.
105. FONSECA, H. 1968. Contribuiçãõ ao estudo da ocorrênciã de aflatoxina em tortas, farelos e farinhas de amendoim (Arachis hypogaea L.) no Estado de São Paulo. Anais ESALQ, XXV: 47.
106. FONSECA, H. e DEL NERY, H. 1970. Ocorrênciã de aflatoxina em pastas de amendoim (Arachis hypogaea L.). Anais ESALQ, XXVII: 181.

107. FONSECA, H. 1973a. Ocorrência de aflatoxina em farelos de a mendoim (Arachis hypogaea L.) na região noroeste do Estado de São Paulo. Anais ESALQ XXX: 387.
108. FONSECA, H. 1973b. Ocorrência de aflatoxina em farelos de a mendoim (Arachis hypogaea L.) na região de Paulista Nova do Estado de São Paulo. Anais ESALQ XXX: 403.
109. FONSECA, H. 1973c. Ocorrência de aflatoxina em farelos de a mendoim (Arachis hypogaea L.) na região sorocabana do Estado de São Paulo. Anais ESALQ XXX: 423.
110. FONSECA, H., MARTINELLI, A. F., DEL NERY, H. e RONCATTO, E. 1974. Espé de Aspergillus flavus produtoras de aflatoxinas na região a raraquarense, São Paulo. Anais ESALQ XXXI: 519.
111. FONSECA, H. 1975. Ocorrência de aflatoxina em farelos de a mendoim (Arachis hypogaea L.) na região araraquarense, do Estado de São Paulo. Anais ESALQ XXXII: 7
112. FONSECA, H., SAVY, A. F., SOAVE, J. e CANECCHIO, V. F. 1976a. Estudo do controle químico do Aspergillus flavus e produção de aflatoxinas no amendoim no campo. Anais ESALQ XXXIII: 337.
113. FONSECA, H. 1976b. Estudo da aflatoxina no amendoim da colheita à industrialização, na região de Matão, São Paulo. Anais ESALQ XXXIII: 365.
114. FONSECA, H. 1976c. Estudo da aflatoxina no amendoim da colheita à industrialização na região de Monte Alto, São Paulo. Anais ESALQ XXXIII: 375.

115. FONSECA, H. 1976d. Estudo da aflatoxina no amendoim da colheita à industrialização. na região de Santa Adélia, São Paulo. Anais ESALQ XXXIII: 385.
116. FONSECA, H. 1976e. Estudo da aflatoxina no amendoim da colheita à industrialização, na região de Fernandópolis, São Paulo. Anais ESALQ XXXIII: 395.
117. FRANCIS, O.J. Jr., LIPINSKI, L.J., GAUL, J.A. e CAMPBELL, A. D. 1982. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in peanut butter using a silica gel-packed flowcell for fluorescence detection. J. Ass. Off. Anal. Chem. 65 (3): 672.
118. FRANK, H.K. 1966. Aflatoxine in Lebensmitteln. Arch. Lebensmittelhyg. 17: 237.
119. FRANK, H.K. 1968. Diffusion of aflatoxin in foodstuffs. J. Food Sci. 33: 98.
120. FRANK. H.K. 1974. Aflatoxine - Bildungsbedingungen, Eigenschaften und bedeutung für die lebensmittelwirtschaft. B. Behr's. Verlag, Hamburg, 126p.
121. GALLOWAY, L.D. 1935. The moisture requirement of the mold fungi, with special referent to mildew in textiles. J. Textile Inst. Trans. 26: 123.
122. GARNER, C. 1974. Moulds bacteria and cancer. New Sci. 63: 325.

123. GARNER, R.C. 1975. Aflatoxin separation by high-pressure liquid chromatography. J. Chromatogr. 103: 186.
124. GOLDBLATT, L.A. 1969. "Aflatoxin: Scientific background, control and implication" p.4, ed. GOLDBLATT, Academic Press, N.Y., London.
125. GOPALAN, C., TULPULE, P.G. e KRUSHNEMURTHY, D. 1972. Induction of hepatic carcinoma with aflatoxin in rhesus monkey. Food and Cosmet. Toxicol. 10: 519.
126. GORELOVA, E.I. e LVOVA, L.S. 1980a. Ecology of mycotoxin production. No "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR" United Nations Environment Programme.
127. GORELOVA, E.I. e LVOVA, L.S. 1980b. Regularities of mycotoxins formation under natural conditions. No "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR" United Nations Environment Programme.
128. GORELOVA, E.I. e LVOVA, L.S. 1980c. Screening tests and multiple detection methods for mycotoxins in foodstuffs. No "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR" United Nations Environment Programme.
129. GORELOVA, E.I. e LVOVA, L.S. 1980d. Methods of detoxification of foodstuffs contaminated with aflatoxins no "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR" United Nations Environment Programme.

130. GRAY, F.A., FAW, W.F. e BOUTWELL, J.L. 1982. The 1977 Corn-aflatoxin epiphytotic in Alabama. *Plant Disease* 66: 221.
131. GUMBANN, M.R., WILLIAMS, S.N., BOOTH, A.N., VOHRA, P., ERNEST, R.A. e BETHARD, M. 1970. Aflatoxin susceptibility in various breeds of poultry. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 134: 683.
132. GUPTA, S.R., PRASANNA, H.R., VISWANATHAN, L. E VENKITASUBRAMANIAN, T.A. 1974. Carboxylic acids as carbon sources for aflatoxin production. *Experimentia*, 30 (11): 1244.
133. GUPTA, S.R. e VENKITASUBRAMANIN, T.A. 1975. Production of aflatoxin on soybeans. *Appl. Microbiol.* 29: 834.
134. HAGHIGHI, B., POHLAND, A. E., THORPE, C.W. e BARNETT, F. 1981. Development of a sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection of aflatoxin in pistachio nuts. *J. Chromatogr.* 206: 101.
135. HANNA, K.L. e CAMPBELL, T.C. 1968. Note on a rapid thin layer chromatographic method for the isolation of aflatoxin B₁. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 51 (6): 1197.
136. HANSEN, E. e JUNG, M. 1973. Control of aflatoxin in the food industry. *Pure Appl. Chem.* 35 (3): 239.
137. HARTLEY, R.D., NESBITT, B.F. e O'KELLY, J. 1963. Toxic metabolites of Aspergillus flavus. *Nature* 198: 1056.
138. HARWIG, J. e SCOTT, P.M. 1971. Brine shrimp (Artemia salina) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl. Microbiol.* 21 (6): 1011.

139. HAYES, A.W. 1978. Biological activities of mycotoxins. Mycopathologia 65: 29.
140. HEATHCOTE, J.G. e DUTTON, M.F. 1969. New metabolites of Aspergillus flavus. Tetrahedron 25: 1497.
141. HESSELTINE, C.W., SHOTWELL, O.L., ELLIS, J.J. e STUBBLEFIELD, R.D. 1966. Aflatoxin formation by Aspergillus flavus. Bact. Rev. 30 (4): 795.
142. HESSELTINE, C.W., SHOTWELL, O.L., SMITH, M., ELLIS, J.J., VAN DEGRAFT, E. e SHANNON, G. 1968. Production of various aflatoxins by strains of the Aspergillus flavus series. No Proceedings of the First U.S.-Japan conference on toxic Micro-organisms. U.S. gov. Printing Office Washington, DC 1970, p 202.
143. HESSELTINE, C.W., SORENSON, W.G. e SMITH, M. 1970. Taxonomic studies of the aflatoxin-producing strains in the Aspergillus flavus group. Mycologia 62: 123.
144. HESSELTINE, C.W. e BOTHAST, R.J. 1977. Mold development in ears of corn from tasseling to harvest. Mycologia 69: 328.
145. HIGGINSON, J. e OETTLÉ, A.G. 1960. Cancer incidence in Bantu and "Cape-Colored" races of South Africa. Report of a Cancer Survey in the Transvaal (1953-55). J. Natl. Cancer Inst. 24: 589.
146. HIGGINSON, J. 1963. The geographical pathology of primary liver cancer. Cancer Res. 23: 1624.

147. HODGES, F.A., ZUST, J.R., SMITH, H.R., NELSON, A. A., ARM BRECHT, B.H. e CAMPBELL, A.D. 1964. Mycotoxins: aflatoxin isolated from Penicillium puberulum. Science 145: 1439.
148. HOLADAY, C.E. 1968. Rapid method for detecting aflatoxins in peanuts. J. Am. Oil Chem. Soc. 45: 680.
149. HOLADAY, C.E. e BARNES, P.C. Jr. 1973. Sensitive procedure for aflatoxin detection in peanuts, peanut butter, peanut meal, and other commodities. J. Agric. Food Chem. 21: 650.
150. HOLADAY, C.E. 1981. Minicolumn chromatography: State of the art. Apresentado no Walter A. Pons, Jr. Memorial Symposium on Mycotoxins: J. Am. Oil Chem. Soc. 931A.
151. HOLZAPFEL, C.W., STEYN, P.S. e PURCHASE, I.F.H. 1966. Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂. Tetrahedron Letters 25: 2799.
152. HORWITZ, W. e ALBERT, R. 1982. The reliability of aflatoxin assays. Association of Food and Drug Officials, Quarterly Bull. 46:(1): 14.
153. HOWELL, M.V. e TAYLOR, P.W. 1981. Determination of aflatoxin, ochratoxin A, and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography. J. Am. Off. Chem. Soc. 64 (6): 1356.
154. HSIEH, D.P.H., LIN, M.T. e YAO, R.C. 1973. Conversion of sterigmatocystin to aflatoxin B₁ by Aspergillus parasiticus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52 (3): 992.

155. HUNT, W.H., SEMPER, R.C. e LIEBE, E.B. 1976. Incidence of aflatoxin in corn and a field method for aflatoxin analysis. *Cereal Chem.* 53: 227.
156. IAL. 1976. Aflatoxins. no "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz". I, cap.3, p. 323, São Paulo.
157. JARVIS, B. 1971. Factors affecting the production of mycotoxins. *J. Appl. Bact.* 34 (1): 199.
158. JAYARAMAN, A., HERBST, E.J. e IKAWA, M. 1968. The bioassay of aflatoxin and related substances with Bacillus megaterium spores and chick embryos. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 10: 700.
159. JOFFE, A.Z. e LISKER, N. 1969. Effects of light, temperature and pH value on aflatoxin production in vitro. *Appl. Microbiol.* 18 (3): 517.
160. KARKI, T.B., BOTHAST, R.J. e STUBBLEFIELD, R.D. 1979. Note on microbiological and aflatoxin analysis of cereal grains from the Tarai plain of Southern Nepal. *Cereal Chem.* 56 (1):41.
161. KNUTTI, R., BALSIGER, Ch. e SUTTER, K. 1979. Routine Application of HPLC for quantification of aflatoxins in whole peanut kernels. *Chromatographia* 12 (6): 349.
162. KRAVCHENKO, L.V. 1980a. Aflatoxin: occurrence and evaluation of economic losses due to contamination. no "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR" - United Nations Environment Programme.

163. KRAVCHENKO, L.V. 1980b. Methods of monitoring foods for contamination by mycotoxins. no "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR" - United Nations Environment Programme.
164. KRAYBILL, H.F. e SHIMKIN, M.B. 1964. Carcinogenesis related to foods contaminated by processing and fungal metabolites. Adv. Cancer Res. 8: 191.
165. KRISHNAMACHARI, K.A.V.R., BHAT, V.R., NAGARAJAN, V., TILAK, T.B.G. e TULPULE, P.G. 1977. The problem of aflatoxin human disease in parts of India-Epidemiological and ecological aspects. Ann. Nutr. Alim. 31: 991.
166. KROGH, P. e HALD, B. 1969. Occurrence of aflatoxin in imported groundnut products. Nord. Vet. Med. 21: 398.
167. KULIK, M.M. e HOLADAY, C.E. 1966. Aflatoxin: A metabolic product of several fungi. Mycopathologia Mycologia Applicata. 30: 137.
168. KWOLEK, W.F. e SHOTWELL, O.L. 1979. Aflatoxin in white corn under loan. V. aflatoxin prediction from weigh percent of bright greenish-yellow fluorescent particles. Cereal Chem. 56 (4): 342.
169. LANCASTER, M.C., JENKINS, F.P. e PHILIP, J.McL. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature 192: 1095.

170. LANDERS, K.E., DAVIS, N.D. e DIENER, U.L. 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by Aspergillus flavus in peanuts. *Phytopathology*. 57: 1086.
171. LANG, C.L. WAMHOFF, H. e KORTE, F. 1967. Acyl-lacton-unlagi rung, XII synthese von 2-oxo-hexahydro-furo (2,3-6) furanin. *Chem. Ber. Weisonhein*, 100: 2312.
172. LA PRADE, J.C. e MANWILLER, A. 1977. Relation of insect damage, vector, and hybrid reaction to aflatoxin B₁ recovery from field corn. *Phytopathology* 67: 544.
173. LE BRETON, E., FRAYSSINET, C. e BOY, J. 1962. Sur l'appari- tion d'hépatomes "spontanés" chez le rat Wistar. Rôle de la toxine de l'Aspergillus flavus. Interêt en pathologie humaine et cancérologie expérimentale. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 225: 784.
174. LEE, E.G.H., TOWNSLEY, P.M. e WALDEN, C.C. 1966. Effect of bivalent metals on the production of aflatoxins in submerged cultures. *J. Food Sci.* 31 (3): 432.
175. LEE, S.L., CUCULLU, A.F. e GOLDBLATT, L.A. 1968. Appearance and aflatoxin content of raw and dry roasted peanut kernels. *Food Technol.* 22: 1131.
176. LEE, K.Y., POOLE, C.F. e ZIATKIS, A. 1980. Simultaneous multi-mycotoxin determination by high performance thin layer chromatography. *Anal. Chem.* 52: 837.

177. LEE, L.S. e GOLDBLATT, L.A. 1981. Contributions of Walter Pons Jr., to development of methodology for mycotoxins. J. Am. Oil Chem. Soc. 928A.
178. LENOVOICH, L.M. 1981. Effect of caffeine of aflatoxin production on cocoa beans. J. Food Sci. 46: 655.
179. LILLEHOJ, E.B., CIEGLER, A. e HALL, H.H. 1967. Aflatoxin B₁ uptake by Flavobacterium aurantiacum and resulting toxic effects. J. Bacteriol. 93: 464.
180. LILLEHOJ, E.B., CIEGLER, A. 1969. Biological activity of aflatoxin B_{2a}. Appl. Microbiol. 17: 516.
181. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, K.F., SHANNON, G.M., SHOTWELL, O.L. e HESSELTINE, C.W. 1975a. Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest. I - A limited survey in the southeastern U.S. Cereal Chem. 52: 603.
182. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., FENELL, D.I. e MILBURN, M.S. 1975b. Aflatoxin incidence and association with bright greenish-yellow fluorescence and insect damage in a limited survey of freshly harvested high-moisture corn. Cereal Chem. 52: 403.
183. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., PETERSON, R.E., SHOTWELL, O.L. e HESSELTINE, C.W. 1976. Aflatoxin contamination, fluorescence and insect damage in corn infected with Aspergillus flavus before harvest. Cereal Chem. 53: 505.
184. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., MANWILLER, A., DURANT, J.A., LA PRADE, J.C., HORNER, E.S., REID, J. e ZUBER, M.S. 1976b. Aflatoxin production in several corn hybrids grown in South Carolina and Florida. Crop. Sci. 16: 483.

185. LILLEHOJ, E.B. e HESSELTINE, C.W. 1977. Aflatoxin control during plant growth and harvest of corn. No "Mycotoxin in Human and Animal Health p. 107, ed. Rodricks, Hesseltine and Meheman, Pathotox. Publishers Inc., Illinois.
186. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., ZUBER, M.S. CALVERT, O.H., HORNER, E.S., WIDSTROM, N.W., GUTHRIE, W.D., SCOTT, G.E., THOMPSON, D.L. FINDLEY, W.R. e BOCKHOLT, A.J. 1978. Aflatoxin contamination of field corn: evaluation of regional test plots for early detection. Cereal Chem. 55: 1007.
187. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., HORNER, E.S., WIDSTROM, N.W., JOSEPHSON, L.M., FRANZ, A.O. e CATALANO, E.A. 1980. Aflatoxin contamination of pre-harvest corn: role of Aspergillus flavus inoculum and insect damage. Cereal Chem. 57 (4): 255.
188. LILLY, L.J. 1965. Induction of chromosome aberrations by aflatoxin. Nature 207: 433.
189. LIMA, O.A. 1983. Industrialização do milho no Programa de Adequação, Beneficiamento e Industrialização de Milho. vol. I, p.18. M.I.C. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo.
190. LOOSMORE, R.M. e HARDING, J.D.J. 1961. A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. Vet. Rec. 73 (49): 1362.
191. LOOSMORE, R.M. e MARKSON, L.M. 1961. Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. Vet. Rec. 73 (33): 813.

192. MADHAVAN, T.V. e GOPALAN, C. 1965a. Effect of dietary protein on aflatoxin liver injury in weanling rats. Arch. Path. 80: 123.
193. MADHAVAN, T.V., RAO, K.S. e TULPULE, P.G. 1965b. Effect of dietary protein on aflatoxin levels on susceptibility of monkeys to aflatoxins liver injury. Indian J. Med. Res. 53: 984.
194. MADHAVAN, T.V., TULPULE, P.G. e GOPALAN, C. 1965c. Aflatoxin-induced hepatic fibrosis in rhesus monkeys. Arch. Path. 79: 466.
195. MADHAVAN, T.V. 1967. Effect of prednisolone on liver damage in rats induced by aflatoxin. J. Path. Bact. 93: 443.
196. MAGOON, K.K., VISWANATHAN, L. e VENKITASUBRAMANIAN, T.A. 1970. The chemistry of aflatoxins. J. Sci. Ind. Res. 29: 8.
197. MAGOON, K.K., GUPTA, S.K. e VENKITASUBRAMANIAN, T.A. 1977. Biosynthesis of aflatoxins. Bacteriol. Rev. 41 (4): 822.
198. MARSH, P.B., SIMPSON, M.E., FERRETTI, R.J., MERROL, G.V., DONOSO, J., CRAIG, G.O., TRUCKSESS, M.W. e WORK, P.S. 1969. Mechanism of formation of a fluorescence in cotton fiber associated with aflatoxins in the seeds at harvest. Agric. Food Chem. 17: 468.
199. MARSH, P.B., SIMPSON, M.E. e TRUCKSESS, M.W. 1975. Effects of trace metals on the production of aflatoxins by Aspergillus parasiticus. Appl. Microbiol. 30 (1): 53.

200. MASRI, M.S., BOOTH, A.N. e HSIEH, D.P.H. 1974. Comparative metabolic conversion of aflatoxin B₁ to M₁ and Q₁ by monkey, rat and chicken liver. Life Sci. 15: 203.
201. MATELES, R.I. e ADYE, J.C. 1965. Production of aflatoxins in submerged culture. Appl. Microbiol. 13: 208.
202. MATHEW, C.P. 1970. Chemistry of aflatoxins. Chem. Ind. 913, (July).
203. McLEAN, A.E.M. e McLEAN, E.K. 1966. Protein depletion and toxic liver injury due to carbon tetrachloride and aflatoxin. Biochem. Proc. 26: 16.
204. McMILLIAN, W.W., WILSON, D.M., WIDSTROM, N.W. e GUELDNER, R. C. 1980. Incidence and level of aflatoxin in preharvest corn (Zea Mays) in South Georgia in 1978. Cereal Chem. 57 (2): 83.
205. MENEZES, T.J.S., TANGO, J.S., COELHO, F.A.S. e TEIXEIRA, C.G. 1965/1966. Ocorrência do Aspergillus flavus e da aflatoxina em sementes, tortas e farelos de amendoim. Col. ITAL I:559.
206. MIXON, A.C. e ROGERS, K.M. 1973. Peanuts resistant to seed invasion by Aspergillus flavus. Oléagineux 28 (2): 85.
207. MILNE, G., BIOLLAZ, M. e BÜCHI, G. 1968. Biosynthesis of aflatoxins. Proceedings of the First US - Japan Conference on Toxic Micro-organisms, U.S. Gov. Printing Office, Washington, D.C. pp. 121.

208. MONGEAU, J.S., TRUSCOTT, R.B., FERGUNSON, A.E. e CONNELL, M.
C.1959. Virus hepatitis in turkeys. Av. Dis. 3: 388.
209. MONTES, A.L. 1977. "Microbiologia de los alimentos - Curso
teórico y practico". Vol. I, p. 254, ed. Resenha Universi
tária. São Paulo.
210. NABNEY, G. e NESBITT, B.F. 1964. Determination of the afla-
toxins. Nature 203: 862.
211. NABNEY, G. e NESBITT, B.F. 1965. A spectrophotometric method
for determining the aflatoxins. Analyst 90: 155.
212. NAGARAJAN, V. e BHAT, R.V. 1972. Factor responsible for
varietal differences in aflatoxin production in maize.
J. Agr. Food Chem. 20: 911.
213. NAKAMURA, H. e YOKOYA, F. 1967/1968. Produção de aflatoxina
por espécies de Aspergillus do Brasil (Estado de São Pau
lo), dos Estados Unidos e da Inglaterra. Col. ITAL 2: 47.
214. NARTOWICZ, V.B., BUCHANAN, R.L. e SEGALL, S. 1979. Aflatoxin
production in regular and decaffeinated coffee beans. J.
Food Sci. 44: 446.
215. NATH, B. e PRAPHASRI, N. 1963. Proc. Japan. Med. Congr. III:
376 citado no Wogan, G.N. 1968. Aflatoxin risks and control
measures. Fed. Proc. 27 (3): 932.

216. NESBITT, B.F., O'KELLY, J., SARGEANT, K. e SHERIDAN, A. 1962.
Toxic metabolites of Aspergillus flavus. Nature 195: 1062.
217. NILSON, B.J. e WILSON, C.H. 1962. Extraction and preliminary
characterization of a hepatotoxic substance from cultures
of Penicillium rubrum. J. Bact. 84: 283.
218. ONG, T.M. 1975. Aflatoxins mutagenesis. Mutat. Res. 32: 35.
219. PANASSENKO, V.T. 1944. Ecology of the moulds. Microbiology
(USSR) 13, 159. (Rev. Appl. Mycol. 24: 383).
220. PANLAKS, T. e SCOTT, P.M. 1977. Sensitive silica gel-packed
flow all for fluorometric detection of aflatoxins by high
pressure liquid chromatography. J. Am. Off. Chem. 60 (3): 583.
221. PATTERSON, D.S.P. 1973. Metabolism as a factor in determining
the toxic action of the aflatoxins in differente animal
species. Food Cosmet. Toxicol. 11: 287.
222. PAUL, P.S., JOHNSON, D.W., MIROCHA, C.J., SOPER, F.F., THOEN,
C.O., MUSCOPLAT, C.C. e WEBER, A.F. 1977. In vitro stimu
lation of bovine peripheral blood lymphocytes: Suppresion
of phytomitogen and specific antigen lymphocyte responses
by aflatoin. Am. J. Vet Res. 38 (12): 2033.
223. PEERS, F.G. e LINSELL, C.A. 1973. Dietary aflatoxins and
liver cancer - a population based study in Kenya. Br. J.
Cancer 27: 473.

224. PEERS, F.G., GILMAN, G.A. e LINSELL, C.A. 1976. Dietary aflatoxins and human liver cancer: A study in Swaziland. Int. J. Cancer 17: 167.
225. PEERS, F.G. e LINSELL, C.A. 1977. Dietary aflatoxin and human primary liver cancer. Ann. Nutr. Alim. 31: 1005.
226. PIER, A.C. e KEDDLESTON, K.L. 1970. The effect of aflatoxin on immunity in turkeys. I - Impairment of actively acquired resistance to bacterial challenge. Av. Dis. 14 (4): 797.
227. PIER, A.C. e KEDDLESTON, K.L., CYSEWSKI, S.J. e PATTERSON, J.M. 1972. Effects of aflatoxin on immunity in turkeys. II Reversal of impaired resistance to bacterial infection by passive transfer of plasma. Av. Dis. 16 (2):381.
228. PIER, A.C. 1973. Effects of aflatoxin on immunity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163 (11):1268.
229. PLATONOW, N. 1964. Effect of prolonged feeding of toxin groundnut meal in mice. Vet. Rec. 76 (2): 589.
230. PMC - Micotoxinas. 1982. Avaliação do Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas. Apresentado no II Encontro Nacional de Micotoxinas, São Paulo.
231. POHLAND, A.E., CUSHMAC, M.E. e ANDRELLOS, P.J. 1968. Aflatoxin B₁ hemiacetal. J. Ass. Off. Anal. Chem. 51: 907

232. PONS, W.A. Jr. 1968. Fluorodensitometric measurements of aflatoxins on thin-layer chromatographic plates. J. Ass. Off. Anal. Chem. 51 (4): 913.
233. PONS, W.A. Jr., CUCULLU, A. F., FRANZ, A.O. Jr., LEE, L.S. e GOLDBLATT, L.A. 1973. Rapid determination of aflatoxin contamination in agricultural products. J. Ass. Off. Anal. Chem. 53 (4): 803.
234. PONS, W.A. Jr. 1975. Resolution of aflatoxins B₁, B₂, G₁ e G₂ by high-pressure liquid chromatography. J. Ass. Off. Anal. Chem. 59 (1): 101.
235. PONS, W.A. Jr. e FRANZ, A.O. Jr. 1977. High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. J. Ass. Off. Anal. Chem. 60 (1): 89.
236. PONS, W.A. Jr. FRANZ, A.O. Jr. 1978. HPLC determination of aflatoxins in peanut products. J. Ass. Off. Anal. Chem 61(4): 793.
237. POZDNJAKOJ, A.L. 1980. Morphology of acute and chronic intoxications by aflatoxins. No "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR" - United Nations Environment Programme.
238. PREGNOLATO, W. e SABINO, M. 1969/1970. Pesquisa e dosagem da aflatoxina em amendoim e derivados e em outros cereais. Rev. Inst. Adolfo Lutz 29/30: 65.
239. PRZYBYLSKI, W. 1975. Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates. J. Ass. Off. Chem. 58: 163.

240. PURCHASE, I.F.H. 1967. Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old ducklings. Food Cosmet. Toxicol. 5: 339.
241. PURCHASE, I.F.H. 1972. Aflatoxin residues in food of animal origin. Food Cosmet. Toxicol. 10: 531.
242. PURCHIO, A. 1970. Pesquisa de aflatoxina B₁ e substâncias fluorescentes similares em farinha de trigo. Rev. Microbiol. 1 (1): 33.
243. RABIE, C.J., SMALLEY, R.B. 1965. Influence of temperature on the production of aflatoxin by Aspergillus flavus. Apresentado no Symp. Mycotoxins Foodstuffs - Agr. Aspects, Pretoria, South Africa pp. 18.
244. RAIMO, H.F., CORREA, R. e ANDRADE, B.M. 1962. Ação tóxica do farelo de amendoim produzido em São Paulo para aves e outros animais. Bol. Ind. Anim. 20: 361.
245. RAMBO, G.R., TUIITE, J. e ZACHARIAH, G.L. 1975. Fluorescence associated with corn infected with Aspergillus flavus and A. parasiticus in storage. Cereal Chem. 52: 757.
246. RAO, K.S. e TULPULÉ, P.G. 1967. Varietal differences of groundnuts in the production of aflatoxin. Nature 214: 738.
247. ROBERTS, B.A., GLAUCY, W.M. e PATTERSON, D.S.P. 1981. Rapid economical method for determination of aflatoxin and ochratoxin in animal feedstuffs. J. Ass. Off. Anal. Chem. 64 (4): 961.

248. ROBERTSON, J.A. TEUNISSON, D.J. e BOUDREAU, G.J. 1970. Isolation and structure of a biologically reduced aflatoxin B₁. J. Agr. Food Chem. 18 (6): 1090.
249. ROMER, T.R. 1975. Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. J. Ass. Off. Anal. Chem. 58 (3): 500.
250. ROMER, T.R. e CAMPBELL, H.D. 1976. Collaborative study of a screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural products. J. Ass. Off. Chem. 59 (1): 110.
251. ROMER, T.R., GHOURI, N. e BOLING, T.M. 1979. Minicolum screening methods for detecting aflatoxin: State of the Art. J. Ass. Off. Anal. Chem. 56: 795.
252. SABINO, M. 1980. Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. Rev. Inst. Adolfo Lutz 40 (2): 153.
253. SABINO, M., INOMATA, E.I. e LAMARDO, L.C.A. 1982. Variações dos níveis de aflatoxina B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 42 (1/2): 39.

254. SALHAB, A.S. e HSIIEH, D.P.H. 1975. Aflatoxicol H₁: a major metabolite of aflatoxin B₁ produced by human and rhesus monkey livers in vitro. Res. Commun.Chem. Path. Pharmacol. 10 (3): 419.
255. SALMON, W.D. e NEWBERNE, P.M. 1963. Occurrence of hepatomas in rats fed diets containing peanut meal as a major source of protein. Cancer Res. 23: 571.
256. SANDERS, T.H., DAVIS, N.D. e DIENER, U.L. 1968. Effect of carbon dioxide, temperature and relative humidity on production of aflatoxin in peanuts. J. Am. Oil Chem. Soc. 45: 683.
257. SARGEANT, K., SHERIDAN, A., O'KELLY, J. e CARNAGHAN, R.B.A. 1961a. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature 192: 1096.
258. SARGEANT, K., O'KELLY, J., CARNAGHAN, R.B.A. e ALLCROFT, R. 1961b. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. Vet. Rec. 73: 1219.
259. SCHINDLER, A.F., PALMER, J.G. e EISENBERG, W.V. 1967. Aflatoxin production by Aspergillus flavus as related to various temperature. Appl. Microbiol. 15 (5): 1006.
260. SCHINDLER, A.F. e EISENBERG, W.V. 1968. Growth and production of aflatoxins by Aspergillus flavus on red pepper (Capsicum frutescens L.). J.Ass. Off. Anal. Chem. 51: 911.

261. SCHROEDER, H.W. e ASHWORTH, L.J. Jr. 1965. Aflatoxin in spanish peanuts in relation to pod and kernel condition. Physiopath. 55: 464.
262. SCHROEDER, H.W. e ASHWORTH, L.J. Jr. 1966a. Aflatoxins: Some factors affecting production and location of toxins in Aspergillus flavus-oryzae. J. Stored Prod. Res. 1: 267.
263. SCHROEDER, H.W. 1966. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in Aspergillus parasiticus. Appl. Microbiol. 14: 381.
264. SCHROEDER, H.W. e HEIN, H. Jr. 1967. Aflatoxins: Production of the toxins in vitro in relation to temperature. Appl. Microbiol. 15 (2): 441.
265. SCHROEDER, H.W. e HEIN, H. Jr. 1968. Effect of diurnal temperature cycles on the production of aflatoxin. Appl. Microbiol. 16: 988.
266. SCHROEDER, H.W. e VERRET, M.J. 1969. Production of aflatoxin by Aspergillus wentii Wehmer. Can. J. Microbiol. 15: 895.
267. SCHROEDER, H.W. e KELTON, W.H. 1975. Production of sterigmatocystin by some species of the genus Aspergillus and its toxicity to chicken embryos. Appl. Microbiol. 30: 589.
268. SCHULLER, P.L., OCKHUIZEN, T., WERRINGLOER, J. e MARQUARDT, P. 1967. Aflatoxin B₁ und Histamin in Wein. Arzneim. Forsch. 17: 888.

269. SCOTT, P.M., VAN VELBEEK, W. e FORGACS, J. 1967. Formation of aflatoxin by Aspergillus ostianus Wehmer. Appl. Microbiol. 15: 945.
270. SCOTT, P.M. 1968. Note on analysis of aflatoxin in green coffee. J. Ass. Off. Anal. Chem. 51: 609.
271. SGARBIERI, V.C. SILVA, W.J., ANTUNES, P.L. e AMAYA-F. J. 1977. Chemical composition and nutritional properties of sugary-1/opaque-2 (su/0₂) variety of maize (Zea mays L.). J. Agr. Food Chem. 25: 1098.
272. SGARBIERI, V.C., CONTRERAS, E., AMAYA, F.J., DA SILVA, W.J. e REYES, F.G.R. 1982. Composição e valor nutritivo de quatro cultivares de milho (Zea mays) em dois estágios de maturação. Cienc. Tecnol. Aliment. 2 (2): 180.
273. SHANK, R.C. 1981. "Micotoxins and N-Nitroso compounds: Environmental risks", vol. I, p. 285. SHANK (ed), CRC Press, Inc. Boca rato, Florida.
274. SHANTHA, I., SREENIVASAMURTHY, V. e PARPIA, H. A. B. 1970. Urinary metabolites of C¹⁴ aflatoxin in some laboratory animal. J. Food Sci. Technol. 7 (3): 137.
275. SHATERNIKOV, V.A. e MAROKKO, I.N. 1980. Aflatoxins and Immunity. No "Food Contamination with Special Reference of Mycotoxin Training Course in USSR" - United Nations Environment Programme.

276. SHEPHERD, E.C., PHILLIPS, T.D., HEIDELBAUCH, N.D. e HAYES, A.W. 1982. High pressure liquid chromatographic determinations of aflatoxins by using radial compression separation. J. Ass. Off. Anal. Chem. 65 (3): 665.
277. SHIH, C.N. e MARTH, E.H. 1973. Aflatoxin produced by Aspergillus parasiticus when incubated in the presence of different gases. J. Milk Food Technol. 36 (8): 421.
278. SHOTWELL, O.L., GOULDEN, M.L. e HESSELTINE, C.W. 1972. Aflatoxin contamination: Association with foreign material and characteristic fluorescence in damaged corn kernels. Cereal Chem. 49: 458.
279. SHOTWELL, O.L. e STUBBLEFIELD, R.D. 1973. Collaborative study of three screening methods for aflatoxin in corn. J. Ass. Off. Anal. Soc. 56 (4): 808.
280. SHOTWELL, O.L., KWOLEK, W.F., GOULDEN, M.L., JACKSON, L. K. e HESSELTINE, C.W. 1975a. Aflatoxin occurrence in some white corn under loan. 1971. I. Incidence and level. Cereal Chem. 52: 373.
281. SHOTWELL, O.L., GOULDEN, M.L., JEPSON, L.K., KWOLEK, W.F. e HESSELTINE, C.W. 1975b. Aflatoxin occurrence in some white corn under loan. 1971. III. Association with bright greenish-yellow fluorescence in corn. Cereal Chem. 52: 670.
282. SILLER, W.G. e OSTLER, D.C. 1961. The histopathology of an intero-hepatic syndrome of turkey poults. Vet. Rec. 73 (7): 134.

283. SILVA, W.J., TEIXEIRA, J.P.F., ARRUDA, P. e LOVATO, M. B. 1978. Nutrimaiz a tropical sweet maize cultivar of high nutritional value. *Maydica*, XXIII: 129.
284. SILVA, W.J. 1984. Comunicação Pessoal.
285. SINNHUBER, R.O., WALES, J.H., ENGBRECHT, R.H., AMEND, D.F., KRAY, W.D., AYRES, J.L. e ASHTON, W.F. 1965. Aflatoxins in cottonseed meal and hepatoma in rainbow trout. *Fed. Proc.* 24: 627abs.
286. SINNHUBER, R.O., LEE, D.J., WALES, J.H., LANDERS, M. K. e KEYL, A.C. 1970. Aflatoxin M₁ a potent liver carcinogen for rainbow trout. *Fed. Proc.* 29: 568 abs.
287. SMITH, R.H. e MC KERNAN, W. 1962. Hepatotoxic action of chromatographically separated fractions of Aspergillus flavus extracts. *Nature* 195: 1301.
288. SMITH, J.W. e HAMILTON, P.B. 1970. Aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Sci.* 49: 207.
289. SMITH, J.W., HILL, C.H. e HAMILTON, P.B. 1971. The effect of dietary modifications on aflatoxicosis in the broiler chickens. *Poultry Sci.* 50 (3): 768.
290. SNOEYENBOS, G.H., BASCH, H.I. e SEVOIAN, M. 1959. *Av. Dis.* 3: 377, citado no STEVENS, A.J., SAUNDERS, C.N. SPENCE, J.B. e NEWNHAN, A.G. 1960. Investigations into "disease" of turkey poults. *Vet. Rec.* 72: 627.

291. SORENSON, W.C., HESSELTINE, C.D. e SHOTWELL, D.L. 1967. Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by Aspergillus flavus. Mycopath. Mycol. 33: 49.
292. SOUZA, V.L.F., AMAYA-FARFÁN, J., POMPEU, A.S. e YOUNG, C.T. 1978. A correlation between the amount of soluble amino compounds in the testae of peanuts and colony development of inoculated Aspergillus flavus. APREA Proc. 10 (1): 66.
293. SPORN, M.B., DINGMAN, C.W., PHELPS, H.L. e WOGAN, G.N. 1966. Aflatoxin B₁: Binding to DNA in vitro and alterations of RNA metabolism in vivo. Sci. 151: 1539.
294. STEVENS, A.J., SAUNDERS, C.N., SPENCE, J.B. e NEWMHAM, A.G. 1960. Investigations into "disease" of turkey poults. Vet. Tec. 72 (31): 627.
295. STOLOFF, L., CAMPBELL, A.D., BECKWITH, A.C., NESHEIM, J.S., WINBUSH, J.S. Jr. e FORDHAN, O.M. Jr. 1966. Sample preparation for aflatoxin assay: The nature of the problem and approaches to a solution. J. Am. Oil Chem. Soc. 46: 678.
296. STOLOFF, L. 1970. Report on mycotoxins. J. Ass. Off. Anal. Chem. 53: 330.
297. STOLOFF, L., NESHEIM, S., YIN, L., RODRICKS, J.V., STACK, M. e CAMPBELL, A.D. 1971. A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. J. Ass. Off. Anal. Chem. 54 (1): 91.
298. STUBBLEFIELD, R.E. e SHOTWELL, O.L. 1977. Reverse phase analytical and preparative high pressure liquid chromatography of aflatoxins. J. Ass. Off. Anal. Chem. 60 (4): 784.

299. SUZUKI, T., FUGIMOTO, Y., HOSHINO, Y. e TANAKA, A. 1974. Simultaneous determination of patulin and penicilic acid in by gas chromatographic method. Agr. Biol. Chem. 38 (6): 1259.
300. TABER, R.A. e SCHROEDER, H.W. 1967. Aflatoxin-producing potential of isolates of the Aspergillus flavus-oryzae group from peanuts (*Arachis hypogaea*). Appl. Microbiol. 15: 140.
301. TAKAHASHI, D.M. 1977. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analytical system for aflatoxin in wines with fluorescence detection. J. Chromatogr. 131: 147.
302. TANGO, J.S., MENEZES, T.J.B. e TEIXEIRA, C.G. 1965/1966. Levantamento da ocorrência de aflatoxina em sementes de amendoim das safras das águas e da seca. Col. ITAL I: 1.
303. TANGO, J.S., NAKAMURA, I.M., LEITÃO, M.F.F. e JORDÃO, B.A. 1971/1972a. Influência da umidade relativa do ar na estabilidade do amendoim em grão em armazenamento. Col. ITAL 4: 71.
304. TANGO, J.S. e TELA, R. 1971/1972b. Controle de Aspergillus flavus em amendoim durante o período de secagem. Col. ITAL 4: 83.
305. TANGO, J.S. 1974. Aflatoxina. Bol. ITAL 37: 37.
306. TEUNISSON, D.J. e ROBERTSON, J.A. 1967. Degradation of pure aflatoxin by *tetrahymena pyriformis*. Appl. Microbiol. 15: 1099.
307. THAXTON, P. e HAMILTON, P.B. 1971. Immunosuppression in broilers by aflatoxin. Poultry Sci. 50: 1636.

308. THAXTON, J.P., TUNG, H.T. e HAMILTON, P.B. 1974. Immunosuppression in chickens by aflatoxin. *Poult. Sci.* 53: 721.
309. THOMAS, F., EPPLEY, F.R.M. e TRUKSES, S.M.W. 1975. Rapid screening method for aflatoxins and zearalenone in corn. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 58 (1): 114.
310. TOSELLO, G.A. 1978. Milhos especiais e seu valor nutritivo. no "Melhoramento e produção de milho no Brasil", p. 310, ed. Paterniani. Piracicaba/ESALQ, Marprint, São Paulo.
311. TRENK, H.L. e HARTMAN, P.A. 1970. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Appl. Microbiol.* 19 (5): 781.
312. TUIITE, J. e SCOTT, D.H. 1978. Rapid screening method for aflatoxin in corn. *Indiana Coop. Serv. Bull.* BP5, 22.
313. TUTELYAN, V.A. 1980a. Metabolism of micotoxins. No "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in USSR" - United Nations Environment Programme.
314. TUTELYAN, V.A. 1980b. Mechanisms of action of mycotoxins. No "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR" - United Nations Environment Programme.
315. VANDEGRAFT, E.E., HESSELTINE, C.W. e SHOTWELL, O. L. 1975. Grain preservatives: Effects on aflatoxin and ochratoxin production. *Cereal Chem.* 52: 79.

316. VAN DER LINDE, J.A., FRENS, A.M., VAN ESCH, G.J. 1965. Experiments with cows fed groundnut meal containing aflatoxin. No "Mycotoxins in foodstuffs" p. 247, ed. Wogan, G.N., Cambridge, M.I.T. Press.
317. VAN DER ZIJDEN, A.S.M., KOELENSMID, W.A.A.B., BOLDINGH, J., BARRETT, C.B., ORD, W.O., PHILP, J. 1962. Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey X disease. Nature 195: 1060.
318. VAN DORP, D.A., VAN DER ZIJDEN, A.S.M. BERTHUIS, R.K., SPAREBOOM, S., ORD, W.O., DE JONG, K. e KEUNING, P. 1963. Dihydro-aflatoxin B, a metabolite of Aspergillus flavus. Remarks on the structure of aflatoxin B. Rec. Trav. Pays-Bas Belg. 82: 587.
319. VAN WARMELO, K.T., VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A. e MILNE, J.A. 1968. The production of aflatoxins in natural infected high quality maize. Tech. Commun. n° 71. Dept. Agr. Tech. Serv. Pretoria South Africa, 5 p.
320. VELASCO, J. 1972. Detection of aflatoxin using small columns of florisil. J. Am. Oil Chem. Soc. 49: 141.
321. VELASCO, J. e WHITTEN, M.E. 1973. Evaluation of florisil tubes in detection of aflatoxin. J. Am. Oil Chem. Soc. 50:120.
322. VELASCO, J. 1975. Fluorometric measurement of aflatoxin absorbed on florisil in minicolumn. J. Ass. Off. Anal. Chem. 58 (4): 757.

323. VERRET, M.J., MARLISE, J.P. e McLAUGHLIN, J. 1974. Use of the chickens embryo in the assay of aflatoxin toxicity. J. Ass. Off. Agric. Chem. 47: 1103.
324. VESSELINOVITCH, S.D., MILHAILOVICH, N., WOGAN, G.N., LOMBARD, L.S. e RAO, K.V.N. 1972. Aflatoxin B₁ a hepatocarcinogen in infant mouse. Cancer Res. 32: 2289.
325. WALBECK, W. 1973. Fungal toxins in foods. Can. Inst. Food Sci. Technol. 6 (2): 96
326. WALTING, A.E. 1971. Fate of aflatoxin during roasting and storage of contaminated peanut products. J. Am. Off. Anal. Chem. 54 (3): 533.
327. WANNOP, C.C. 1961. The histopathology of turkey X disease in Great Britain. Av. Dis. College Station 5: 371.
328. WHITAKER, T.B., DICKENS, J.W. e MONROE, R.J. 1974. Variability of aflatoxin test results. J. Ass. Oil Chem. Soc. 51: 214.
329. WIDSTRON, N.W., LILLEHOJ, E.B., SPARKS, A.N., KWOLEK, W.F. 1976. Corn earworm damage and aflatoxin B₁ on corn ears protected with insecticide. J. Econ. Entomol. 69 (5): 677.
330. WILDMAN, J.D., STOLOFF, L. e JACOBS, R. 1967. Aflatoxin production by a potent Aspergillus flavus Link isolate. Biotechnol. Bioeng. 9: 429.

331. WILSON, B.J. e WILSON, C.H. 1962. Extraction and preliminary characterization of a hepato-toxic substance from cultures of Penicillium rubrum. J. Bact. 84: 283.
332. WILSON, B.J., CAMPBELL, T.C., HAYES, A.N. e HANLIN, R. T. 1968. Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the Aspergillus flavus group. Appl. Microbiol. 16: 819.
333. WILSON, M.D., TABOR, W.H., TRUCKSESS, M.W. 1976. Screening method for the detection of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, penicilic acid, and citrinin. J. Ass. Off. Anal. Chem. 59 (1): 125.
334. WILSON, D.M., MIXON, A.C. e TROEGER, J.M. 1977. Aflatoxin contamination of peanuts resistant to seed invasion by Aspergillus flavus. Phytopath. 67: 922.
335. WILSON, D.M., MCMILLIAN, W.W. e WIDSTROM, N.W. 1979. Field aflatoxin contamination of corn in South Georgia. J. Am. Oil Chem. Soc. 56:798.
336. WOGAN, G.N. 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bacteriol. Rev. 30 (2): 460.
337. WOGAN, G.N. e NEWBERNE, P.M. 1967. Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. Cancer Res. 27: 2370.

338. WOGAN, G.N., EDWARDS, G.S. e SHANK, R.C. 1967. Excretion and tissue distribution of radioactivity from aflatoxin B₁-¹⁴C in rats. Cancer Res. 27: 1729.
339. WOGAN, G.N. 1968. Aflatoxin risks and control measures. Fed. Proc. 27 (3): 932.
340. WOLF, H. e JACKSON, E.W. 1963. Hepatomas in rainbow trout: Descriptive and experimental epidemiology. Science 142: 676.
341. YAHL, K.R., WATSON, S.A., SMITH, R.J. e BARABOLOK, R. 1971. Laboratory wet-milling of corn containing high levels of aflatoxin and a survey of commercial wet-milling products. Cereal Chem. 48: 385.
342. YOKOYA, F., ANTUNES, A.J. e JORDÃO, B.A. 1969/1970. Deterioração da castanha do parã: I. Armazenamento das amêndoas. Col. ITAL 3: 313.
343. YOKOYA, F., ANTUNES, A.J. e JORDÃO, B.A. 1971. Deterioração da castanha do parã: II. Armazenamento das castanhas. Rev. Bras. Tecnol. 2: 117.

ANEXOS

Limite de Tolerância de Vários Países para Aflatoxinas em Alimentos

País ou Instituição	Limite máximo aflatoxina total	Tipo de Alimento	Referências Bibliográficas
África do Sul	5 ^a 10	Alimentos em geral	(1), (2)
Austrália (Victória)	15	Amendoim e produtos de amendoim	(3)
Austrália (Western)	5 ^a 15	Alimentos em geral e óleo de amendoim Amendoim, nozes e produtos derivados	(4)
Brasil	30	Sementes comestíveis, cruas, torradas, salgadas ou confeitadas e cereais	(5)
Dinamarca	10	Amendoim e produtos derivados	(6)
FAO/WHO/UNICEF-PAG	30	Alimentos em geral	(7)
França	5	Alimentos infantis	(8)
Holanda	0 ^b	Amendoim, alimentos e bebidas preparados a partir de amendoim	(9), (10)
República Federal Alemã	5 ^a 10	Amendoim, avelã, nozes, castanha do parã, pistachio, amêndoa, abricô, sementes de pêssego, semente de amendoim, amendoim, produtos derivados de amendoim e pistachio	(11)
Singapura	0	Alimentos em geral	(12)
Suécia	5	Alimentos em geral	(13)
Suiça	1 ^a 5	Amendoim torrado	(14)
USA (FDA)	15 ^c 20 5 ^d	Amendoim descascado e produtos derivados Alimentos em geral, castanha do parã, amendoim, produtos derivados de amendoim e pistachio Leite integral desengordurado e nata	(15, 16, 17)

^a Limite máximo permitido somente para aflatoxina B₁

^b Há informações que a Saúde Pública holandesa incorporou o nível máximo de 5 ppb

^c Proposto pela FDA em 1974

^d Limite máximo permitido somente para aflatoxina M₁

Referências Bibliográficas dos Limites de Tolerância de Vários Países

1. Foodstuffs, Cosmetics and Disinfectants Act, 1972 (nº 54).
2. Regulation - Aflatoxins in foodstuffs nº R 69 de 16 de Janeiro de 1976. Publicado na Government Gazette nº 4959 de 16/01/66.
3. Victoria, Food and Drug Standards (Amendment nº 17) Regulation 1977: Statutory Rule nº 373/1977.
4. Western Australia, Food and Drug Regulations Amedment, 1982. Publicado na Government Gazette, W.A. de 2 de Abril de 1982.
5. Resolução nº 13/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, itens VIIa e XIa, publicada no D.O.U. em 25/07/78.
6. Circular sobre o procedimento a ser seguido para amendoins e produtos de amendoins importados. Julho de 1977. Emitida pelo National Food Institute of Denmark.
7. FAO/WHO/UNICEF Protein Advisory Group, 1969. PAG Recommendation on aflatoxin. No PAG statement nº 2, United Nations, N. Y. 10017, USA.
8. Journal Officiel de La Republique Française, 108 (15), 5519-24. Em vigor a partir de 14 de Setembro de 1979.
9. General Order Relating to Foodstuffs (Commodity Law) (Stb 1969, J 306). Com emenda em 9/06/70 (Stb 1970, 324), Artigo 3.

10. Methods of Analysis Relating to the General Order, nº 3 de 19/01/74 (Stb 1970, 324). Com emenda em 16/06/76 (Stb 1976, 392).
11. German Federal Republic - Aflatoxin Regulation de 30 de Novembro de 1976 (BGBl. I.S. 3313).
12. Singapore - The Food Regulations, 1974, Artigo 2, Parágrafo 3, c.
13. Ordinance on Foreign Substances in Food (SLV FS, 1977:7) de 6 de Maio de 1977.
14. O limite máximo permitido para aflatoxinas na Suíça foi obtido pelo Tropical Development and Research Institute, através do British Overseas Trade Board, Department of Trade.
15. F.D.A. Administrative Guidelines 7412.01 (Brazil nuts), 7412.03 (peanuts and peanuts products), 7412.05 (pistachio), 7420.01 (other foods).
16. Federal Register, 1974, 39 (236), 22751-2; Federal Register, 1978, 43 (75): 16349.
17. FDA Administrative Guideline 7406:06 de 20 de Dezembro de 1977.

Nota: A maioria das referências foi gentilmente fornecida pelo Tropical Development and Research Institute, Londres.