

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Célia Maria de Sylos e aprovada pela Comissão Julgadora em 08.01.87.
Campinas, 08 de janeiro de 1987.

Jaime Amaya Farfán
Presidente da Banca

FATORES QUE INFLUEM NA PRESENÇA DE
AFLATOXINAS EM AMENDOIM (*Arachis hi*
pogaea L.) E MILHO (*Zea mays* L.).

Célia Maria de Sylos
Engenheiro de Alimentos

01/87
Orientador

Prof. Dr. JAIME AMAYA-FARFÁN

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

CAMPINAS - 1986

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,
pela confiança e
incentivo recebidos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jaime Amaya Farfán, pela orientação e apoio dedicados a esse trabalho, os quais possibilitaram um maior desenvolvimento científico e crítico, e pela sua amizade.

À Profa. Dêlia Rodriguez Amaya, pelo incentivo no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de pós-graduação.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa inicial de pós-graduação.

À FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos, pelo auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento das pesquisas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, por possibilitar o desenvolvimento desse trabalho.

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

Ao Prof. Willian da Silva, pelo fornecimento das amostras dos cultivares de milho desenvolvidas no Departamento de Genética e Evolução da Unicamp.

À Luciene Venturelli, pelo auxílio em algumas análises.

A todos do laboratório de Análise de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

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

A todos que me apoiaram e incentivaram, e de uma forma ou de outra, deram seu auxílio para a conclusão da pesquisa.

Í N D I C E

Pág.

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMO	v
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Efeito do Processamento Térmico sobre as aflatoxi- nas	12
2.2. Fatores que Influenciam o Crescimento de Fungos Aflatoxigênicos	15
2.3. Fatores que influenciam a Produção de Aflatoxinas .	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Preparo de Amostras para Verificação dos Teores de Aflatoxinas após Processamento	28
3.2. Estudo In Vitro da Susceptibilidade de Quatro Culti- vares de Milho à Contaminação por Aflatoxinas	30
3.3. Métodos Analíticos	31
3.3.1. Métodos de triagem de Romer para produtos em geral (AOAC, 1980)	31
3.3.2. Método de quantificação de Romer (1975)	32
3.3.3. Confirmação de aflatoxinas	33
3.3.4. Determinação do teor total de aminoácidos e de peptídios solúveis	34

3.3.5. Determinação da composição de aminoácidos li vres	35
3.3.6. Determinação de metais	36
3.3.7. Determinação de açúcares solúveis totais e redutores	37
3.3.8. Determinação do teor total de ácidos graxos livres	37
3.3.9. Determinação da composição de ácidos graxos livres	37
3.3.10. Cálculo do coeficiente de correlação	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Efeito do Processamento Térmico sobre as Aflatoxi- nas	39
4.1.1. Efeito da torração	40
4.1.2. Efeito da fritura	47
4.1.3. Efeito da cocção	49
4.2. Estudo <i>In Vitro</i> da Susceptibilidade de Quatro Culti vares de Milho.....	55
4.2.1. Produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus fla- vus</i>	56
4.2.2. Produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus para siticus</i>	61
4.2.3. Efeito da composição do milho	70
4.2.3.1. Efeito dos aminoácidos livres	71
4.2.3.2. Efeito dos ácidos graxos livres ...	75
4.2.3.3. Efeito de alguns metais	77
4.2.3.4. Efeito da composição de açúcares ..	77

	Pág.
5. CONCLUSÕES	83
5.1. Efeito do processamento no nível de aflatoxinas em amendoim	83
5.2. Fatores composicionais na susceptibilidade do mi- lho	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
1. Efeito da torração em estufa no teor de aflatoxinas em amendoim naturalmente contaminado	41
2. Efeito da torração industrial do amendoim no teor de aflatoxinas em três produtos	44
3. Efeito da torração em estufa a 130 C por uma hora no teor de aflatoxinas em amendoim naturalmente con- taminado	46
4. Efeito da fritura em óleo no teor de aflatoxinas em amendoim naturalmente contaminado	48
5. Efeito da cocção no teor de aflatoxinas em amendoim naturalmente contaminado	50
6. Efeito da cocção em 5% de sal sobre as aflatoxinas em amendoim naturalmente contaminado	52
7. Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus flavus</i> e incubados em estufa (1º ensaio)	57
8. Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus flavus</i> e incubados em estufa (2º ensaio)	58
9. Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus parasiticus</i> e incubados em estufa (3º ensaio)	62

10. Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus parasiticus</i> e incubados em estufa (4º ensaio)	63
11. Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus parasiticus</i> e incubados em estufa (5º ensaio)	64
12. Teores de aflatoxinas encontrados no cultivar Nutrimaiz naturalmente contaminado	69
13. Teores totais de compostos aminados solúveis (aminoácidos livres e peptídeos) dos quatro cultivares de milho	72
14. Composição aproximada em aminoácidos livres de quatro cultivares de milho no estádio seco	74
15. Teor de lipídeos totais de quatro cultivares de milho e a composição aproximada de ácidos graxos livres	76
16. Teores de zinco, ferro, manganês e cobre encontrados nos quatro cultivares de milho	78
17. Teores de açúcares redutores e totais nos quatro cultivares de milho	80
18. Coeficientes de correlação entre a produção de aflatoxinas e aqueles nutrientes do milho que aparentemente tiveram alguma influência no nível médio de	

toxinas encontrado entre o vigésimo e o quadragésimo	
dia de incubação	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Fórmulas estruturais das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ .	4
2. Primeiro ensaio - Variação dos teores de aflatoxi nas (B ₁ +G ₁) em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus flavus</i> e incubados a 30 C e umidade re lativa de 90%	59
3. Segundo ensaio - Variação dos teores de aflatoxi nas (B ₁ +G ₁) em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus flavus</i> e incubados a 30 C e umidade re lativa de 90%	60
4. Terceiro ensaio - Variação dos teores de aflatoxi nas (B ₁ +G ₁) em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus parasiticus</i> e incubados a 30 C e umida de relativa de 90%	65
5. Quarto ensaio - Variação dos teores de aflatoxi nas (B ₁ +G ₁) em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus parasiticus</i> e incubados a 30 C e umida de relativa de 90%	66
6. Quinto ensaio - Variação dos teores de aflatoxi nas (B ₁ +G ₁) em quatro cultivares de milho inoculados com <i>Aspergillus parasiticus</i> e incubados a 30 C e umida de relativa de 90%	67

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito de torração, fritura e fervura na destruição de aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogaea* L.), vários lotes de amendoim naturalmente contaminados com aflatoxinas foram submetidos a esses processos. Foram verificadas reduções médias de 95,0 e 98,7% no teor de aflatoxinas B_1 e 96,2 e 92,3% no teor de G_1 , após o amendoim ter sofrido processos de torração (190 - 200 C/20 minutos) e de fritura (190 C/10 minutos), respectivamente. Para a aflatoxina B_2 foram registradas perdas médias de 96,3% após torração e de 99,1% após fritura. Torração a 130 C por uma hora, em escala laboratorial, resultou em reduções médias de apenas 5,5 e 2,3% para aflatoxinas B_1 e B_2 , respectivamente. Em escala industrial, nenhuma redução foi observada.

Cocção do amendoim contaminado em água e em sal 5%, durante uma hora, resultou em perdas médias de aflatoxinas B_1 e B_2 de 77,5 e 83,1%, respectivamente, quando o meio foi água, e de 81,7 e 78,5%, respectivamente, quando o meio foi água com sal. A aflatoxina G_1 sofreu reduções médias de 88,1% durante a cocção em água. As aflatoxinas perdidas durante o cozimento não foram encontradas na água de cocção. Já a aflatoxina G_2 não foi detectada em nenhuma amostra torrada, frita ou cozida.

A susceptibilidade de quatro cultivares de milho (*Zea mays*, L.; Maya Normal, Maya Opaco, Doce Cubano e Nutrimaiz) à contaminação por aflatoxinas foi verificada em estudos de incubação *in vitro*. Nesses estudos, os grãos dos cultivares no estado seco foram inoculados com *Aspergillus flavus* e *Aspergillus*

parasiticus e incubados a 30 C, em umidade relativa de 90%. O cultivar Maya Normal apresentou maior susceptibilidade à produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, enquanto que o Cubano mostrou a maior resistência. Os cultivares Opacos e o Nutrimaiz mostraram susceptibilidades alta e média, respectivamente, quando o fungo usado foi *Aspergillus flavus*. Por outro lado, esses dois cultivares exibiram baixa susceptibilidade perante o *Aspergillus parasiticus*.

Em termos de composição química, observou-se que os aminoácidos livres fenilalanina, treonina, valina, isoleucina e leucina mostraram efeito positivo na síntese de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*. Por outro lado, somente valina e metionina influíram positivamente na produção de toxinas por *Aspergillus parasiticus*. Já os ácidos graxos livres, tanto saturados como insaturados, apresentaram correlação negativa com a síntese de aflatoxinas pelos dois fungos.

A variação de íon cobre teve, aparentemente, efeito negativo na síntese de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* enquanto que o manganês apresentou efeito negativo para *Aspergillus parasiticus*.

Os açúcares totais influíram negativamente na produção de toxinas pelos dois fungos. Os açúcares redutores, por sua vez, mostraram efeito negativo apenas para *Aspergillus flavus*.

SUMMARY

The effect of dry roasting, oil roasting and boiling on aflatoxin (AF) destruction in several lots of naturally contaminated peanuts (*Arachis hypogaea* L.) was studied. Mean destructions for AFB₁ were 95,0 and 98,7%, whereas AFG₁ losses were 96,2 and 96,3%, after dry (190 - 200 C, 20 min.) and oil (190 C, 10 min) roasting, respectively. Mean losses of AFB₂ were in turn 96,3 and 99,1% for the above processes, respectively. Dry roasting at 130 C for one hour, laboratory scale, brought about average reductions of only 5,5 and 2,3% for AFB₁ and AFB₂, respectively. No reduction was observed at industrial scale.

Boiling (98 C) in water for one hour caused mean losses of AFB₁ and AFB₂ of 77,5 and 93,1% respectively, whereas boiling in water with 5% salt brought about corresponding losses of 81,7 and 78,5%. AFG₁ decreased 88,1% upon boiling. Toxins lost with this process could not be found in the residual water either. Insofar as AFG₂ was concerned, no traces were detected after treatment by either of the three processes.

The susceptibility to contamination by AF of four corn (*Zea mays* L.) cultivars (Maya Normal, Maya Opaque-2, Surary-1 Cubano and Nutrimayz) was assessed by inoculating the kernels with either *Aspergillus flavus* or *Aspergillus parasiticus* prior to incubation at 30 C and 90 RH.

The Maya Normal cultivar proved to be the most susceptible when challenged by either fungi, whereas the Cubano cultivars exhibited the lowest production. The other two

cultivars, Opaque-2 and Nutrimaiz, showed high and moderate responses to *Aspergillus flavus*, respectively, and a low susceptibility to *Aspergillus parasiticus*.

In terms of the chemical composition, a positive effect in the synthesis of AF by *Aspergillus flavus* was observed for free phenylalanine, threonine, valine, isoleucine and leucine. Meanwhile, valine and methionine correlated positively with AF production by *Aspergillus parasiticus*. On the other hand, both saturated and unsaturated free fatty acids showed a negative correlation with the synthesis of AF by both species of fungi.

Copper variation, within the pre-established range, bore an apparently negative relationship with AF synthesis by *Aspergillus flavus*. This relationship was also observed for manganese when the fungus used was *Aspergillus parasiticus*.

A clear-cut inverse relationship between total sugars and the bioproduction of AF was found for both fungi. In terms of the reducing sugars, however, such correlation only held true for *Aspergillus flavus*.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, e que reconhecidamente agem como potentes agentes hepatotóxicos e carcinogênicos em diferentes espécies de animais.

Os esporos dos fungos aflatoxigênicos encontram-se normalmente no solo e no ar, podendo portanto contaminar uma gama muito ampla de alimentos. Produtos como sementes, farinhas, frutas, etc., quando em condições de umidade e temperatura favoráveis à germinação e propagação do fungo, estão sujeitos a níveis consideráveis de contaminação com o fungo e suas toxinas.

O Brasil, sendo um País de clima predominantemente tropical, tem todas as condições favoráveis que levam à contaminação dos alimentos por aflatoxinas. Principalmente o amendoim e seus derivados são produtos que, segundo levantamentos realizados no país, apresentam-se contaminados com grande frequência e em níveis bastante elevados.

O grau de contaminação dos alimentos por aflatoxinas depende de vários fatores entre os quais podemos identificar o tipo de produto e as condições de produção e manuseio após colheita do alimento. Existem produtos altamente susceptíveis ao ataque de fungos devido à presença de substratos que favorecem a produção de aflatoxinas, enquanto que outros são mais resistentes devido à presença de barreiras naturais ou à própria composição química dos substratos.

Nos últimos anos tem-se dado ênfase à influência da composição química de grãos e sementes em relação à maior ou menor susceptibilidade dos mesmos à invasão de fungos produto

res de aflatoxinas.

Devido aos problemas que as aflatoxinas podem provocar nos seres humanos e animais que as consomem, é de grande importância a busca de meios que visem diminuir a incidência de aflatoxinas nos alimentos, tanto *in natura* como processados.

Na literatura há relato de vários estudos e métodos de descontaminação de alimentos que utilizam calor, irradiação, elevação do pH e extração com solventes, sendo que alguns já estão sendo aplicados em escala industrial no tratamento de matéria-prima para rações animais. No entanto, nenhum desses métodos é considerado satisfatório na descontaminação de alimentos para consumo humano principalmente por comprometer a aceitação e as características sensoriais dos mesmos.

A utilização de tratamentos térmicos, com a dupla finalidade de processar um alimento e reduzir parcial ou totalmente seu nível de contaminação com aflatoxinas, tem sido pesquisada por vários cientistas. As informações encontradas na literatura com respeito ao amendoim são, contudo, ainda fragmentárias e contraditórias.

O presente estudo teve por objetivos: (a) verificar o efeito da torração, fritura e cocção na redução do teor de aflatoxinas em amendoim. (b) estudar a susceptibilidade de quatro cultivares de milho à produção de aflatoxinas *in vitro*, em função da composição dos mesmos e usando duas espécies de fungos: *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*.

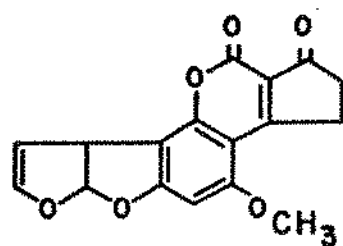
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dentre as micotoxinas encontradas em alimentos, as aflatoxinas são as que podem causar maior dano aos seres humanos e animais pois possuem propriedades tóxicas, carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (Carnaghan *et alii*, 1963; Carnaghan, 1965; Hartley *et alii*, 1963; Barnes e Buttler, 1964; Gopalan *et alii*, 1972; Peers e Linsele, 1973; 1977; Peers *et alii*, 1976).

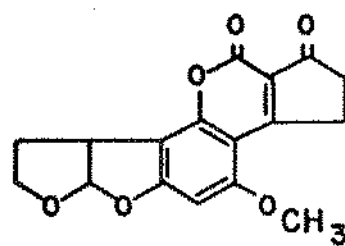
De um modo geral, a sensibilidade à aflatoxinas varia com a espécie e, dentro da mesma espécie, com a dose administrada, sexo, tipo de aflatoxina e idade (Asao *et alii*, 1963; Carnaghan, 1965; Wogan, 1966).

As aflatoxinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos que infectam vários produtos de origem vegetal. Esses compostos pertencem à família das di-furanocumarinas contendo em suas moléculas grupos carboxila, lactona e éter, além de um anel aromático. As principais aflatoxinas são B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 1).

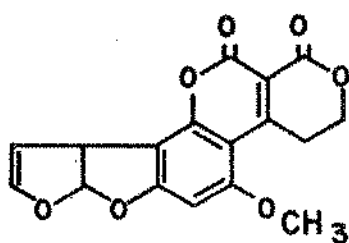
As aflatoxinas possuem ponto de fusão elevado, são bastante solúveis em solventes orgânicos polares e podem ser recristalizadas facilmente. Sob iluminação ultravioleta, apresentam fluorescência azul-violeta (aflatoxinas B₁ e B₂) ou verde (G₁ e G₂). São estáveis ao calor, sendo decompostas à temperatura de cerca de 220 C (Van der Zijden *et alii*, 1962) e podem ser destruídas por agentes oxidantes fortes. As aflatoxinas apresentam decomposição parcial com consequente diminuição da fluorescência no espectro de absorção ultravioleta quando em contato com solventes hidrofílicos (água, metanol, etanol, áci-



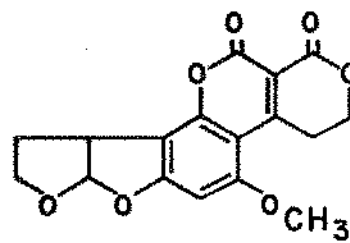
B₁



B₂



G₁



G₂

FIGURA 1 - Fórmulas estruturais das aflatoxinas

B₁, B₂, G₁ e G₂.

do acético) na presença de oxigênio e irradiação ultravioleta (Van der Zijden *et alii*, 1962).

A toxicidade das aflatoxinas decresce de B_1 para G_1 , ou seja, $B_1 > G_1 > B_2 > G_2$. A aflatoxina G_1 possui metade e B_2 um quarto da toxicidade de B_1 (Carnaghan *et alii*, 1963; Hartley *et alii*, 1963).

Os principais fungos produtores de aflatoxinas são *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. No entanto, vários estudos alegam a existência de outros fungos de gênero *Aspergillus* e *Penicillium* que produzem a toxina em quantidades variáveis (Hodges *et alii*, 1964; Kulik e Holaday, 1966; Scott *et alii*, 1967; Schroeder e Verret, 1969; Schroeder e Kelton, 1975). De acordo com Diener (1985), outros pesquisadores tentaram mas não conseguiram reproduzir os resultados destes trabalhos, colocando em dúvida a capacidade desses fungos de produzir aflatoxinas.

As linhagens produtoras de aflatoxinas que contaminam os alimentos são diversificadas, apresentando desde produção nula até formação elevada de toxinas diferentes.

Os esporos dos fungos aflatoxigênicos encontram-se espalhados no solo, no ar e nas plantas podendo, portanto, contaminar muitos alimentos desde que haja condições propícias.

Para impedir que grãos e sementes sejam contaminados durante a estocagem é necessário que, imediatamente após a colheita, os mesmos sejam secos até um ponto inferior à umidade crítica, evitando a invasão e desenvolvimento dos fungos e a síntese de toxinas. É aconselhável manter a umidade abaixo da crítica uma vez que a distribuição do teor de água dificilmente será uniforme. Grãos com umidade superior à média podem apare-

cer durante a estocagem com consequência da condensação e absorção de vapores de água, difusão de umidade por gradiente de temperatura e atividade vital de microrganismos, o que aumenta a temperatura ("hot spots") e a concentração de umidade.

Ambientes com atmosfera controlada durante o transporte e armazenamento de produtos vegetais, podem ser utilizados também na prevenção do crescimento de fungos e formação de toxinas.

A presença de fungos produtores de aflatoxinas nas plantas, durante o desenvolvimento dos frutos, na colheita e na estocagem pode ser prevenida ou controlada pelo uso de fungicidas. Ácido propiônico, combinações de ácidos propiônicos e acético e ácido propiônico e formaldeído mostraram ser efetivos para grãos com alto teor de umidade, usados na alimentação animal (Vandergraft *et alii*, 1975; Brekke e Stringfellow, 1978). A utilização de fungicidas no entanto, acarreta sérias limitações, tais como toxicidade para os animais, custo excessivo, dificuldade de aplicação, efeitos indesejáveis na qualidade do grão e pouca toxidez para os fungos de estocagem. (Vandergraft *et alii*, 1973; Dutton e Anderson, 1980).

O Brasil por ser um país de clima predominantemente tropical, tem condições favoráveis para a contaminação e o desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos em alimentos e rações. O limite de tolerância para aflatoxinas em alimentos é de no máximo 30 ppb, de acordo com a resolução nº 13/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para alimentos.

Um dos produtos agrícolas mais sujeitos à contaminação por aflatoxinas no país é o amendoim. Fonseca (1973a, b, c, 1975, 1976a, b, c, d, e) realizou uma série de estudos sobre a

contaminação de farelos, tortas e farinhas de amendoim em casca provenientes de indústrias de óleo de várias regiões do Estado de São Paulo. Verificou-se a influência da safra, época da colheita da mesma safra e influência da região na formação de aflatoxinas B e G e concluiu-se que a incidência de aflatoxina era geral no Estado de São Paulo. O amendoim já contaminado, quando entregue à fábrica, sofria aumento nos níveis de aflatoxina durante o armazenamento e uma posterior regressão após extração do óleo, Menezes *et alii* (1965/1966) também encontraram tortas e farelos de amendoim contaminados com aflatoxinas e Tango *et alii* (1965/1966) constataram que o amendoim da safra "das águas" apresentava maior grau de contaminação do que o da safra "da seca".

Vários trabalhos sobre a incidência de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados no Estado de São Paulo, registraram que esses alimentos se encontravam altamente contaminados (Pregnolato e Sabino, 1969/1970; Fonseca e Del Nery, 1970; Sabino, 1980; Sabino *et alii*, 1982; Prado, 1983; Scussel e Rodriguez-Amaya, 1985).

Quanto ao milho, foram analisadas, no Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas (PMC, 1982), amostras no estádio seco, do período "das águas" e "da seca", provenientes do Estado de São Paulo. O grau de contaminação foi de 6,4% nas amostras da safra "das águas" e 8,9% nas amostras da safra "da seca". Scussel (1984), analisando 83 amostras de milho e produtos de milho coletadas durante o ano de 1982, observou somente duas amostras contaminadas com conteúdos de 14 a 18 ppb de aflatoxinas. Prado (1983) não encontrou aflatoxinas em 32 amostras de farinha de milho coletadas em Belo Horizonte.

Purchio (1970) analisou 20 amostras de farinha de tri

go, detectando aflatoxina B₁ em duas amostras, em concentrações de 18,4 e 3,6 ppm. Prado (1983), analisando 14 amostras de farinha de trigo e 24 de farinha de mandioca, constatou a ausência de aflatoxinas.

Uma vez que o controle ou prevenção da contaminação de produtos alimentícios por fungos durante a colheita e o armazenamento consiste em uma operação complexa, muitos pesquisadores têm estudado vários métodos de descontaminação ou de destoxificação, isto é, remoção ou destruição das aflatoxinas em produtos já contaminados.

Os vários métodos usados para descontaminação são de dois tipos: (1) remoção física do material contaminado e (2) extração de micotoxinas por vários solventes.

A destoxificação pode ser conseguida por inativação das micotoxinas por meios físicos (calor, irradiação), químicos (álcalis, oxidantes) ou biológicos. Desses apenas os métodos químicos conseguiram aplicação industrial para rações animais.

Em conferência sobre micotoxinas realizada pela FAO/WHO/UNEP em 1977, estabeleceram-se critérios para que um método de descontaminação ou destoxificação possa ter aplicação industrial. Assim sendo, o método deve levar à:

- a) Remoção, destruição ou inativação de micotoxinas;
- b) Ausência de resíduos carcinogênicos, tóxicos ou mutagênicos no produto final ou alimentos processados obtidos de animais alimentados com ração destoxificada;
- c) Preservação do valor nutricional e da aceitabilidade dos produtos;
- d) Preservação das propriedades tecnológicas importan

tes;

- e) Eliminação dos esporos e dos fungos, os quais poderiam, sob condições favoráveis, proliferar e formar novas toxinas.

A remoção física de grãos danificados, manchados, quebrados ou não adequadamente desenvolvidos, antes do processamento, pode ajudar a diminuir o nível de contaminação, mas não totalmente, pois grãos intactos, maduros e sadios podem conter aflatoxinas no seu interior.

Brekke *et alii* (1975 a e b) verificaram a ineficiência de alguns métodos de remoção física na redução do teor de aflatoxina B₁ em milho naturalmente contaminado. Esses métodos são: limpeza a seco, limpeza úmida, separação por densidade e fragmentação seletiva. Na moagem úmida de milho a aflatoxina B₁ foi detectada principalmente na água de maceração (39 - 42%) e na fibra (30 - 38%), e o restante no glúten (13 - 17%), germe (6 - 10%) e amido (apenas 1%) (Bennett e Anderson, 1978; Yaht *et alii*, 1971).

A utilização de solventes para remoção de aflatoxina apresenta desvantagens, pois o processo requer equipamentos especiais de extração e recuperação de solvente, podendo ainda extrair junto alguns nutrientes e auferir ao produto sabor e aroma indesejáveis, além de resíduos de solventes. No entanto, como aflatoxinas são solúveis em solventes polares (acetona, benzeno, clorofórmio, metanol), pode ocorrer remoção completa da aflatoxina sob condições adequadas.

Durante o estudo das propriedades químicas das aflatoxinas, verificou-se perda gradual de fluorescência na presença de algumas substâncias químicas (Van der Zijden *et alii*, 1962).

Pensou-se, portanto, na utilização de agentes químicos para inativação, o que requer um sistema capaz de converter a toxina em derivados não tóxicos, sem modificações prejudiciais na matéria prima. Substâncias como amônia, água oxigenada, hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio e bissulfito têm sido utilizadas e, embora sejam eficientes, alteram a qualidade e a aceitabilidade dos produtos. (Doyle e Marth, 1978 a e b; Draughon e Childs, 1982; Hagler *et alii*, 1983).

Price *et alii* (1982) trataram farelo de caroço de algodão para ração animal com amônia e água e observaram redução nos teores de aflatoxinas, embora o aroma de amônia permanecesse no farelo. Norred (1982) verificou que a amônia era eficiente na destruição de aflatoxinas em milho, não deixando resíduos tóxicos, como mostraram os estudos de toxicidade com ratos.

Coker *et alii* (1985) relataram que a utilização do processo de destoxificação idealizado pelo TRDI/MAFF, que consiste em deixar a amostra aquecida (15 - 20% de umidade) em contacto com 7% de amônia em um recipiente fechado por uma hora, resultaram em redução acima de 95% do nível de aflatoxina em torta de amendoim.

Price e Jorgensen (1985) observaram reduções de 20 a 46% nos teores de aflatoxinas em tortilhas de milho, dependendo do tempo de cozimento e do teor de hidróxido de cálcio utilizados. A redução de aflatoxinas por hidróxido de cálcio porém, parece não ser permanente, pois a acidificação da amostra antes da análise resultou num teor maior de aflatoxinas e, como o pH do estômago é ácido, há a possibilidade de reconversão das aflatoxinas no nosso sistema digestivo.

O emprego de processos térmicos para redução parcial

ou total do nível de aflatoxinas tem sido estudado por vários pesquisadores, porém, os dados encontrados na literatura mostram a falta de estudo sistemático sobre um mesmo tipo de produto. Existem alguns trabalhos sobre o efeito de calor em aflatoxinas para alguns alimentos como amendoim (Lee *et alii*, 1968, 1969; Waliking, 1971; Luter *et alii*, 1982), pecan (Escher *et alii*, 1973), trigo (Reiss, 1978; El-Banna e Scott, 1983), milho (Conway *et alii*, 1978; Stoloff e Trucksess, 1981; Seenappa e Nyagahungu, 1982) e café (Levi, 1980).

A utilização de calor na destruição de aflatoxina para ser eficiente, depende da temperatura, tempo de aquecimento e umidade do produto. Mann *et alii*, (1967) verificaram uma elevação da taxa de redução do teor de aflatoxinas em farinha de amendoim com o aumento do teor de umidade, quando o tempo e a temperatura de aquecimento foram mantidos constantes. Embora a redução do teor de aflatoxinas aumente com a temperatura (Escher *et alii*, 1973) e com o tempo de torração (Levi, 1980), deve-se ter controle durante o processamento térmico para que não se atribua ao produto final características sensoriais indesejáveis.

2.1. Efeito de Processamento Térmico sobre as Aflatoxinas

Em geral as aflatoxinas são estáveis à temperatura ambiente. Baur (1975) não observou mudanças significativas nos níveis de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em farinha de amendoim e em pasta de amendoim cru e torrado estocadas a 23 C por dois anos. Entretanto, diminuições nos teores de aflatoxinas foram notadas por Waltking (1971) em pasta de amendoim cru após seis meses de estocagem. Já Scussel (1984) verificou, em amendoim cru e produtos de amendoim estocados à temperatura ambiente por nove meses na ausência de luz, um aumento no teor de aflatoxinas até certo período de estocagem, após o qual houve redução.

O efeito da torração sobre as aflatoxinas tem sido pesquisado com o intuito de se destruir, total ou parcialmente, as mesmas.

Lee *et alii* (1968) observaram reduções entre 70 e 100% de aflatoxina B₁ em amendoim torrado a 150 C por 30 minutos. Lee *et alii* (1969) notaram que a redução de aflatoxinas em amendoim torrado em cinco condições diferentes era proporcional ao teor inicial de contaminação. Amostras com teores acima de 900 ppb de B₁ apresentaram reduções maiores que 90% enquanto que, para amostras com teores abaixo de 100 ppb, reduções de 60% foram observadas, durante torração a 204 C por 5 minutos. Waltking (1971) obteve reduções de 40-50% para aflatoxinas B₁ e G₁ e de 20-40% para B₂ e G₂, na torração, a 204 C, de amendoim naturalmente contaminado. Reduções de 98 a 95% para aflatoxinas B₁ e G₁, respectivamente, foram obtidas por Escher *et alii* (1973) na torração a 191 C/15 minutos e pecan artificialmente contaminada. Diminuição de 95% no teor de aflatoxinas foi observada em amendoim torrado por microondas (Luter *et alii*,

1982). Entretanto, esse não é um processo comercialmente utilizado, embora resulte num grau satisfatório de torração, sem afetar de maneira significativa o conteúdo de proteína e ácidos graxos.

Soja artificialmente contaminada, torrada a 180 C sofrem reduções de 40 a 78% no teor de aflatoxinas (Hamada e Megalla, 1982), enquanto que café verde artificialmente contaminado, apresentou diminuições de 79% da concentração inicial após 12 minutos de torração a 200 C, e mais 94% após 15 minutos (Levi, 1980).

Conway *et alii* (1978) verificaram reduções de 40 a 80% nos teores de aflatoxinas de milho torrado a 145-165 C, enquanto que Stoloff e Trucksess (1981) obtiveram diminuição de apenas 13% do teor inicial de aflatoxinas em bolinhos de milho assados a 218 C por 20 - 25 minutos. Seenppa e Nyagahugu (1982) observaram em pão de milho assado a 240 C por 35 minutos, reduções de 17 e 32% nas aflatoxinas B₁ e G₁, respectivamente.

El-Banna e Scott (1983) verificaram redução de 55% em pão de farinha de trigo assado a 350 C por 2 minutos, enquanto que Reiss (1978), utilizando 120 C por 30 minutos também para assar pão de farinha de trigo, não obteve nenhuma redução. Escher *et alii* (1973) observaram que a destruição de aflatoxinas aumenta com a elevação da temperatura de torração. Pecan torrada a 144, 171 e 191 C durante 15 minutos apresentaram, respectivamente, 15, 40 e 80% de redução.

Na fritura, Escher *et alii* (1973) verificaram diminuições de 65 e 60% para pecan frita em óleo (197 C por 6 minutos) e em margarina (107 C por 6 minutos), respectivamente. No entanto, Stoloff e Trucksess (1981) encontraram perdas de 34 a 53% de aflatoxinas em grãos de milho cozido frito.

Mann *et alii* (1967) constataram que o teor de umidade

do produto aquecido é fator importante que contribui à taxa de destruição de aflatoxinas pelo calor. Aquecimento da farinha de amendoim contendo 30% de umidade, por 50 minutos a 100 C, resultou em perda de 85% da toxina presente. Quando, nas mesmas condições, farinha contendo 6,6% de umidade foi aquecida, aproximadamente 50% da aflatoxina foi degradada. Coomes *et alii* (1966) obtiveram redução de 95% de aflatoxina B₁ para farinha de amendoim autoclavada a 120 C por quatro horas. A redução de toxicidade foi confirmada em testes feitos com patinhos. Os autores também demonstraram que a aflatoxina B₁ pura era convertida a produtos não fluorescentes quando autoclavada sob condições semelhantes.

O cozimento normal de arroz destruiu 49% de aflatoxina B₁ e nenhuma diferença foi observada entre arroz natural ou artificialmente contaminado (Rehana *et alii*, 1979). Esses autores também notaram destruição maior no cozimento com pressão e cozimento com excesso de água (73 e 82%, respectivamente).

Na fabricação do ugali, prato tradicional africano que utiliza farinha de milho cozida, Seenappa e Nyagahugu (1982) encontraram reduções de apenas 11,5 e 17,6% de aflatoxina B₁ e G₁, respectivamente.

Stoloff *et alii* (1978) verificaram que massas alimentícias (macarrão e talharim) cozidas por 10 minutos continham 66% das aflatoxinas iniciais e a água de cozimento, 29% e Rehena *et alii* (1979) encontraram cerca de 30% da aflatoxina inicial na água de cozimento do arroz.

Stoloff e Trucksess (1981) obtiveram redução de 28% no conteúdo de aflatoxinas em milho cozido com sal, enquanto que Farah *et alii* (1983) verificaram remoção de 80 a 100% de aflatoxinas em amendoim cozido com sal e de 32 a 37% em amendoim cozido sem sal.

2.2. Fatores que Influenciam o Crescimento de Fungos Aflatogigênicos

O crescimento de fungos produtores de aflatoxinas pode ocorrer no campo, tanto na fase de desenvolvimento do fruto quanto na colheita, e na estocagem, devido a fatores intrínsecos (inerente ao substrato) e extrínsecos (inerentes às condições ambientais do substrato). Esses fatores são classificados em físicos, químicos e biológicos (Jarvis, 1971) e os mais importantes são temperatura, teor de umidade, umidade relativa, composição do substrato e linhagem do fungo toxigênico.

A maioria dos fungos pode viver e produzir metabólitos numa ampla faixa de temperatura. O *Aspergillus flavus* é classificado como fungo mesófilo, tendo como temperatura mínima 6-8 C, e como máxima, 44-46 C. No entanto, a temperatura ótima de crescimento varia com a linhagem, numa faixa de 20-30 C (Davis e Diener, 1967, 1977; Schroeder e Hein, 1967; Schindler *et alii*, 1967; Shih e Marth, 1972; Diener e Davis, 1977).

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 média de 22 - 23% e umidades relativas na faixa de 90 a 100%. Os fungos de estocagem, entretanto, requerem teores mais baixos de umidade (menor de 15%) e umidades relativas entre 70 e 90%. O *Aspergillus flavus* pode ser encontrado tanto no campo como na estocagem. A umidade relativa mínima para o crescimento e germinação dos seus esporos é de 80%, embora o mínimo para esporulação seja 85% (Panassenko, 1964).

O amendoim ainda no solo, contém cerca de 25% de umidade e, a menos que seja seco a uma umidade menor que 9%, ocorrerá crescimento de fungos imediatamente após a colheita. A secagem do amendoim por exposição ao sol está sujeita à chuva e à umidade, levando um tempo maior para a secagem com o consequente favorecimento das condições de crescimento dos fungos e produção de aflatoxinas (Austwick e Ayerst, 1963). Por outro lado, já foi frisado no Brasil que, predominando as chuvas na época da colheita, ainda é preferível deixar as plantas de amendoim em fileiras invertidas no campo do que empilhar as mesmas em qualquer lugar sem secagem artificial (Fonseca, 1983).

O crescimento dos fungos não depende somente das condições de umidade e temperatura, mas também do substrato e de outras condições ambientais. Os ambientes contendo CO_2 ou outros gases como N_2 afetam o crescimento de fungos que são tipicamente aeróbios.

Landers *et alii* (1967) estudaram a influência de CO_2 , O_2 e N_2 no crescimento e esporulação de *Aspergillus flavus* incubados durante duas semanas a 30 C e 99% de umidade relativa. Nenhuma redução visível do crescimento ou da esporulação foi observada quando a concentração de CO_2 aumentava de 0,03% para 20%. Com 100% de CO_2 não havia crescimento nem produção de aflatoxinas. Shih e Marth (1973), também investigaram a influência de misturas de CO_2 , O_2 e N_2 em culturas de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* e conseguiram resultados semelhantes.

Sanders *et alii* (1968) avaliaram o efeito combinado de CO_2 , umidade relativa e temperatura no crescimento de *Aspergillus flavus* em amendoim e notaram que houve inibição do crescimento do fungo, em atmosfera de 20% de CO_2 , 86% de umida-

de relativa, a temperatura de 17 C e em atmosfera de 40-60% de CO₂, 86% de umidade relativa, a temperatura de 25 C.

Em geral, pode-se dizer que os alimentos são bons substratos para o desenvolvimento de fungos, que encontram neles os componentes básicos necessários para o seu crescimento. No entanto, alguns constituintes podem favorecer ou inibir o crescimento de fungos aflatoxigênicos. Por exemplo: o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foi inibido pela presença de lactose no meio de cultura (Davis *et alii*, 1966; Davis e Diener, 1968; Abdallahi e Buchanan, 1981).

Davis *et alii* (1967) verificaram que manitol e frutose favoreciam o crescimento de *Aspergillus flavus*. Além desses dois açúcares, Mateles e Adye (1965) observaram que xilose, sorbose e maltose estimulavam também o crescimento de *A. parasiticus*, em meio quimicamente definido.

A presença de sais de cátions, como zinco, ferro, cobre, manganês, molibdênio, cobalto, bário, rádio, cromo, tem efeito inibidor ou estimulador, embora pequeno, no crescimento de fungos (Mateles e Adye, 1965; Lee *et alii*, 1966; Davis *et alii*, 1966; Marsh *et alii*, 1975; Rabie *et alii*, 1981). Esses cátions, porém, exercem maior influência na produção de aflatoxinas do que no crescimento do fungo.

Em termos de aminoácidos, Payne e Hagler (1983) constataram que *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* respondiam de maneira semelhante às mudanças de fontes de nitrogênio do meio. A presença de asparagina provocava maior crescimento do fungo do que a presença dos aminoácidos prolina, metionina e triptofano.

Priyadarshini e Tulpule (1980) verificaram que o cres

cimento de fungos era grandemente inibido pelo ácido graxo láurico. Lenovich (1981) notou efeito semelhante em amostras de cacau que continham mais de 1,8 mg/g de cafeína ou em meio de cultura nos quais cafeína havia sido acrescentada.

O crescimento de *Aspergillus parasiticus* foi inibido pela adição de canela ao meio de cultura (Bullerman, 1974). Llewellyn *et alii* (1981) estudando um número maior de condimentos (tominho, aipo, alecrim, orégano, cravo, canela, gergelim, mostarda) verificaram que não houve crescimento de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* com cravo e canela e muito pouco com orégano e mostarda. No entanto, Mabrouk e El-Shayeb (1980), analisando vários condimentos (pimenta-do-reino, canela, hortelã, cominho, gengibre, cravo) observaram ausência do crescimento de *Aspergillus flavus* apenas na presença de cravo.

2.3. Fatores que influenciam a Produção de Aflatoxinas

Diener e Davis (1966) observaram que o tempo mínimo para produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* em amendoim previamente esterelizado, era de 5 a 7 dias a 30 C, de 7 a 9 dias a 25 C e de 11 a 13 dias a 20 C. Schindler (1977) obteve boa produção de aflatoxinas por várias linhagens de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* a 22 C e Park e Bullerman (1983) encontraram 25 C como sendo a temperatura ótima para produção de aflatoxinas por *A. flavus* e *A. parasiticus* em substratos naturais.

Rabie e Smalley (1965) concluíram que a temperatura ótima para formação de aflatoxina B₁ em meio sintético era 24 C, com pequenas quantidades produzidas a 18 C e 30 C. Já para aflatoxina G₁ a temperatura ótima era 30 C com quantidades menores produzidas a 24, 36 e 42 C. A quantidade relativa de aflatoxinas B₁ e G₁ também era modificada pela temperatura.

Sorenson *et alii* (1967), estudando a formação de aflatoxinas B₁ e G₁ em arroz, encontraram quantidades iguais em temperaturas baixas (15 - 18 C), mas o aumento da temperatura resultava em aumento maior de B₁ do que de G₁. A 25 C, a relação B₁/G₁ era 2:1 e a 28 C, 4:1. Resultados similares foram relatados por Schroeder e Hein (1967) em sementes de algodão, arroz e amendoim.

A temperatura abaixo de 7 C e acima de 43 C não ocorreu formação de aflatoxinas em meios sintéticos ou em substratos naturais, embora ocorresse crescimento de fungos (Davis e Diener, 1967; Lieu e Bullerman, 1977; Schindler, 1977; e Shih e Marth, 1972; Diener e Davis, 1977). Diener e Davis (1977) ob-

servaram que *Aspergillus flavus* produzia aflatoxina em substratos naturais a temperaturas maiores que em meios sintéticos.

Para a produção de aflatoxinas, a umidade relativa mínima é de 80 - 85% e a umidade relativa ótima é de 95 - 99% (Frank, 1974), que corresponde a um teor de umidade de 18,0 a 18,5% e 22% em sementes amiláceas, de 9,0 a 10,0% e de 15,0 a 18,0% em sementes oleaginosas e de 18,0 a 19,5% e 22,0 a 23,0% em leguminosas, respectivamente.

Landers *et alii* (1967) verificaram que a presença de 20% de CO₂ reduzia em 75% a formação de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* incubados a 30 C e 99% de umidade relativa durante duas semanas. Com 100% de CO₂ ou N₂, nenhuma produção de toxina foi observada. Shih e Marth (1973), conseguiram resultados semelhantes com culturas de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Também notaram que a síntese de aflatoxinas era mais susceptível ao aumento das concentrações de CO₂ do que das de N₂. Em atmosfera de 20% de CO₂, 86% de umidade relativa e a 17 C, Sanders *et alii* (1968) encontraram inibição na formação de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* em amendoim.

Alguns trabalhos demonstraram a inibição da síntese de toxinas quando *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* eram incubados na presença de luz (Joffe e Lisker, 1969; Ciegler *et alii*, 1971; Bennett *et alii*, 1971, 1981). Scussel (1984) observou aumento no teor de aflatoxina em produtos de amendoim estocados no escuro, ao passo que pouca ou nenhuma mudança foi constatada nos produtos expostos à luz durante nove meses de estocagem à temperatura ambiente.

Alguns estudos demonstraram que os fungos são sensíveis aos valores de pH do substrato, tendo máxima produção de

toxinas numa faixa de 5 a 7 (Davis *et alii*, 1966; Frank, 1968; Joffe e Lisker, 1969; Buchanan e Ayres, 1975). Esse limite depende da composição do meio, características de linhagem e do tempo de incubação. Buchanan e Ayres (1975) verificaram que a máxima produção de aflatoxinas ocorria a pH 6,0. A síntese de aflatoxina B era favorecida por um pH menor enquanto que a aflatoxina G acumulava-se em pH maior que 6,0.

As aflatoxinas já foram encontradas sob condições naturais em vários alimentos vegetais *in natura* e processados, tais como sementes oleaginosas (amendoim, semente de algodão) e leguminosas (soja), cereais (milho, arroz, trigo, sorgo e aveia), nozes e algumas frutas, bem como seus derivados. Esses alimentos são considerados bons substratos, favorecendo em maior ou menor grau o crescimento de fungos e a formação de aflatoxinas.

Com relação ao efeito dos açúcares sobre a produção de aflatoxinas, vários pesquisadores verificaram que adição de glicose e sacarose ao meio estimulava a produção tanto para *Aspergillus flavus* como para *Aspergillus parasiticus* (Mateles e Adye, 1965; Davis *et alii*, 1967; Davis e Diener, 1968; Abdallahi e Buchanan, 1981).

Segundo Abdallahi e Buchanan (1981) a adição de rafinose e de ribose ao meio também estimulou marcadamente a formação de aflatoxinas enquanto que galactose resultou em produção moderada (Mateles e Adye, 1965; Davis *et alii*, 1967; Abdallahi e Buchanan, 1981).

Em relação aos outros açúcares, os efeitos são contraditórios. Abdallahi e Buchanan (1981) notaram que maltose, sorbose e manose favoreciam significativamente a formação de aflatoxinas enquanto que o oposto foi relatado por Mateles e Adye

(1965).

Grande produção de aflatoxinas foi verificada com a inclusão de frutose (Mateles e Adye, 1965; Abdallahi e Buchanan, 1981) e de xilose (Davis e Diener, 1968) ao meio de cultura. Já Davis *et alii* (1967) constataram produção média de aflatoxinas na presença de frutose, enquanto que Mateles e Adye (1965) e Abdallani e Buchanan (1981) relataram a mesma observação com xilose.

Llewellyn *et alii* (1980) observaram que a produção de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus* não era muito afetada pela presença de 30% de sacarose. Por outro lado, duas linhagens de *Aspergillus flavus* apresentaram máxima produção com 10% de sacarose enquanto que para uma outra linhagem a produção de toxina foi inibida pela presença do açúcar.

O efeito estimulador do zinco na produção de aflatoxina foi verificado por vários pesquisadores (Eldridge, 1964; Mateles e Adye, 1965; Lee *et alii*, 1966; Davis *et alii*, 1967, Lillehoj *et alii*, 1974; Rabie *et alii*, 1981). No entanto a concentração para se obter máxima produção não está bem definida. Para a produção máxima de aflatoxinas com *Aspergillus parasiticus* em meio líquido artificial, com agitação, Mateles e Adye (1965) obtiveram um valor de 0,4 ppm e Lee *et alii* (1966), 0,8 ppm de sais de zinco. Já para produção em meio artificial sem agitação, Davis *et alii* (1967) verificaram que a quantidade necessária era de 5 ppm enquanto que em substratos contendo germe de milho, Lillehoj *et alii* (1974) obtiveram máxima produção com 250 a 500 ppm de zinco. Marsh *et alii* (1975) observaram que concentrações de sais de zinco de até 10 µg/mL aumentavam a síntese de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* em substratos artificiais. No entanto, concentrações maiores que 25 µg/mL inibiam parcialmen-

te sua produção.

A produção de aflatoxinas em alimentos tropicais foi estudada por Obidoa e Ndubuisi (1981), que verificaram que a quantidade ótima de zinco requerida para produção máxima dependia do substrato, não havendo no entanto, uma correlação linear exata entre a produção de toxina e o nível de zinco no alimento. Essa falta de linearidade pode ser devido a presença de outros compostos que podem se ligar ao zinco, tornando-o não disponível para o fungo, como o fitato, relatado por Gupta e Venkitasubramanian em 1975.

Jones *et alii* (1984) verificaram que houve aumento no conteúdo de aflatoxinas em ração para frango durante a estocagem das mesmas e que essa elevação estava correlacionada com a presença de sais de zinco que eram adicionados como suplementação na ração. A adição de outros metais como manganês, ferro, cobre e cádmio não influenciavam na elevação do teor de aflatoxinas.

Vários outros metais tem sido mencionados com respeito à sua influência na biossíntese de aflatoxinas. Entretanto uma comparação direta entre essas investigações é difícil, pois foram utilizados diferentes meios de cultura, algumas vezes de composição química simples e definida, mas às vezes complexas, contendo metais não definidos e em quantidades desconhecidas. Também diferentes espécies e linhagens de fungos foram empregados.

Eldridge (1964) observou que a síntese de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* em meio sintético era reduzida na ausência de cobre, boro e manganês e na presença de ferro e molibdênio. Mateles e Adye (1965), Lee *et alii* (1966), Davis *et alii*, (1967) e Reddy *et alii*, (1981), relataram que o manganês tem pe

queno efeito na produção de aflatoxinas enquanto que Lillehoj *et alii* (1974) e Rabie *et alii* (1981) relataram que esse íon produzia um certo estímulo na síntese de aflatoxinas.

A influência de ferro na produção de aflatoxinas tem sido estudada, não sendo possível ainda definir seu modo de ação. Davis *et alii* (1967) notaram efeito positivo com a adição de ferro ao meio enquanto que Lee *et alii* (1966) e Lillehoj *et alii* (1974) não observaram efeito nenhum na produção de aflatoxinas. A situação com respeito ao cobre é semelhante. Lillehoj *et alii* (1974) notaram que o cobre aumentava a produção de aflatoxinas enquanto que Rabie *et alii* (1981) afirmaram o contrário.

Lee *et alii* (1966) observaram que adição de cádmio ao meio tinha a propriedade de aumentar a produção de aflatoxinas enquanto que o cromo não afetava. Por outro lado, Lillehoj *et alii* (1974) relataram que a adição de pequenos níveis de cromo e cádmio tinham ambos a propriedade de estimular a síntese de aflatoxinas.

Baixas concentrações de alumínio e altas concentrações de níquel favoreceram a formação de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* em meio artificial, segundo Malini *et alii* (1984).

Marsh *et alii* (1975) e Rabie *et alii* (1981) notaram que a concentração dos próprios metais era frequentemente parâmetro decisivo na determinação do papel inibidor ou estimulador.

O efeito dos aminoácidos na formação de aflatoxinas foi estudado por alguns pesquisadores. A presença dos aminoácidos asparagina, prolina e ácido aspártico estimulavam a formação de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (El-

dridge, 1964; Davis *et alii*, 1967; Gupta *et alii*, 1975; Reddy *et alii*, 1979; Payne e Hagler, 1983). Eldridge (1964) verificou que também o ácido glutâmico favorecia a síntese de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*.

Reddy *et alii* (1979) observaram pequeno estímulo à produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* na presença de metionina e triptofano.

Naik *et alii* (1970) constataram que a produção de toxinas por *Aspergillus flavus* era maior em amendoim do que em meios sintéticos. O amendoim contém prolina, metionina e triptofano e a adição desses três aminoácidos ao meio sintético estimulou a formação a níveis semelhantes ao do amendoim.

Schultz e Luidecke (1977) estudaram a influência de triglicerídeos na produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* em meio sintético e verificaram que o efeito inibidor era mais acentuado para a aflatoxina G₁ do que para B₁, sendo que o triglicerídeo de cadeia curta foi mais efetivo. Os autores também notaram que ácidos graxos livres saturados inibiam a produção de aflatoxinas embora, em escala menor quando comparados com os ácidos graxos livres insaturados, que praticamente não permitiram a produção de aflatoxina G₁. No entanto, Priyadarhini e Tulpule (1980) mostraram que os ácidos graxos livres mirístico, palmítico e esteárico estimulavam a síntese de aflatoxinas enquanto que os ácidos graxos oléico e linoléico tenderam a inibi-la. Esses autores também relataram que a produção de toxinas era favorecida pela adição de óleo de coco (95% de ácidos graxos saturados) e inibida com adição de óleo de açafrão (95% de ácidos graxos insaturados).

Mayura *et alii* (1985) observaram que a suplementação

do meio com ácidos graxos geralmente inibia a produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* enquanto que com *Aspergillus flavus* havia um aumento de produção com adição de ácido palmítico e láurico.

Wilson e Bell (1984) verificaram que a soja era um meio pouco susceptível à produção de aflatoxinas, tanto por *Aspergillus flavus* como por *Aspergillus parasiticus*. Sheretz *et alii* (1976), porém, relataram a produção de aflatoxinas por três linhagens de *Aspergillus flavus* e uma de *A. parasiticus* em soja cozida. Uma maior produção de aflatoxina por *A. parasiticus* em soja cozida do que em soja *in natura* também foi observada por Gupta e Venkitasubramanian (1975) e por Park e Bullerman (1983). Nagarajan *et alii* (1973) notaram que a soja cozida era mais susceptível ao *Aspergillus flavus* do que ao *A. parasiticus*, embora a quantidade de toxina produzida fosse pequena quando comparada com milho e amendoim.

Fernando e Bean (1985) observaram maior produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em 5 variedades de sementes de amaranto após cozimento do que em sementes *in natura*. No entanto, a quantidade produzida foi menor do que em arroz e milho.

Llewellyn *et alii* (1978) relataram que o cacau cozido apresentava-se como substrato melhor para produção de aflatoxinas do que cacau *in natura*. Lenovich (1981) verificou que o crescimento de fungo e a produção de aflatoxina eram inibidos em amostras de cacau contendo mais de 1,8 mg/g de cafeína. A ação inibidora de cafeína foi confirmada por Buchanan e Lewis (1984) quando 2 mg/mL de cafeína foi adicionada ao meio utilizado para inoculação de *Aspergillus parasiticus*.

A inibição da síntese de aflatoxinas pela cafeína é altamente específica pois compostos similares à cafeína, como teobromina e metilxantina, foram testados e se mostraram ineficientes (Buchanan *et alii*, 1978, 1983, 1984; Buchanan e Fletcher, 1978).

Vários trabalhos tem documentado que o ácido fítico ou derivados do ácido hidroxicinâmico, encontrados em batata crua e canela, parecem atuar como agentes inibidores. (Bullerman, 1974; Gupta e Venkitassubramanian, 1975; Swaminathan e Kohler, 1976). A adição de extratos de canela e de cravo ao meio de crescimento inibe a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (Bullerman, 1974; Bullerman *et alii*, 1977; Mabrouk e El-Shayeb, 1980; Llewellyn *et alii*, 1981).

Llewellyn *et alii* (1981) verificaram que a presença de condimentos como orégano e mostarda retardava a formação de aflatoxinas. Também a adição de pimenta-do-reino, canela, hortelã, cominho, gengibre ao meio causava efeito inibidor segundo Nabrouk e El-Shayeb (1980).

Raghu *et alii* (1978) encontraram que o *Aspergillus parasiticus* não produzia aflatoxinas em alface, couve-flor e aipo.

Park e Bullerman (1983) verificaram que alimentos que contêm alto teor de proteína e baixo teor de carboidrato não suportavam altos níveis de produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*, embora crescimento e esporulação ocorressem. No entanto, os mesmos autores concluíram que pequenas quantidades de carboidratos podem ser utilizadas pelo *Aspergillus flavus* para produzir quantidades substanciais de aflatoxinas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo de Amostras para Verificação dos Teores de Aflatoxinas após Processamento

A partir de lotes de amendoim naturalmente contaminados com aflatoxinas, foram preparados amendoim torrado, amendoim frito e amendoim cozido da seguinte maneira:

- a) **Torração** - A torração foi realizada de duas maneiras: 1) laboratório e 2) numa fábrica de doces da região de Campinas.
 - 1) **Torração no laboratório** - Amendoins foram torrados em estufa a 190-200 C por 20 minutos e a 130 C por uma hora.
 - 2) **Torração na fábrica** - Duas sacas de 60 Kg de amendoim descascado foram aquecidos por chama direta por uma hora em cilindro rotativo perfurado. A temperatura média atingida no grão através desse processo foi estimada em 134 C. Após a torração os grãos foram despelados e utilizados na elaboração de pé-de-moleque e paçocas.
- b) **Fritura** - Amendoins foram colocados em óleo de soja fervente por 10 minutos. A temperatura atingiu 190 C durante a fritura. Após o preparo, tomou-se o cuidado de retirar o excesso de óleo.
- c) **Cozimento** - Amendoins foram cozidos durante uma hora em panela aberta contendo água (proporção de

três vezes a quantidade de amendoim). A água residual do cozimento foi recolhida para posterior análise de aflatoxinas.

- d) Cozimento com sal - Amendoins foram cozidos conforme item anterior, só que ao invés de água foi utilizada solução contendo 5% de cloreto de sódio.

3.2. Estudo *in vitro* da Susceptibilidade de Quatro Cultivares de Milho à Contaminação por Aflatoxinas

Foram coletadas no campo experimental do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP amostras de quatro cultivares de milho (Maya Normal, Maya Opaco, Doce Cubano e Nutrimaiz) no estágio seco.

Após quarteamento e homogeneização, os grãos (300 g) foram inoculados com uma suspensão de esporos de *Aspergillus flavus* ou *Aspergillus parasiticus*. O inóculo foi preparado a partir de cultura do fungo, cultivado em Ágar Sabouraud e incubado a 30 C até que houvesse abundante formação de esporos. Esses esporos foram removidos através da adição de 5 mL de solução de Tween 80 a 5% sob agitação em agitadores de tubos por um minuto e contados em câmara de Newbauer. Foram feitas diluições da suspensão em água estéril de tal forma que a amostra, após a inoculação, contivesse aproximadamente 10^6 esporos por grama de produto, ou seja, utilizando 15 ml de inóculo 5%.

As amostras já inoculadas foram colocadas em dessecadores contendo solução saturada de sulfato de zinco heptaidrato para atingir umidade relativa de 90%.

Nos dessecadores, os grãos foram colocados em pequenos recipientes perfurados de modo a não entrarem em contacto com a solução de sulfato de zinco. A incubação foi realizada em estufa com temperatura mantida a 30 C.

3.3. Métodos Analíticos

3.3.1. Método de triagem de Romer para produtos em geral (AOAC 1984)

Esse método, descrito por Romer em 1975, oficializado pela "Association of Official Analytical Chemists" em 1980, utiliza uma minicoluna de vidro 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.

Partindo-se de 50 g de amostra moída procedeu-se à extração de aflatoxinas através de mistura de acetona-água (85:15), triturando-se por 3 minutos. Após filtração, 150 mL do filtrado foram submetidos a um processo de limpeza com os seguintes reagentes precipitantes: 3 g de carbonato básico de cobre e 200 mL de gel de cloreto férrico, preparado a partir de 170 mL de hidróxido de sódio 0,2N e 30 mL de cloreto férrico (cloreto férrico anidro 20 g/300 mL de água).

Uma segunda filtração foi feita com auxílio de terra diatomácea. Os 150 mL do filtrado foram colocados em funil de separação com 150 mL de ácido sulfúrico 0,03% e as aflatoxinas extraídas com duas porções de 10 mL de clorofórmio, coletadas separadamente. Em seguida, os extratos foram levados com solução de hidróxido de potássio 0,02% contendo cloreto de potássio 1% e recolhidos em bêqueres.

Dois mL do primeiro extrato foram colocados no topo da minicoluna e eluídos com clorofórmio-acetona (9:1). Nestas

condições, amostras positivas apresentam, na camada de florisil, uma banda fluorescente sob iluminação ultravioleta a 365 nm. O restante do primeiro e o segundo extratos foram guardados para posterior quantificação, caso a triagem resultasse positiva.

3.3.2. Método de quantificação de Romer (1975)

A avaliação quantitativa de aflatoxinas, segundo Romer, baseia-se na dissolução dos extratos em mistura de benzeno-acetonitrila, aplicação em placas de sílica-gel e desenvolvimento por sistema clorofórmio-acetona. Através da comparação visual com padrões sob iluminação ultravioleta a 365 nm, estimou-se os teores de aflatoxinas nas amostras.

Foram juntados 4 mL de cada um dos extratos de clorofórmio obtidos como descrito no item anterior e neutralizados em funil de separação com solução de ácido sulfúrico 0,03%. Uma alíquota de 6 mL foi coletada em frasco e levada à secar em banho-maria à temperatura de 40 C sob corrente de nitrogênio.

O extrato seco foi diluído e levado a volume fixo com a mistura benzeno-acetonitrila (98:2). Alíquotas de 3,5; 5,0 e 6,5 mL foram aplicadas em placas de sílica-gel, ao lado de padrões em volumes iguais ao do extrato. Utilizou-se mistura clorofórmio: acetona (9:1) para o desenvolvimento do cromatograma. A intensidade das manchas fluorescentes da amostra foi visualmente comparada com a dos padrões sob iluminação ultravioleta a 365 nm.

Para o cálculo foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g/Kg} = \frac{S.Y.V}{X.W}$$

onde:

- S - volume em μL do padrão B_1 igual ao desconhecido.
- Y - concentração do padrão B_1 em $\mu\text{g/mL}$.
- V - volume em μL da diluição final do extrato da amostra.
- X - volume em μL do extrato da amostra aplicada cuja intensidade de fluorescência é igual a S (padrão B_1).
- W - gramas de amostra correspondente ao volume do extrato que foi evaporado (no caso 3,9 g).

3.3.3. Confirmação das aflatoxinas

A identidade das aflatoxinas foi confirmada através dos seguintes testes:

- a) Uso de solução aquosa a 25% de ácidos inorgânicos (Schuller *et alii*, 1967).

Depois do desenvolvimento, a placa foi pulverizada com solução de ácido sulfúrico 25% (ácido nítrico também pode ser usado). As manchas fluorescentes das aflatoxinas, originalmente azuis e verdes, mudam para amarelas.

- b) Uso de éter etílico (Nabney e Nesbitt, 1965).

O cromatograma desenvolvido, após seco, foi submetido a novo desenvolvimento com éter etílico. Nestas condições, sob iluminação ultravioleta, as substâncias interferentes deslocam-se de posição ou seguem com a frente de solvente.

- c) Uso de ácido trifluoroacético e clorofórmio (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 de toxinas. Quantidades semelhantes dos padrões B₁ e G₁ 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 bequer pequeno dentro do tanque. Sob iluminação ultravioleta os derivados B_{2a} e G_{2a} apresentaram fluorescência azul e verde, respectivamente, e valores de R_f mais baixos que os compostos originais.

3.3.4. Determinação do teor total de aminoácidos e de peptídeos solúveis

O método descrito a seguir foi utilizado para amostras de quatro cultivares de milho, em duplicata.

De amostras moídas e homogeneizadas de milho retiraram-se 100 mg e juntaram-se 20 mL de água destilada, em tubo de ensaio. Após agitação ocasional e repouso durante 10 minutos, filtraram-se as amostras e diluíram-nas na proporção 1:5. Alíquotas de 1 mL desta solução foram colocadas em tubos de ensaio e homogeneizadas cuidadosamente com adição de 3 mL do reagente de ninidrina. O reagente de ninidrina contém 1,9% de ninidrina, 75% de metilcellosolve, acetato de sódio 1M, e pH de 4,45.

A seguir, os tubos protegidos da ação da luz foram submetidos ao aquecimento em banho-maria de água fervente durante 10 minutos. Decorrido o tempo de reação, efetuou-se resfriamento rápido, agitou-se bem a solução e procedeu-se à leitura de absorbância a 570 nm em espectrofotômetro.

Aminoácidos livres e peptídios solúveis são expressos em microequivalentes de ácido glutâmico por grama de produto.

O cálculo foi efetuado através da construção de curva de calibração de teores conhecidos de ácido glutâmico (0,10, 20, 40, 80, 100, 160 e 200 n moles de ácido glutâmico) lidos a 570 nm.

3.3.5. Determinação da composição de aminoácidos livres

A 1,5 g de cada cultivar de milho moído, foram adicionados 5,0 mL de ácido sulfossalicílico 3,5%. A amostra foi agitada durante 15 minutos e centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. Após filtração, uma alíquota de 0,75 mL foi retirada e diluída em 0,25 mL de tampão citrato de lítio (pH 2,2) para em seguida ser injetada em analisador de aminoácidos.

Após o processo de filtração, os extratos dos cultivares Cubano e Nutrimaiz apresentaram-se turvos, dificultando a análise dos aminoácidos livres. Para eliminar essa interferência, após a centrifugação da amostra com o ácido sulfossalicílico, 2,5 mL do sobrenadante foram coletados, a eles foram acrescentados 1,5 mL de acetona. Esta solução novamente centrifugada a 500 rpm por um minuto. Três mL do novo sobrenadante foram retirados e colocados em banho-maria a 70 C para que a acetona se evaporasse, eliminando-a do extrato.

O extrato foi diluído em tampão citrato de lítio na proporção descrita acima e injetado no analisador.

As condições de operação do Analisador Beckman 120 C foram as seguintes:

- Comprimento da coluna de vidro: 6 x 220 mm.

- Resina: W - 3P
- Tampões: pH 2,83 0,20N Li^+
 pH 3,70 0,20N Li^+
 pH 3,75 1,00N Li^+ , mais 6% de iso-propanol
 LiOH 0,30N Li^+ com 0,25 g/L de EDTA na forma ácida.
- Taxas de fluxos: tampões 44 mL/h
 ninidrina 22 mL/h
- Tempo de análise: 267 minutos

A mistura padrão de aminoácidos foi preparada com padrão ácido-neutro e padrão básico da marca Hamilton Co. Partes iguais desses dois padrões foram misturadas e diluídas 5 vezes em tampão citrato de lítio (pH 2,2).

Para todas as análises o volume injetado foi de 100 μL .

3.3.6. Determinação de metais

A determinação de metais nos quatro cultivares de milho foi feita por espectrofotometria de absorção atômica.

Amostras moídas de milho foram incineradas em mufla a 450 C, as cinzas dissolvidas com algumas gotas de ácido nítrico e levadas a volume com água desionizada. Os índices de metais foram expressos em ppm (parte por milhão).

A construção da curva de calibração foi feita com solução do metal a ser determinado, a diferentes concentrações.

As análises foram feitas utilizando-se o espectrofotômetro de absorção atômica UNICAM modelo SP 90 2A, seguindo-se as condições especificadas para cada metal.

3.3.7. Determinação de açúcares solúveis totais e redutores

A extração dos açúcares solúveis foi efetuada nos cultivares de milho moído segundo AOAC (1970), procedimento 7058 que consiste na extração dos açúcares com etanol a quente.

Nesses extratos, os açúcares redutores foram quantificados de acordo com o método espectrofotométrico de Somogyii-Nelson (1945) e os açúcares totais determinados pelo método espectrofotométrico do fenol-ácido sulfúrico (Hodge e Hofreiter, 1962).

3.3.8. Determinação do teor total de ácidos graxos livres

O teor de ácidos graxos livres foi determinado segundo AOAC (1984), procedimento 28:032, que consiste na titulação dos lipídeos, dissolvidos em etanol, com hidróxido de sódio.

A porcentagem de ácidos graxos livres é expressa em termos do ácido graxo oléico.

3.3.9. Determinação da composição de ácidos graxos livres

Os ácidos graxos livres dos quatro cultivares de milho foram determinados a partir dos lipídeos totais extraídos pelo procedimento de Bligh e Dyer (1959). Esse método extrai todas as classes de lipídeos com clorofórmio-metanol-água (2,0:2,0:1,8), sem aquecimento.

Os ácidos graxos livres foram determinados por cromatografia líquido-gasosa após metilação, pelo método Metcalfe *et alii* (1966), a partir de uma alíquota de 100 mg de lipídeos

totais.

Os metilesteres foram injetados no cromatógrafo gasoso Parkin Elmer 990 equipado com detector de ionização de chama e com coluna de aço inox de 3,6 m empacotada com 8% de EGSSX Chromosorb G.A.W. m 80/100.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação com padrões de ácidos graxos.

3.3.10. Cálculo do coeficiente de correlação

Para verificar a interdependência entre a quantidade de aflatoxinas produzida e as concentrações dos nutrientes, entre aminoácidos, ácidos graxos, minerais e açúcares, utilizou-se o cálculo do coeficiente de correlação (r).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do Processamento Térmico sobre as Aflatoxinas

Aliada aos seus efeitos tóxicos, uma propriedade das aflatoxinas que vem causando muita preocupação é a sua estabilidade térmica. Na opinião de muitos técnicos e pesquisadores esta garantiria a sua sobrevivência durante o processamento térmico de alimentos. Desde que as primeiras tentativas de reduzir a toxidez de farelos de amendoim por aquecimento falharam (Blount, 1961; UNICEF, 1963; Pomeranz, 1964; Feuell, 1966) e foi relatado que as aflatoxinas isoladas eram estáveis até o seu ponto de fusão de cerca de 250 C (Feuell, 1966), o tratamento térmico tem sido considerado como um meio de detoxificação altamente ineficiente. Um exame cuidadoso dos poucos trabalhos sobre o assunto, porém, demonstra que os resultados são conflitantes e Scott (1984), na sua recente revisão sobre os efeitos do processamento de alimentos nas micotoxinas, já admite que as aflatoxinas são apenas moderadamente estáveis ao calor. Diante disso, e com os avanços nos métodos analíticos, permitindo maior sensibilidade e confiabilidade dos resultados, uma reavaliação dos efeitos de tratamentos térmicos nas aflatoxinas se faz necessária.

No presente trabalho vários lotes de amendoim naturalmente contaminado foram submetidos à torração, fritura e cocção, operações normalmente utilizadas no processamento e comercialização de amendoim. Vários ensaios foram realizados para cada tratamento para compensar a conhecida não uniformidade na distribuição das toxinas nos grãos de amendoim.

4.1.1. Efeito da torração

A torração em estufa, a 190-200 C durante 20 minutos, apresentou-se eficiente na redução dos níveis de aflatoxinas em amendoim, como mostram os resultados apresentados na Tabela 1. Para as aflatoxinas B_1 e G_1 , as reduções nos onze ensaios realizados foram superiores a 81,8% (média de 95,0%) e 89,1% (média de 96,2%), respectivamente. As perdas de aflatoxina B_2 foram acima de 75% (média de 96,3%) e a G_2 não foi encontrada em nenhuma amostra de amendoim torrado. Em termos de aflatoxinas totais a diminuição foi acima de 86,4% com média de 95,5%.

Também trabalhando em escala de laboratório, com 100 grãos de amendoim naturalmente contaminado, Lee *et alii* (1968) dividiram cada grão longitudinalmente em duas partes, sendo que uma parte foi analisada crua e a outra submetida à torração antes da dosagem. Os resultados das análises individuais dos grãos demonstraram redução média em torno de 80%, em aflatoxina B_1 e 60%, em aflatoxina B_2 , após torração por 30 minutos a 150 C. Colocando os grãos em três categorias em termos dos níveis de aflatoxinas, houve na realidade redução de 40-80%, em aflatoxina B_1 , e 17-69%, em aflatoxina B_2 , em grãos contendo mais de 100.000 ppb de aflatoxinas totais e uma redução de 73-99%, em aflatoxina B_1 , e de 0-92%, em aflatoxina B_2 , em grãos contendo 1.500 a 100.000 ppb de aflatoxinas totais. Estas variações foram atribuídas a distribuição não uniforme das toxinas entre grãos ou ainda dentro do mesmo grão. Foi notável, no entanto, que nos 17 grãos contendo aflatoxinas totais abaixo de 1.500 ppb, a redução foi de 100%. Este último resultado de Lee *et alii* (1968) está de acordo com nossos resultados considerando que os onze lo-

TABELA 1 - Efeito da torração em estufa no teor de aflatoxinas em amendoim contaminado^a.

Lotes de Amendoim		Aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$) ^b				Total
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
1	cru	37 $\pm$ 7	17 $\pm$ 3	ND ^c	ND	54
	torrado	ND	ND	ND	ND	ND
	% redução	100	100	--	--	100
2	cru	50 $\pm$ 13	20 $\pm$ 5	14 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	92
	torrado	ND	ND	ND	ND	ND
	% redução	100	100	100	100	100
3	cru	88 $\pm$ 14	30 $\pm$ 5	ND	ND	118
	torrado	16 $\pm$ 3	ND	ND	ND	16
	% redução	81,8	100	--	--	86,4
4	cru	89 $\pm$ 13	27 $\pm$ 5	44 $\pm$ 5	26 $\pm$ 5	186
	torrado	ND	ND	ND	ND	ND
	% redução	100	100	100	100	100
5	cru	111 $\pm$ 20	35 $\pm$ 6	35 $\pm$ 2	4	184
	torrado	6 $\pm$ 2	ND	ND	ND	6
	% redução	94,5	100	100	100	96,7
6	cru	135 $\pm$ 24	40 $\pm$ 7	46 $\pm$ 5	21 $\pm$ 3	242
	torrado	15 $\pm$ 4	ND	5	ND	20
	% redução	88,9	100	89,1	100	91,7
7	cru	161 $\pm$ 19	67 $\pm$ 11	ND	ND	228
	torrado	4 $\pm$ 0	ND	ND	ND	4
	% redução	97,5	100	--	--	98,2
8	cru	219 $\pm$ 34	109 $\pm$ 28	110 $\pm$ 15	110 $\pm$ 35	548
	torrado	9 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	9	ND	24
	% redução	95,9	94,5	91,8	100	95,6
9	cru	263 $\pm$ 7	65 $\pm$ 10	ND	ND	328
	torrado	ND	45	ND	ND	5
	% redução	100	93,8	--	--	98,8
10	cru	519 $\pm$ 37	128 $\pm$ 24	ND	ND	647
	torrado	50 $\pm$ 11	32 $\pm$ 7	ND	ND	82
	% redução	90,4	75,0	--	--	87,3
11	cru	880 $\pm$ 42	222 $\pm$ 34	ND	ND	1102
	torrado	32 $\pm$ 5	9 $\pm$ 3	ND	ND	41
	% redução	96,4	95,9	--	--	96,3
média geral de redução		95,0	96,3	96,2	100	95,5

^a - condições de torração: 190-200 C por 20 minutos

^b - Valores são médias de quatro determinações, com exceção da amostra 9 para a qual somente duas determinações foram realizadas.

^c - ND: não detectado (considerado como zero).

tes de amendoim submetidos à torração no nosso estudo não ultrapassavam 1.100 ppb de aflatoxinas. As taxas de redução de 82-100%, em aflatoxina B₁, e de 75-100%, em aflatoxina G₁, refletem melhor a realidade, uma vez que o limite de detecção do método utilizado por Lee *et alii* foi de 50 ppb enquanto que o do método de Romer, aqui utilizado, é menor que 5 ppb.

Em termos práticos, os nossos resultados assumem maior importância já que o mais comum hoje é a ocorrência de lotes de amendoim contaminado com níveis na faixa mais baixa, de 10 a 1904 ppb, com média de 446 ppb (Scussel e Rodriguez-Amaya, 1985).

Lee *et alii* em 1969, submeteram amendoim contaminado por inoculação com *Aspergillus flavus* à torração seca e em óleo. Amostras de amendoim com quatro níveis diferentes de aflatoxinas (130 a 6.000 ppb) foram processados em cinco condições diferentes (tempos de 3 a 30 minutos e temperaturas de 121 a 204 C) simulando processos industriais. Para cada nível de contaminação do material inicial (600 g), apenas uma única amostra de 50 g foi submetida a cada uma das condições pré-estabelecidas. Esta amostragem levou em conta que o valor do nível de contaminação de aflatoxina detectado em 50 g de amostra correspondia à média de aflatoxina calculada em função da determinação individual de 24 a 68 grãos de amendoim. Foram constatadas reduções de 43-96% em aflatoxina B₁, e 33-98% em aflatoxina G₁. Não foi observada nenhuma relação entre as diminuições dos teores de aflatoxinas e a temperatura e/ou tempo de torração. Foi constatado, no entanto, que a redução das aflatoxinas manteve-se diretamente proporcional ao teor inicial. Essa relação não foi verificada por Lee *et alii* (1968) e contraria os resultados apresentados na Tabela 1, nos quais a destruição tende a ser

mais efetiva em lotes com teores mais baixos de aflatoxinas iniciais.

Nos nossos primeiros nove ensaios, a torração conseguiu abaixar os teores finais de aflatoxinas dentro do limite de 30 ppb ($B_1 + G_1$) estipulado pela legislação brasileira, embora todos os teores iniciais estivessem acima do limite. Os dois últimos lotes altamente contaminados com 519 e 880 ppb de $B_1 + G_1$ respectivamente, permaneceram acima do limite após torração.

Não foi verificado diferença significativa entre B_1 e G_1 , em termos da sensibilidade, ao contrário dos trabalhos de Lee *et alii* (1969), Waliking (1971), Escher *et alii* (1973) e Seenappa e Nyagahugu (1982), embora os resultados destes sejam conflitantes.

A eficiência da torração no laboratório não se verificou a nível industrial. As experiências foram realizadas numa fábrica de doces de pequeno porte localizada na cidade de Campinas. Por limitações do equipamento, a temperatura atingida durante o processo foi de apenas 134 C, embora o tempo de torração fosse uma hora. Apenas dois ensaios foram realizados neste caso, mas a homogeneização das amostras foi melhor pois a torração foi realizada num torrador cilíndrico rotativo. Partindo-se de lotes de 100 kg cada, os grãos foram misturados no próprio torrador antes da retirada de amostras de 5 kg para análise.

Como pode se notar na Tabela 2, o efeito de torração foi praticamente nulo. Na primeira coleta, o nível de contaminação de 82 ppb de aflatoxinas B_1 e G_1 , manteve-se igual após torração. Já na segunda coleta, os teores de contaminação eram maiores e mesmo assim não se observou nenhuma redução após torração. Portanto, o uso de temperatura de 134 C para torração não

TABELA 2 - Efeito da torração industrial do amendoim no teor de aflatoxinas em três produtos^a.

Aflatoxina	Teor de aflatoxina (µg/kg de produto) ^b				
	Matéria-prima crua	Matéria-prima torrada	Pé-de-Moleque	Paçoca A ^d	Paçoca B ^e
Primeiro Lote					
B ₁	52±3	51±12	5	17±4	30±8
B ₂	11±4	24± 5	5	ND	5
G ₁	30±6	37± 6	5	17±5	17±4
G ₂	ND ^c	ND	ND	ND	ND
Segundo lote					
B ₁	120±12	120±15	43±12	43±10	80±15
B ₂	40± 6	12± 6	22± 5	40±10	40± 9
G ₁	12± 4	13± 4	5	7± 2	9± 3
G ₂	6± 2	7± 3	5	5	5

^a - Torração a 134 C por uma hora, amostragens de 5 kg.

^b - Valores são média de quatro determinações

^c - ND: não detectado

^d - Paçoca processada com amendoim torrado, açúcar, sal e gordura

^e - Paçoca processada com amendoim torrado, açúcar e sal

produziu nenhum efeito na redução dos teores de aflatoxinas.

Na Tabela 2 são fornecidos também os teores de aflatoxinas dos produtos fabricados a partir do amendoim torrado. A diminuição nos teores reflete simplesmente a diluição da matéria-prima torrada.

Para uma comparação mais adequada, três amostras de amendoim naturalmente contaminado foram submetidas à torração a 130 C no laboratório. De acordo com os resultados obtidos na Tabela 3, a redução nos teores de aflatoxinas totais foi inferior a 4,3%, com média de 2,9%. Portanto, a utilização da temperatura de 130 C para torração de amendoim não é suficiente para destruir as aflatoxinas tanto a nível industrial quanto a nível laboratorial.

Na torração em escala planta piloto, que se aproxima das operações comerciais, de amendoim naturalmente contaminado (teores totais de aflatoxinas de 472 a 837 ppb) Waliking (1971) constatou redução de apenas 40-50% de aflatoxina B₁ e G₁ e de 20-40% de aflatoxina B₂ e G₂. A temperatura foi de 204 C, mas não se especificou o tempo. Não foi observada nenhuma relação entre a taxa de redução e os teores iniciais de aflatoxinas.

Torrção de amendoim naturalmente contaminado por radiação de microondas, utilizando-se 3,2kW por 5 minutos ou 1,6kW por 16 minutos, acarretou diminuição de mais de 95% de aflatoxinas, segundo Luter *et alii* (1982). Este processo, embora não seja usado comercialmente, proporcionou bom grau de torração sem apresentar alteração significativa nos teores de proteínas e de ácidos graxos.

Além destes trabalhos sobre amendoim, alguns outros

TABELA 3 - Efeito da torração em estufa a 130 C por uma hora no teor de aflatoxinas em amendoim naturalmente contami-
nado.

Lotes de Amendoim		Aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) ^a				
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total
1	cru	29 $\pm$ 3	7 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3	ND	51
	torrado	27 $\pm$ 3	7 $\pm$ 2	16 $\pm$ 4	ND	50
	% redução	6,9	0,0	0,0	--	2,0
2	cru	59 $\pm$ 7	11 $\pm$ 3	ND	ND	70
	torrado	54 $\pm$ 6	13 $\pm$ 5	ND	ND	67
	% redução	8,5	0,0	--	--	4,3
3	cru	323 $\pm$ 21	72 $\pm$ 12	ND	ND	395
	torrado	319 $\pm$ 23	67 $\pm$ 10	ND	ND	386
	% redução	1,2	6,9	--	--	2,3
média geral de redução		5,5	2,3	0,0	--	2,9

^a - Valores são médias de duas determinações

^b - ND: não detectado

estudos foram realizados com outros alimentos, constatando taxas variáveis de destruição de aflatoxinas. Levi (1980) obteve redução de aflatoxinas superior a 94% na torração de café a 200 C por 15 minutos. Conway *et alii* (1978) encontraram reduções de 40 a 80% para aflatoxina B₁ na torração de milho a temperaturas entre 145 a 165 C, Stoloff e Trucksess (1981) relataram destruição de apenas 13% de aflatoxinas em bolinhos de milho assados a 218 C por 20-25 minutos. No estudo em café houve adição de aflatoxina, por falta de amostra naturalmente contaminada. Nos dois outros ensaios, foram utilizadas amostras naturalmente contaminadas. Hamada e Megalla (1982) relataram que a torração de soja artificialmente contaminada a 180 C acarretava redução de 40 a 73% no teor de aflatoxinas iniciais.

4.1.2. Efeito de fritura

A fritura foi realizada em oito lotes de amendoim contaminado (Tabela 4). Destas, seis apresentaram 100% de perda de aflatoxina B₁ (considerando "não detectado" como zero), sendo que a média geral foi de 98,7%. Das cinco amostras que continham G₁ na matéria-prima crua, três registraram 100% de redução, com média de 92,3%. Assim como na torração, não houve diferença significativa na sensibilidade das aflatoxinas B₁ e G₁ à fritura.

Para a aflatoxina B₂, a diminuição foi acima de 93,8%, com média de 99,1%. A aflatoxina G₂ foi totalmente destruída após fritura das amostras que a continham. A perda média em termos de aflatoxinas totais foi de 98,1%.

Assim como a torração, a redução dos teores de aflato

TABELA 4 - Efeito da fritura em óleo no teor de aflatoxinas em amendoim contaminado^a.

Lotes de Amendoim		Aflatoxinas (µg/Kg) ^b				Total
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
1	cru	37+ 7	17+ 3	ND	ND	54
	frito	ND ^c	ND	ND	ND	ND
	% redução	100	100	--	--	100
2	cru	50+13	20+ 5	14+ 3	8+ 2	92
	frito	ND	ND	ND	ND	ND
	% redução	100	100	100	100	100
3	cru	88+14	30+ 5	ND	ND	118
	frito	ND	ND	ND	ND	ND
	% redução	100	100	--	--	100
4	cru	89+13	27+ 5	44+ 5	26+ 5	186
	frito	ND	ND	ND	ND	ND
	% redução	100	100	100	100	100
5	cru	111+20	35+ 6	35+ 2	4	184
	frito	10+ 4	ND	ND	ND	10
	% redução	90,9	100	100	100	94,6
6	cru	135+24	40+ 7	46+ 5	21+ 3	242
	frito	ND	ND	10+ 4	ND	ND
	% redução	100	100	78,3	100	100
7	cru	214+23	ND	163+44	ND	377
	frito	ND	ND	27+ 6	ND	27
	% redução	100	--	83,4	--	92,8
8	cru	263+ 7	65+10	ND	ND	328
	frito	45	4	ND	ND	9
	% redução	98,5	93,8	--	--	97,3
média geral de redução		98,7	99,1	92,3	100	98,1

a_ fritura em óleo por 10 minutos. A temperatura atingiu 190 C durante a fritura.

b_ Valores são médios de quatro determinações, com exceção da amostra 7 e 8 para as quais, duas determinações foram realizadas.

c_ ND: não detectado.

xinas na fritura depende da concentração inicial de aflatoxinas, sendo mais eficiente para teores menores. Durante a fritura por 10 minutos, a temperatura atingiu 190 C. As amostras de amendoim 7 e 8 foram fritas por 15 minutos e ficaram muito escuras, comprometendo as características sensoriais, embora as taxas de redução de aflatoxinas não mostrassem diferença significativa para os dois tempos de fritura.

Embora as matérias-primas se encontrassem contaminadas em níveis além do permitido, os amendoins fritos, que ainda se apresentavam contaminados, continham menos de 30 ppb de aflatoxina inicial (Tabela 4).

Os resultados mostraram claramente a eficiência da fritura na redução dos teores de aflatoxinas. Nenhum trabalho sobre o efeito deste processo nas aflatoxinas em amendoim foi encontrado na literatura. Escher *et alii* (1973) relataram diminuições de 65% e de 60% para pecans fritas em óleo (197 C/6 minutos) e em margarina (107 C/60 minutos), respectivamente. Stoloff e Trucksess (1981) observaram perdas de 34 a 53% de aflatoxinas em milho cozido ("grits") e frito.

4.1.3. Efeito da cocção

Outro processo que tem se mostrado bastante promissor na redução dos teores de aflatoxinas é a cocção, no qual a matéria prima é submetida à fervura em água.

Treze lotes de amendoim contaminado foram cozidos em água e o efeito deste tratamento sobre as aflatoxinas está demonstrado na Tabela 5. Para as aflatoxinas B₁, B₂ e G₁ foram obtidas reduções nos seus teores que variaram de 64,0 a 98,5% (méd-

TABELA 5 - Efeito da cocção no teor de aflatoxinas em amendoim contaminado^a.

Lotes de Amendoim		Aflatoxinas (µg/Kg) ^b				
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total
1	cru	37+7	17+3	ND ^c	ND	54
	cozido	10+2	ND	ND	ND	10
	% redução	73,0	100	--	--	81,5
2	cru	39+8	9+2	13+2	24+5	85
	cozido	14+4	ND	5	ND	19
	% redução	64,1	100	61,5	100	77,6
3	cru	50+13	20+5	14+3	8+2	92
	cozido	18+5	8+2	ND	ND	26
	% redução	64,0	60,0	100	100	71,7
4	cru	88+13	30+5	ND	ND	118
	cozido	25+3	10+3	ND	ND	35
	% redução	71,6	66,7	--	--	70,3
5	cru	89+13	27+5	44+5	26+5	186
	cozido	19+3	ND	ND	ND	19
	% redução	78,7	100	100	100	89,8
6	cru	111+20	35+6	35+2	4	184
	cozido	20+3	ND	5	ND	25
	% redução	81,8	100	88,6	100	86,4
7	cru	135+24	40+7	46+5	21+3	222
	cozido	40+7	10+3	10+2	ND	60
	% redução	70,4	75,0	78,3	100	73,0
8	cru	214+23	ND	163+49	ND	377
	cozido	16+3	ND	ND	ND	16
	% redução	92,5	--	100	--	95,7
9	cru	263+7	65+10	ND	ND	328
	cozido	5	ND	ND	ND	5
	% redução	98,5	100	--	--	98,4
10	cru	285+61	107+41	ND	ND	397
	cozido	63+13	26+5	ND	ND	89
	% redução	77,9	75,7	--	--	77,3
11	cru	302+39	102+41	ND	ND	404
	cozido	19+4	5	ND	ND	24
	% redução	93,5	96,1	--	--	94,3
12	cru	506+29	150+10	ND	ND	656
	cozido	150+15	60+8	ND	ND	210
	% redução	70,4	60,0	--	--	68,0
13	cru	690+91	115+24	ND	ND	805
	cozido	199+20	42+10	ND	ND	241
	% redução	71,2	63,5	--	--	70,0
média geral de redução		77,5	83,1	88,1	100	81,2

a- A amostra foi submetida a fervura em água por uma hora

b- Valores são médias de quatro determinações, com exceção das amostras 2,8 e 9, para as quais somente duas determinações cada foram realizadas.

c- ND: Não detectado

d- A água de cocção foi analisada e o resultado foi negativo com exceção da amostra 4 que apresentou 9 ppb de B₁ e 5 ppb de B₂.

dia de 77,5%), 60,0 a 100% (média de 83,1%), e 61,5 a 100% (média de 88,1%), respectivamente.

As reduções tenderam a ser menores do que nos outros processamentos, já que quatro amostras de amendoim cozido continham ainda mais de 30 ppb de aflatoxinas $B_1 + G_1$ e, sendo portanto, impróprias para consumo.

Analisando-se a água de cozimento das amostras, verificou-se que esta não continha aflatoxinas a níveis detectáveis, com exceção de uma amostra que apresentou água de cocção com 9 e 5 ppb de aflatoxinas B_1 e B_2 , respectivamente. Rehana *et alii* (1975) trabalhando com arroz contaminado verificaram que a água de cozimento apresentava cerca de 30% da aflatoxina B_1 inicial e no cozimento de massas alimentícias, Stollhoff *et alii* (1978) encontraram na água de cocção, 29% das aflatoxinas iniciais.

No Nordeste Brasileiro, como em alguns países tropicais da África e Ásia, o amendoim é fervido em água com ou sem sal. O cozimento do amendoim neste trabalho apresentou perda média de 81,2% das aflatoxinas totais. Farah *et alii* (1983) constataram redução de 32 a 37% para amendoim cozido com água, e de 80 a 100% para amendoim cozido em água contendo 5% de cloreto de sódio. Essa conclusão foi baseada, porém, na análise de 5 amostras cozidas com sal e apenas duas cozidas em água sem sal.

No presente estudo, quatro amostras de amendoim contaminado foram cozidas com 5% de sal e a taxa de redução foi de 77,9 a 86,1% (média de 81,7%) e de 74,2 a 83,6% (média de 78,5%) para as aflatoxinas B_1 e B_2 , respectivamente (Tabela 6). Não foi detectada a presença de aflatoxinas na água de cozimento das amostras.

TABELA 6 - Efeito da cocção em 5% de sal sobre as aflatoxinas em amendoim contaminado^a

Lotes de Amendoim		Aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) ^b		
		B ₁	B ₂	Total
1	cru	113+28	43+17	156
	cozido	25+ 7	10+ 6	35
	% redução	77,9	76,7	77,6
2	cru	160+29	34+10	194
	cozido	28+ 8	7+ 2	35
	% redução	82,5	79,4	82,0
3	cru	194+31	55+18	249
	cozido	27+ 4	9+ 4	36
	% redução	86,1	83,6	85,5
4	cru	271+78	89+21	360
	cozido	54+17	23+10	77
	% redução	80,1	74,2	78,6
média		81,7	78,5	80,9

^a - Água de cocção não apresentou aflatoxinas em níveis detectáveis.

^b - Valores são médias de duas determinações.

Comparando os resultados obtidos com o cozimento em água (Tabela 5) e em solução salina (Tabela 6) observa-se que o sal não teve influência significativa na redução da contaminação do amendoim, ao contrário do resultado obtido por Farah *et alii* (1983). Stoloff e Trucksess (1981), em milho cozido com sal, encontraram redução de 28% de aflatoxina B₁.

Perante os resultados obtidos, a torração a 190 C e fritura (temperatura atingida 190 C) em escala de laboratório, apresentaram taxas de redução maiores que aquelas obtidas pelo cozimento em água (temperatura de 98 C), torração em escala industrial (temperatura de 134 C) e a 130 C no laboratório, embora os três últimos processos tenham sido efetuados em tempo bem maior (uma hora). Portanto, a temperatura é o fator determinante na efetividade do processo térmico na destruição de aflatoxinas.

Em termos práticos, os resultados mostraram que o processamento térmico em condições adequadas serve para diminuir ou até eliminar eficientemente o problema de contaminação por aflatoxinas, desde que a matéria-prima não esteja exageradamente contaminada. Especialmente considerando que há uma diluição da quantidade de amendoim na fabricação dos seus produtos, os altos teores de aflatoxina em amendoim e seus produtos relatados por vários pesquisadores brasileiros (Pregnotato e Sabino, 1969/1970; Fonseca e Del Nery, 1970; Sabino, 1980, Sabino *et alii*, 1982; Prado, 1984; Scussel e Rodriguez-Amaya, 1985), é um reflexo da contaminação elevada do amendoim "in natura", seja por contaminação no campo ou na estocagem. O nível de contaminação poderia ser significativamente reduzido se as indústrias empregassem equipamentos de torração que atingissem temperatura

mínima de 190 C. Isto associado a um controle mais adequado a nível do campo, transporte e estocagem, levaria à existência de produtos de amendoim saudáveis, próprios para consumo.

4.2. Estudo In Vitro da Susceptibilidade de Quatro Cultivares de Milho

O milho é um cereal largamente consumido no país e, de pois do amendoim, o alimento mais citado na literatura como sen do altamente susceptível à contaminação por aflatoxinas (Yahl *et alii*, 1971; Lillehoj *et alii*, 1975a e b, 1976, 1978, 1980; Hunt *et alii*, 1976; Balzer *et alii*, 1977; McMillian *et alii*, 1980). Vários trabalhos mostraram que a contaminação do milho ocorre no campo tanto, antes, como após a colheita, bem como durante a estocagem (Rambo *et alii*, 1975; Shotwell *et alii*, 1975a e b; Ben nett e Anderson, 1978; Karki *et alii*, 1979).

No estado de São Paulo, os levantamentos realizados in dicam que o milho apresenta índice de contaminação muito baixo. Isso não significa, no entanto, que o problema não exista em ou tros Estados nos quais o clima e as condições de plantio, co lheita e estocagem são diferentes às de São Paulo. Mesmo em São Paulo, as condições podem variar de um ano para outro, mudando também o panorama em termos de contaminação por aflatoxinas.

Alguns trabalhos tem sido relatados sobre novos híbri dos de milho e amendoim que incorporam fatores de resistência às variações climáticas e ao ataque de insetos e fungos, na palha, na vagem, ou mesmo na composição química da semente (Mixon e Ro gers, 1973; Amaya *et alii*, 1977, 1980; Wilson *et alii*, 1977; Calvert *et alii*, 1978; Souza *et alii*, 1978; Gorelova e Lvova, 1980; Lillehoj e Zuber, 1981). Estudos comparativos mostraram diferenças significativas quanto à resistência de híbridos de milho à contaminação por aflatoxinas (Nagarajan e Bhat, 1972; La Prade e Manwiller, 1976, 1977). Portanto, a utilização de híbri

dos resistentes é considerada como meio de controlar a incidência destas toxinas nos produtos.

No presente trabalho, quatro híbridos de milho, com composição química distinta, foram submetidos à inoculação com fungos aflatoxigênicos para verificar a influência da composição química de grãos sobre a capacidade do fungo invadir e produzir suas toxinas.

Para o estudo em questão foram realizados dois ensaios com *Aspergillus flavus* e três ensaios com *Aspergillus parasiticus*. As amostras foram analisadas durante um período de seis semanas de incubação a 30 C e umidade relativa de 90%. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7-11. Para uma melhor visualização das mudanças ocorridas em função dos teores de B_1 e G_1 , as mais tóxicas, estão também apresentados nas Figuras 2-6.

4.2.1. Produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*

Os dois ensaios com *Aspergillus flavus* mostraram claramente a maior susceptibilidade à produção de aflatoxinas dos cultivares Maia Normal e Opaco (Tabelas 7 e 8, Figuras 2 e 3). Nos dois ensaios, ambos os cultivares registraram uma fase de produção significativa de toxinas, seguida por outra de diminuição. No primeiro experimento, utilizando concentrações de 10^7 esporos/g (Tabela 7), os cultivares Normal e Opaco atingiram maior produção de aflatoxinas e tanto o aumento como a queda dos teores de aflatoxinas foram mais súbitos do que no segundo ensaio (Tabela 8), onde 10^6 esporos/g foram inoculados.

O cultivar Maya Opaco apresentou máxima produção após

TABELA 7 - Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus flavus* e estocados em estufa^a. (1º ensaio)

Cultivar	Tempo de Incubação (Dias)	Aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) ^b			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Maya Normal	0	ND ^c	ND	ND	ND
	15	291	ND	845	56
	19	355	ND	1239	143
	22	1210	ND	3622	322
	26	476	15	1190	118
	30	410	52	1172	79
	42	324	77	690	56
Maya Opaco	0	ND	ND	ND	ND
	15	484	ND	1570	142
	19	877	ND	2896	640
	22	1815	ND	3622	738
	26	953	119	2857	357
	30	1172	147	2930	440
	42	884	155	2550	293
Doce Cubano	0	ND	ND	ND	ND
	15	ND	ND	ND	ND
	19	81	ND	ND	ND
	22	163	ND	302	66
	26	138	ND	256	35
	30	395	33	513	98
	42	183	32	350	88
Nutrimaiz (Opaco-Doce)	0	ND	ND	ND	ND
	15	134	ND	1035	30
	19	265	ND	715	67
	22	114	ND	302	33
	26	156	35	476	119
	30	197	49	366	92
	42	148	57	307	82

^a- Condições: 30 C e umidade relativa de 90%. Concentração de 10^7 esporos/g.

^b- Valores são médias de duas determinações.

^c- ND: Não detectável.

TABELA 8 - Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus flavus* e estocados em estufa^a. (2º ensaio)

Cultivar	Tempo de Incubação (Dias)	Aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) ^b			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Maya Normal	0	ND ^c	ND	ND	ND
	7	110	ND	225	31
	14	528	14	1457	177
	24	588	38	2990	227
	30	1457	20	2817	220
	40	1007	386	3241	150
	48	846	184	2615	433
Maya Opaco	0	ND	ND	ND	ND
	7	128	ND	302	64
	14	406	ND	1457	136
	24	677	52	2491	231
	30	729	12	3923	152
	40	774	79	2305	184
	48	758	148	2092	320
Doce Cubano	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND
	24	ND	ND	5	ND
	30	7	ND	100	ND
	40	7	ND	64	ND
	48	128	ND	102	5
Nutrimaiz	0	ND	ND	ND	ND
	7	101	24	5	ND
	14	73	14	170	16
	24	240	14	528	64
	30	614	22	963	182
	40	793	73	767	173
	48	645	39	733	120

^a- Condições: 30 C e umidade relativa de 90%. Concentração de 10^6 esporos/g.

^b- Valores são médias de duas determinações

^c- ND: Não detectado.

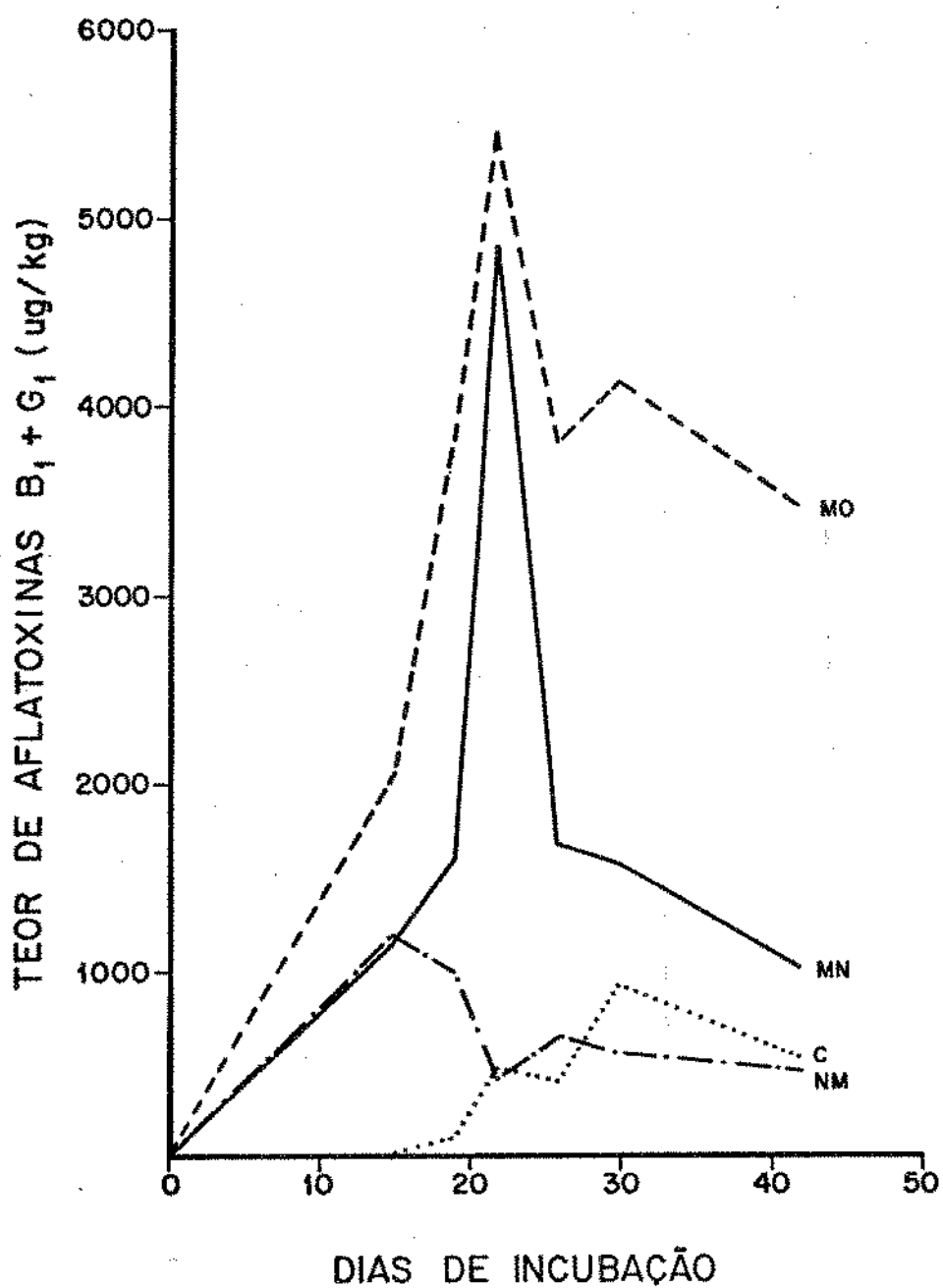


FIGURA 2 - Primeiro ensaio - Variação dos teores de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus flavus* e incubados a 30 C e umidade relativa de 90%.
(MN: Maya Normal; MO: Maya Opaco; C: Cubano; NM: Nutrimaiz).

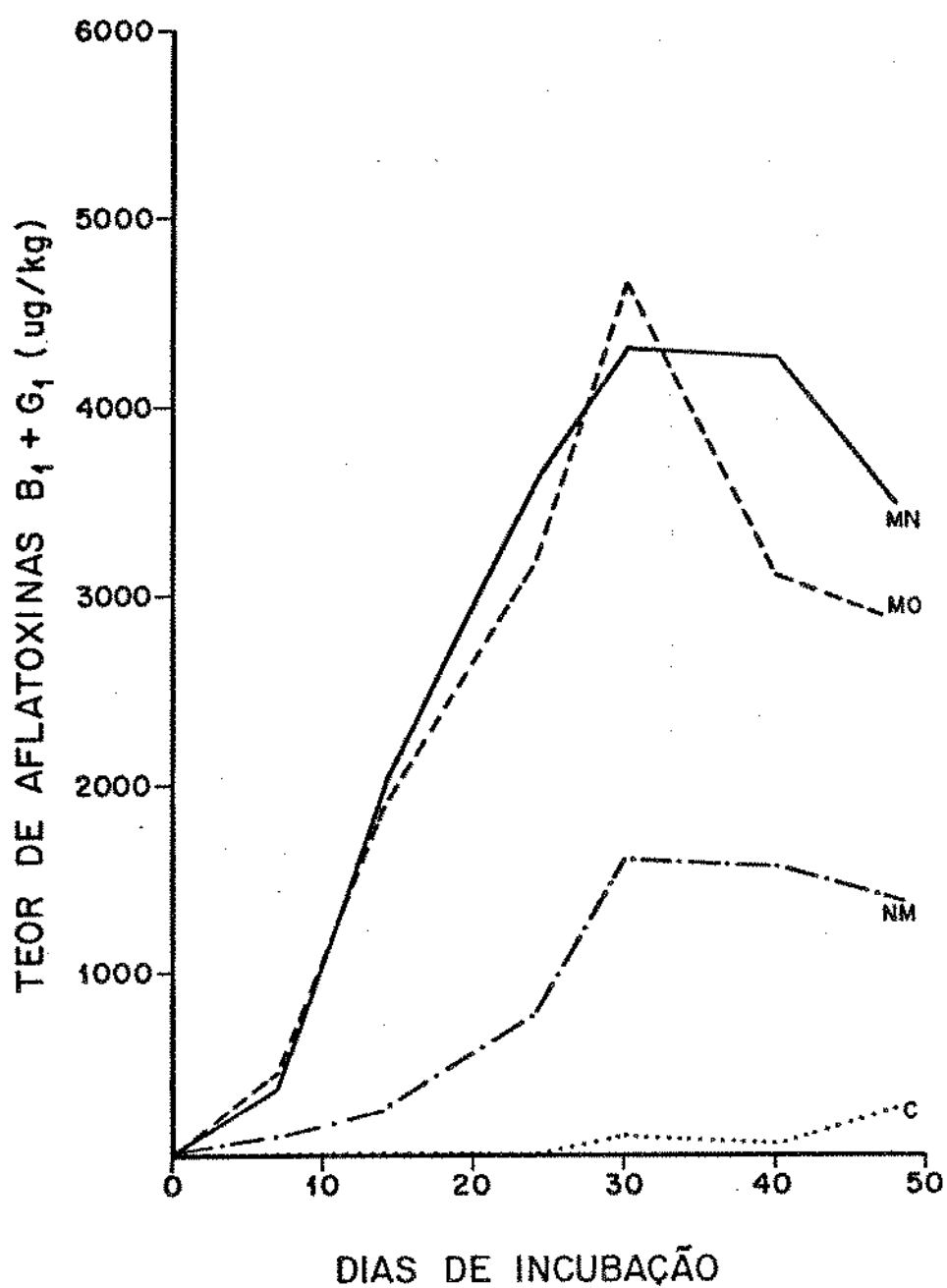


FIGURA 3 - Segundo ensaio - Variação dos teores de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus flavus* e incubados a 30 °C e umidade relativa de 90%.
(MN: Maya Normal; MO: Maya Opaco; C: Cubano; NM: Nutrimaiz).

22 dias (1815 ppb de B₁ e 3622 ppb de G₁) e 30 dias de inoculação (729 ppb de B₁ e 3923 ppb de G₁) no primeiro e segundo experimento, respectivamente e, no final do período de incubação o teor de aflatoxinas totais teve decréscimo médio de 38% em ambos os casos. Já o cultivar Normal, que também mostrou formação máxima de aflatoxinas no mesmo período (1210 ppb de B₁ e 3622 ppb de G₁ e, 1457 ppb de B₁ e 2817 ppb de G₁, respectivamente no primeiro e segundo ensaio), no final do primeiro ensaio apresentou diminuição média de 79% das aflatoxinas totais ao passo que no segundo, a diminuição foi de apenas 19%.

O Cubano, que mostrou ser o mais resistente ao crescimento do fungo e à formação de aflatoxinas em ambos os experimentos, só iniciou a produção de toxinas, em pequenas quantidades, após 19 (81 ppb de B₁ e 302 ppb de G₁) e 30 dias (7 ppb de B₁ e 100 ppb de G₁), respectivamente nos dois ensaios. O cultivar Nutrimaiz atingiu no primeiro experimento produção máxima de aflatoxinas após 19 dias de incubação (134 ppb de B₁ e 1035 ppb de G₁), só que em quantidades menores do que aquelas verificadas no segundo experimento, quando atingiu produção máxima entre 30 e 40 dias de incubação (793 ppb de B₁ e 767 ppb de G₁).

4.2.2. Produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*

Os três ensaios realizados utilizando-se inóculos de 10⁷ esporos/g de *Aspergillus parasiticus* nas mesmas condições que os experimentos com *Aspergillus flavus*, também mostraram a maior susceptibilidade do cultivar Maya Normal (Tabela 9, 10 e 11, Figuras 4, 5 e 6). A produção de aflatoxinas neste cultivar foi grande, embora em quantidades variáveis. No terceiro experi

TABELA 9 - Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus parasiticus* e estocados em estufa^a (3º ensaio).

Cultivar	Tempo de Incubação (Dias)	Aflatoxinas (µg/Kg) ^b			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Maya Normal	0	ND ^c	ND	ND	ND
	7	260	28	403	74
	14	557	77	789	187
	21	2059	190	4564	590
	28	2632	295	5085	752
	35	3176	697	4524	815
	42	3319	901	3963	869
Maya Opaco	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND
	21	8	ND	9	ND
	28	30	ND	19	ND
	35	41	--	52	--
	42	75	--	72	--
Doce Cubano	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND
	21	17	ND	10	ND
	28	90	ND	82	ND
	35	284	7	286	33
	42	370	11	397	42
Nutrimaiz	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND
	21	11	ND	52	ND
	28	30	ND	82	ND
	35	48	--	95	11
	42	85	--	112	14

^a- Condições: 30° C e umidade relativa de 90%. Concentração de 10⁷ esporos/g.

^b- Valores são médias de duas determinações

^c- ND: Não detectado

TABELA 10 - Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus parasiticus* e estocados em estufa^a. (4º ensaio).

Cultivar	Tempo de Incubação (Dias)	Aflatoxinas (µg/Kg) ^b			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Maya Normal	0	ND ^c	ND	ND	ND
	7	70	ND	75	ND
	14	360	ND	374	ND
	21	371	ND	501	64
	28	637	117	491	156
	35	1582	195	1642	253
	42	1933	239	2005	280
Maya Opaco	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND
	21	20	ND	20	ND
	28	28	ND	30	ND
	35	77	10	93	24
	42	99	15	103	37
Doce Cubano	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND
	21	7	ND	10	ND
	28	45	7	47	ND
	35	159	11	165	11
	42	193	20	217	24
Nutrimaiz	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND
	21	16	ND	21	ND
	28	31	ND	30	ND
	35	45	ND	39	ND
	45	88	ND	103	ND

^a- Condições: 30 C e umidade relativa de 90%. Concentração de 10⁷ esporos/g.

^b- Valores são médias de duas determinações.

^c- ND: Não detectado.

TABELA 11 - Produção de aflatoxinas em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus parasiticus* e estocados em estufa^a (5º ensaio).

Cultivar	Tempo de Incubação (Dias)	Aflatoxinas (µg/Kg) ^b			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Maya Normal	0	ND ^c	ND	ND	ND
	7	77	4	129	16
	14	213	18	344	43
	21	729	113	1457	80
	35	1470	132	1451	96
	42	1607	173	1552	221
Maya Opaco	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	18	ND	ND	ND
	21	111	10	106	13
	35	454	27	135	25
	42	660	101	376	96
Doce Cubano	0	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND
	21	ND	ND	ND	ND
	35	172	16	40	4
	42	280	32	254	59
Nutrimaiz ^d					

^a- Condições: 30 C e umidade relativa de 90%. Concentração de 10⁷ esporos/g.

^b- Valores são médias de duas determinações.

^c- ND: Não detectado

^d- O cultivar Nutrimaiz foi excluído deste experimento por se apresentar contaminado com aflatoxinas, antes da incubação com o fungo; ver Tabela 12.

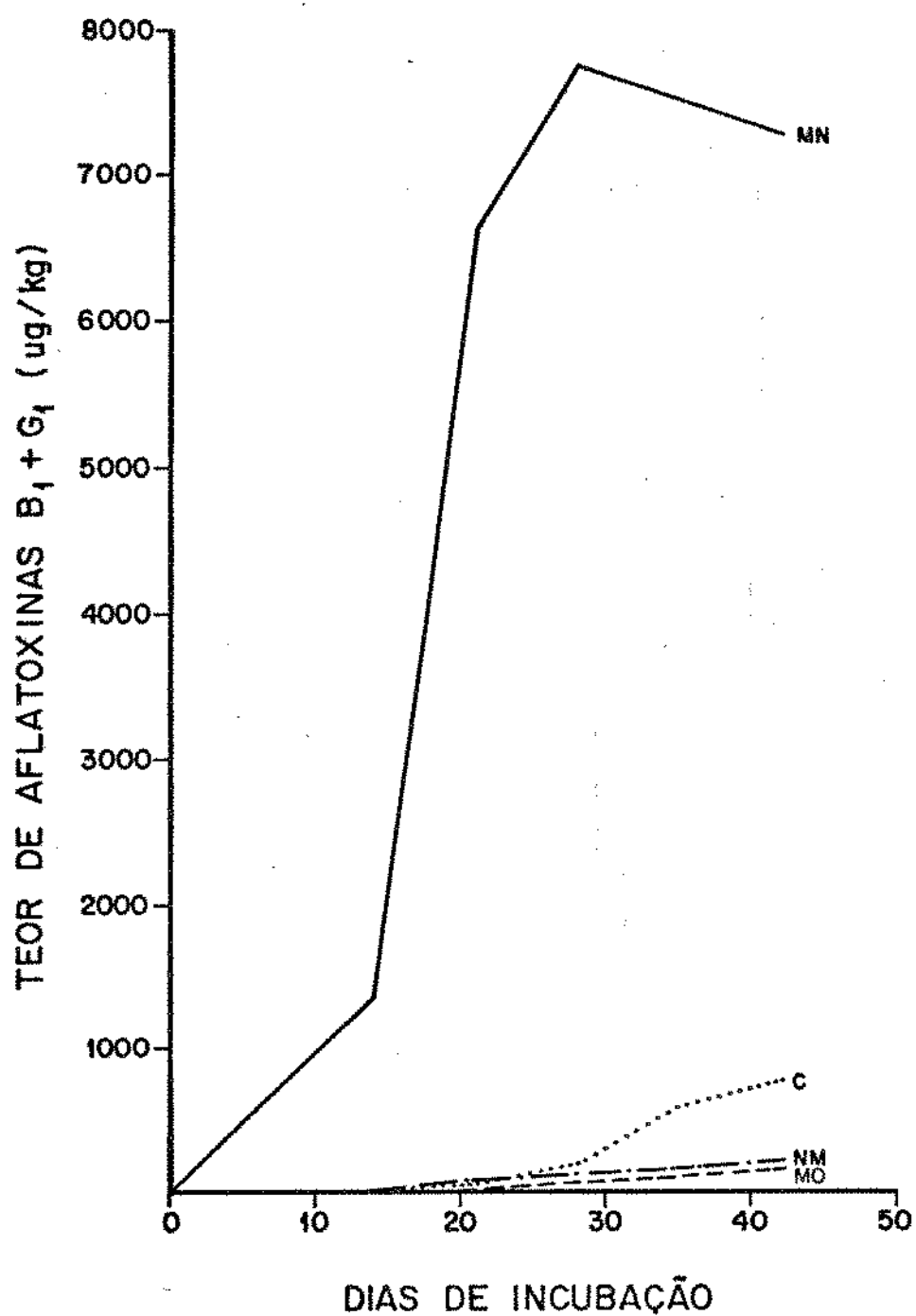


FIGURA 4 - Terceiro ensaio - Variação dos teores de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus parasiticus* e incubados a 30 C e umidade relativa de 90%.
(MN: Maya Normal; MO: Maya Opaco; C: Cubano; NM: Nutrimaiz).

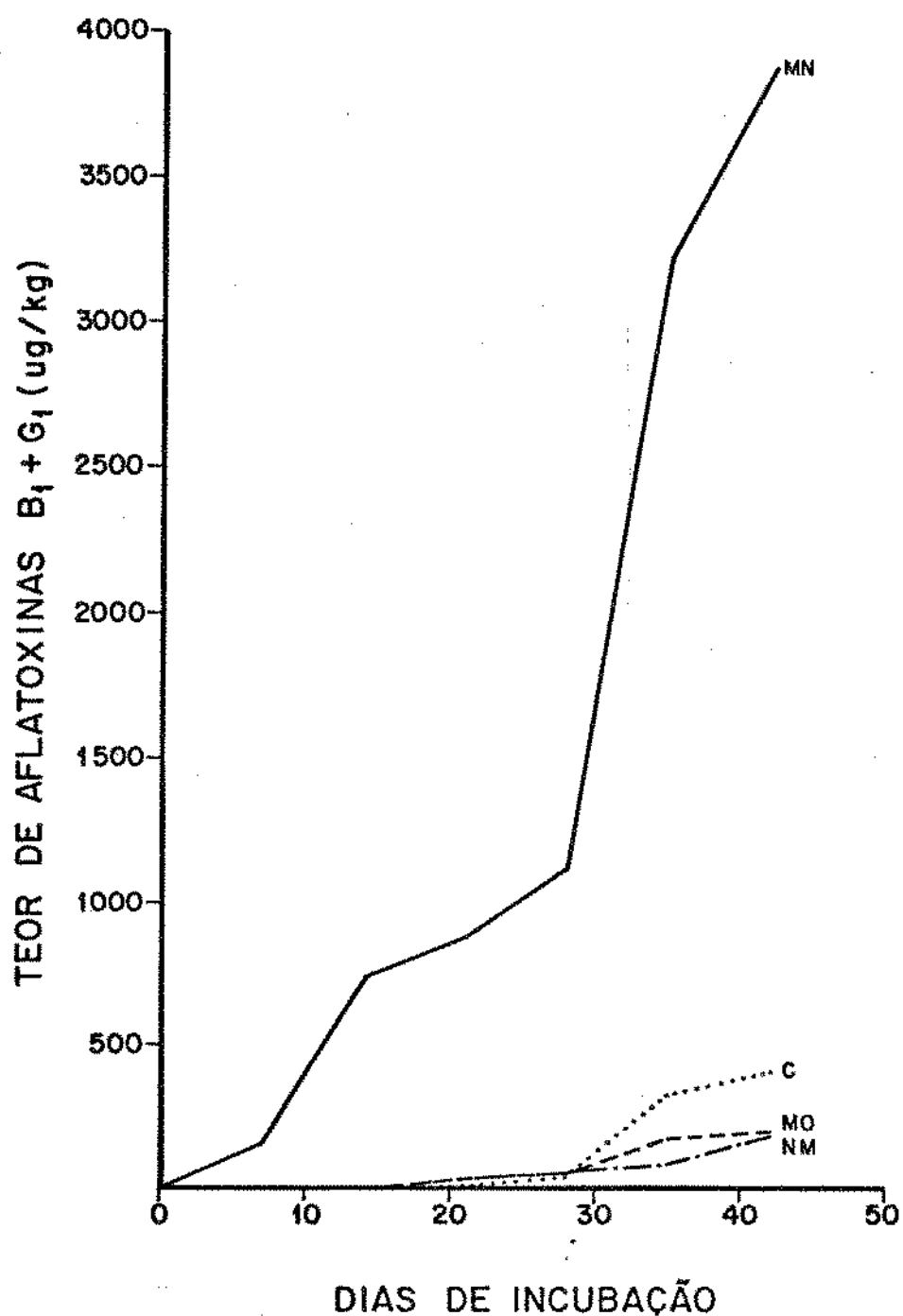


FIGURA 5 - Quarto ensaio - Variação dos teores de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus parasiticus* e incubados a 30 °C e umidade relativa de 90%.
(MN: Maya Normal; MO: Maya Opaco; C: Cubano; NM: Nutrimaiz).

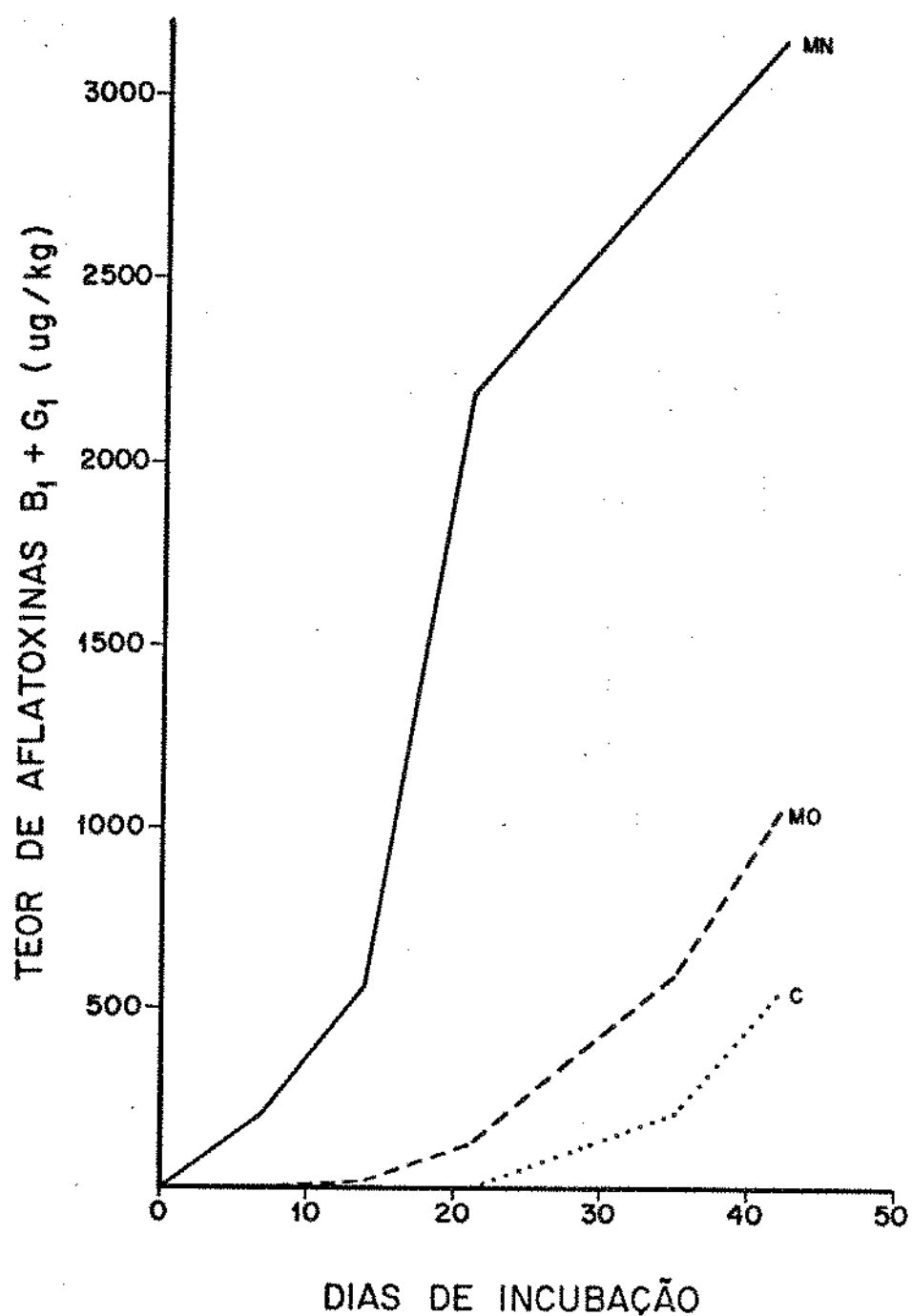


FIGURA 6 - Quinto ensaio - Variação dos teores de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) em quatro cultivares de milho inoculados com *Aspergillus parasiticus* e incubados a 30 C e umidade relativa de 90%.
(MN: Maya Normal; MO: Maya Opaco; C: Cubano; NM: Nutrimaiz).

mento, o teor de toxinas atingiu um máximo após 35 dias de incubação (3176 ppb de B₁ e 4524 ppb de G₁). No quarto e quinto ensaios a produção encontrava-se ainda em elevação após 42 dias de incubação (1933 ppb de B₁ e 2005 ppb de G₁ e, 1607 ppb de B₁ e 1552 ppb de G₁, respectivamente).

No terceiro e quarto experimentos, os cultivares Maya Opaco, Cubano e Nutrimaiz só iniciaram a produção de aflatoxinas após 21 dias de incubação e, mesmo assim, em quantidades bem pequenas. O Cubano apresentou uma produção ligeiramente maior do que os outros dois cultivares.

No quinto ensaio, o cultivar Cubano mostrou a mesma baixa produtividade que nos ensaios anteriores, enquanto que, o cultivar Opaco, que vinha se apresentando um pouco menos suscetível que o próprio Cubano, modificou sua condição neste último experimento. O Nutrimaiz não foi inoculado nesse último experimento pois já se encontrava naturalmente contaminado no campo com aflatoxinas, e com crescimento visível de fungos (Tabela 12).

Somando os resultados tanto com *Aspergillus flavus* como *Aspergillus parasiticus*, não resta a menor dúvida que nas condições do estudo in vitro, o cultivar Normal apresentou-se como o mais suscetível à contaminação com aflatoxinas. O cultivar Opaco demonstrou praticamente a mesma susceptibilidade somente com *Aspergillus flavus*, o fungo naturalmente encontrado em milho. Já o Cubano foi o cultivar que mostrou a menor susceptibilidade à contaminação por aflatoxinas, enquanto que o Nutrimaiz apresentou susceptibilidade intermediária ou semelhante à do Cubano.

Os resultados também mostraram que esse tipo de estudo é bastante difícil de se executar e interpretar, uma vez que,

TABELA 12 - Teores de aflatoxinas encontrados no cultivar Nutri
maiz naturalmente contaminado^a.

Amostras	Aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) ^b	
	B ₁	B ₂
1	145 $\pm$ 17	5
2	104 $\pm$ 20	9 $\pm$ 2
3	95 $\pm$ 19	5
4	69 $\pm$ 13	5
5	36 $\pm$ 8	5
6	8 $\pm$ 2	ND ^c
7	5	5
8	5	ND
9	ND	ND
10	ND	ND

^a- Não foram detectadas aflatoxinas G.

^b- Valores são medidas de duas determinações

^c- ND: Não detectado

mesmo tentando-se manter as condições o mais constantes possíveis, alguns fatores ainda escapam o nosso controle, produzindo-se variações inesperadas. Um exemplo é a inversão das susceptibilidades do Opaco e do Cubano, no último experimento. Parece razoável pensar que o comportamento mais estável dos cultivares Normal e Cubano frente às variações do Opaco e Nutrimaiz sejam pelo menos em parte devido à maior estabilidade das características genética dos dois primeiros.

4.2.3. Efeito da composição do milho

Os resultados encontrados mostraram que os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* produzem efeitos próprios de cada espécie quando inoculados em milho.

O comportamento marcadamente diferente do cultivar Maya Normal em relação aos outros cultivares, todos produzidos sob as mesmas condições no campo experimental do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, leva a crer que a composição dos grãos tem efeito definitivo na produção das aflatoxinas. No entanto, o valor nutricional, de acordo com a avaliação realizada com ratos através de outros estudos (Sgarbieri *et alii*, 1977), indica que a melhor composição nutricional do substrato não está correlacionada com a melhor utilização pelo fungo na produção de sua toxina. Afinal, não era de se esperar que as exigências nutricionais dos dois tipos de fungos fossem as mesmas.

Sgarbieri *et alii* (1977, 1982) e Silva *et alii* (1978) estudaram a composição química desses cultivares relacionando-os entre si. Em relação ao Maya Normal, os outros cultivares diferenciam-se da seguinte maneira: o cultivar Cubano apresenta

teores elevados de açúcares solúveis e de lipídeos totais e o Opaco, teores elevados de lisina e triptofano. Finalmente, o Nutrimaiz possui teores mais altos de lisina, triptofano, açúcares solúveis e lipídeos totais; características estas resultantes do cruzamento Opaco X Cubano. Uma outra característica associada ao alto teor de lisina (e triptofano) do milho Opaco é o maior teor de aminoácidos livres (nitrogênio solúvel) extratáveis do grão. A presença dessa característica confirmou-se no duplo mutante Nutrimaiz (Tabela 13) porém, na avaliação global, não foi observada correlação alguma entre a característica e a produção de toxina.

Para melhor avaliar a susceptibilidade dos quatro cultivares de milho foram determinados, portanto, os nutrientes livres do chamado "pool". Os teores de açúcares totais e redutores, aminoácidos, ácidos graxos livres, e alguns metais foram quantificados.

4.2.3.1. Efeito dos aminoácidos livres

Os principais aminoácidos livres presentes nos quatro cultivares de milho foram prolina, ácido glutâmico e aspártico, alanina e asparagina (Tabela 14). No entanto, em cada cultivar esses aminoácidos aparecem em quantidades diferentes.

De um modo geral, os cultivares Cubano e Normal destacaram-se pelo baixo conteúdo de aminoácidos livres em relação aos níveis exibidos pelos cultivares Opaco e Nutrimaiz.

Comparando a composição em aminoácidos livres dos cultivares Normal e Opaco, os dois melhores substratos para a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*, com a composi-

TABELA 13 - Teores totais de compostos aminados solúveis (amino ácidos livres e peptídeos) dos quatro cultivares de milho^a.

Cultivares	Concentração (μ equivalentes/g) ^b
Maya Normal	74,0
Maya Opaco	162,5
Doce Cubano	72,0
Nutrimaiz	160,0

^a- Média de duas determinações.

^b- Os valores são expressos em μ equivalentes de ácido glutâmico por grama de produto.

ção do Cubano (que foi o menos favorável à produção) verificamos que enquanto o cultivar Normal apresentou teores mais baixos que o Cubano em prolina e ácidos aspártico e glutâmico, o Opaco registrou teores bem maiores desses aminoácidos. Desta forma é possível ver a ausência de uma estrita relação entre esses aminoácidos e a produção das toxinas.

Da composição do extrato de aminoácidos livres conclui-se porém que aparentemente o nível de metionina livre influi positivamente na bioprodução de aflatoxinas pelo *Aspergillus parasiticus*. O cultivar Normal, sendo o melhor substrato, possui o maior teor de metionina. Já para o *Aspergillus flavus*, a quantidade de metionina livre teve efeito menos marcante, pois entre os melhores substratos, cultivares Normal e Opaco, esse último possui apenas traços.

Uma diferença marcante entre o Cubano, e os outros cultivares, foi a deficiência de certos aminoácidos essenciais no seu extrato, a saber: metionina, glutamina e fenilalanina (não detectado) e quantidades apenas detectáveis de treonina, valina, isoleucina e leucina.

Por outro lado, se a deficiência geral de aminoácidos de cadeia lateral ramificada tem algum efeito desestimulante na biossíntese das toxinas no cultivar Cubano, altos teores dos mesmos também não parecem necessariamente levar à maior produção, já que o Nutrimaiz, por exemplo, possui teores maiores de isoleucina e leucina em relação ao Normal, sendo porém um substrato inferior a este último. Já observando os níveis de valina poder-se-ia concluir que esse aminoácido exerce alguma influência positiva na bioprodução de toxinas pelos dois fungos.

A presença de asparagina parece não ter exercido in-

TABELA 14 - Composição aproximada em aminoácidos livres de quatro cultivares de milho no estágio seco.

Aminoácidos (µg/g farelo)	Maya Normal	Maya Opaco	Cubano	Nutrimaiz
Ácido aspártico	136,6	675,6	120,6	190,6
Treonina	9,0	25,9	traços	10,2
Serina	16,4	32,6	19,4	33,2
Asparagina	1302,8	4693,9	1265,3	4755,4
Ácido glutâmico	136,7	346,9	202,7	237,6
Glutamina	6,9	11,5	ND	48,4
Prolina	393,3	1277,7	218,4	572,7
Glicina	21,0	39,8	8,9	19,7
Alanina	87,2	252,8	56,2	168,8
Valina	53,0	33,2	traços	18,9
1/2 cistina	18,9	43,6	21,2	38,8
Metionina	2,2	traços	ND	traços
Isoleucina	4,5	8,9	traços	5,7
Leucina	4,6	7,6	traços	6,5
Tirosina	28,2	75,5	26,8	69,7
Fenilalanina	7,3	16,5	ND	13,0
Lisina	26,6	197,0	17,6	68,8
Histidina	22,0	55,6	14,1	45,2
Arginina	82,8	379,8	51,3	
Total	2350,0	8174,4	2022,5	6303,2

^a- ND: Não detectado

fluência alguma na síntese de aflatoxinas enquanto que a glutamina pode ter tido um certo efeito pois esse aminoácido somente não foi detectado no cultivar Cubano, ou seja, o substrato menos produtor para ambos os fungos.

4.2.3.2. Efeito dos ácidos graxos livres

Os cultivares Nutrimaiz e Maya Opaco apresentaram teores altos de lipídeos totais, enquanto que, em termos de ácidos graxos livres, os cultivares Nutrimaiz e Cubano foram os que mostraram os maiores teores (Tabela 15).

Os principais ácidos graxos livres presentes nos quatro cultivares foram o oléico e o linoléico, estando praticamente na mesma proporção, variando somente as quantidades dos ácidos graxos livres em cada cultivar.

Com respeito à produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* houve correlação entre o teor de ácidos graxos insaturados como oléico e linoléico, e a síntese de aflatoxinas. Segundo Priyadarhini e Tulpule (1980), os ácidos graxos insaturados tem efeito inibidor e o cultivar Normal, que mostrou menor teor desses ácidos graxos, foi praticamente o único produtor de aflatoxinas.

Para o *Aspergillus flavus* a mesma relação se verificou entre o Normal e o Cubano. Por outro lado, o Normal e o Opaco, cultivares de produção semelhante em relação às toxinas, tiveram também composição semelhante de ácidos graxos. Quanto ao Nutrimaiz, o quadro é um pouco mais complexo, já que o mesmo exibiu maiores teores de ácidos graxos tanto insaturados como saturados, fato que possivelmente explicaria a produção intermediária do cultivar.

TABELA 15 - Teor de lipídeos totais de quatro cultivares de milho e a composição aproximada de ácidos graxos livres.

Composição (%)				
	Normal	Opaco	Cubano	Nutrimaiz
Lipídeos totais ^a	4,84	7,32	5,71	7,68
Ácidos graxos livres totais ^b	8,82	8,10	14,73	19,20
Ácidos graxos livres (mg/g)				
Palmítico (C _{16:0})	0,64	0,94	1,26	1,76
Esteárico (C _{18:0})	0,09	0,06	0,17	2,94
Oléico (C _{18:1})	1,46	1,95	2,94	5,29
Linoléico (C _{18:2})	2,04	2,89	3,95	7,20
Gadoléico (C _{20:1})	0,06	0,06	0,08	0,15

^a - Percentagem em base úmida

^b - Percentagem de ácidos graxos livres é expressa em termos de ácido oléico.

4.2.3.3. Efeito de alguns metais

O cultivar Normal apresentou teores baixos de zinco, ferro, manganês e cobre, em relação aos demais cultivares. Já o Opaco continha teores maiores de zinco, manganês e ferro. O Nutrimaiz, por sua vez, mostrou valores altos apenas de zinco e manganês e o Cubano, teores altos de ferro e cobre, porém baixos de manganês e zinco (Tabela 16).

Em geral, a literatura sobre o efeito de traços de metais na produção de aflatoxinas é pouco clara. Apenas a exigência de zinco é fato comprovado, ainda que sem se chegar a um consenso quanto ao nível. Para meios líquidos, por exemplo, as exigências são aparentemente menores (Mateles e Adye, 1965; Lee *et alii*, 1966; Davi *et alii*, 1967) do que para meios sólidos (Lillehoj *et alii*, 1974).

Pelos resultados apresentados na Tabela 16, podemos constatar que todos os cultivares possuem zinco em concentrações dentro da faixa adequada para produção em meios sólidos, não podendo, no entanto, se fazer qualquer afirmação sobre a maior ou menor tendência à produção de qualquer um deles.

Com respeito aos outros minerais, poder-se-ia apenas sugerir que o maior teor de cobre no Cubano estaria relacionado com a baixa capacidade desse cultivar em servir de meio para produção das toxinas, como já foi relatado por Lillehoj *et alii* em meio de germe de milho (1974).

4.2.3.4. Efeito de composição em açúcares

O conteúdo de açúcares tanto redutores como totais

TABELA 16 - Teores de zinco, ferro, manganês e cobre encontrados nos quatro cultivares de milho.

Cultivar	Zinco (ppm)	Manganês (ppm)	Ferro (ppm)	Cobre (ppm)
Maya Normal	50,0	4,3	11,0	4,8
Maya Opaco	102,0	7,2	23,6	4,8
Cubano	48,0	5,2	16,4	18,3
Nutrimaiz	77,0	8,5	11,8	5,5

mostrou correlação inversa no caso dos cultivares Normal e Cubano, não importando a espécie do fungo.

Para avaliar o comportamento dos outros dois cultivares foi mister considerar a espécie do fungo já que houve similaridade no teor dos açúcares redutores entre os cultivares Normal e Opaco. No caso do *Aspergillus flavus*, os dois cultivares se enquadraram na mesma correlação negativa já observada para o Normal e o Cubano (Figuras 2 e 3). Quando o fungo usado foi o *Aspergillus parasiticus*, teores baixo, intermediário e alto de açúcares (Opaco, Nutrimaiz e Cubano, respectivamente) não expressaram maior diferença na produção das toxinas (Figuras 4, 5 e 6).

Considerando que as exigências nutricionais das duas espécies de fungo não são necessariamente iguais, pode-se concluir que o teor de açúcares redutores e/ou totais correlaciona inversamente com a capacidade do saprófita natural do milho, o *Aspergillus flavus*, de produzir aflatoxinas.

Os relatos existentes na literatura relacionam o efeito de açúcares individuais, como glicose, sacarose, frutose, galactose, rafinose entre outros, sobre a produção das aflatoxinas em meios sintéticos por *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* (Mateles e Adye, 1965; Davis *et alii*, 1967, Davis e Diener, 1968; Abdollahi e Buchanan, 1981).

Para resumir os efeitos da composição, foi elaborada uma listagem dos nutrientes, entre aminoácidos, ácidos graxos, minerais e açúcares, que parecem ter maior influência na produção de toxinas e, posteriormente, obtidos os coeficientes de correlação entre a produção média de toxinas no período de maior acúmulo e a concentração de cada um dos nutrientes. A Tabela 18

TABELA 17 - Teores de açúcares redutores e totais nos quatro cultivares de milho.

	Composição (%) ^a			
	Normal	Opaco	Cubano	Nutrimaiz
Açúcares totais	2,79	3,36	5,54	4,30
Açúcares redutores	0,54	0,40	1,44	0,92

^a - Percentagem em base úmida.

TABELA 18 - Coeficientes de correlação entre a produção de aflatoxinas e aqueles nutrientes do milho que aparentemente tiveram alguma influência no nível médio de toxinas encontrado entre o vigésimo e o quadragésimo dia de incubação.

Nutriente	Coeficientes de correlação (r)	
	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Metionina	+ 0,41	+ 1,00
Glutamina	- 0,20	- 0,33
Fenilalanina	+ 0,64	- 0,19
Treonina	+ 0,82	- 0,14
Valina	+ 0,83	+ 0,79
Isoleucina	+ 0,78	- 0,06
Leucina	+ 0,68	- 0,03
Ácido palmítico	- 0,70	- 0,73
Ácido esteárico	- 0,42	- 0,38
Ácido oléico	- 0,65	- 0,60
Ácido linolêico	- 0,62	- 0,61
Zinco	+ 0,52	- 0,47
Ferro	- 0,40	- 0,52
Manganês	- 0,06	- 0,72
Cobre	- 0,74	- 0,33
Açúcares totais	- 0,90	- 0,66
Açúcares redutores	- 0,96	- 0,40

mostra os coeficientes de correlação tanto para os experimentos com *Aspergillus parasiticus* como com *Aspergillus flavus*.

De um modo geral, e sem considerar separadamente cada cultivar, podemos observar que a metionina mostrou alta correlação positiva com a produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*, indicando que a presença desse aminoácido influenciou positivamente. Já para o *Aspergillus flavus* a correlação foi fraca, mostrando que a metionina parece não ter o mesmo efeito estimulador sobre essa espécie de fungo em milho.

Os aminoácidos fenilalanina, treonina, valina, isoleucina e leucina apresentaram efeito positivo na síntese de toxinas por *Aspergillus flavus* enquanto que, para o *Aspergillus parasiticus* somente a valina mostrou correlação positiva. A glutamina não mostrou correlação alguma com a produção de aflatoxinas por ambos os fungos.

Os ácidos graxos livres, tanto saturados como insaturados, mostraram correlação negativa, isto é, altos teores de ácidos graxos inibiram a síntese de aflatoxinas tanto por *Aspergillus parasiticus* como por *Aspergillus flavus*.

Para a produção de toxinas por *Aspergillus flavus*, o cobre apresentou correlação negativa. Já para o *Aspergillus parasiticus*, foi o manganês que mostrou correlação negativa. As concentrações de ferro e zinco correlacionaram fracamente com a biossíntese de aflatoxinas por ambos os fungos.

Os açúcares totais do milho mostraram efeito negativo na síntese de toxinas para as duas espécies de fungo, enquanto que os açúcares redutores, apenas um efeito negativo para *Aspergillus flavus*.

5. CONCLUSOES

5.1. Efeito do processamento no nível de aflatoxinas em amendoim

1. A torração a seco (190-200 C) e a fritura em óleo (190 C) foram processos efetivos na destruição das aflatoxinas apresentando taxas de destruição superior a 95% para aflatoxina B₁ e superior a 92% para aflatoxina G₁.

2. A redução dos teores de aflatoxinas tanto pela torração como pela fritura dependeu da concentração inicial de contaminação, sendo mais eficiente quando se partiu de teores iniciais menores.

3. A baixa temperatura de torração é a causa da manutenção dos níveis de aflatoxinas presentes na matéria-prima.

4. O processo de cocção (98 C) mostrou uma redução média ligeiramente inferior à dos outros processos térmicos, não havendo diferença entre cocção em água e água com 5% de sal.

5. A perda das aflatoxinas durante o cozimento não era devida a um simples efeito de lavagem dos grãos.

5.2. Fatores composicionais na susceptibilidade do milho

1. No estudo *in vitro*, os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* mostraram comportamento diferente quando inoculados nos cultivares de milho. Os cultivares Normal e Cubano apresentaram, respectivamente, a maior e a menor produção de aflatoxinas. O cultivar Opaco demonstrou praticamente a mesma susceptibilidade do Normal ao *Aspergillus flavus*, enquanto que o Nutrimaiz mostrou susceptibilidade intermediária ou semelhante à do Cubano, para ambos os fungos.

2. Os aminoácidos livres fenilalanina, treonina, valina, isoleucina e leucina influíram de forma positiva na biossíntese de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*. Já os aminoácidos valina e metionina mostraram correlação positiva na produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*.

3. Os ácidos graxos insaturados apresentaram correlação inversa com a produção de aflatoxinas pelos dois fungos.

4. O cobre teve efeito inibidor na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* enquanto que o manganês mostrou efeito inibidor para o *Aspergillus parasiticus*.

5. O teor de açúcares solúveis totais correlacionou inversamente com a capacidade de produzir aflatoxinas pelos dois fungos. Os açúcares redutores, por sua vez, mostraram efeito negativo apenas para *Aspergillus flavus*.

RERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAHI, A. e BUCHANAN, R.L. (1981). Regulation of aflatoxin biosynthesis: Induction of aflatoxin production by various carbohydrates. J. Food Sci. 46: 633.
- 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 *Aspergillus flavus* Resistance. J. Agr. Food Chem. 25: 661.
- AMAYA-FARFÁN, J.; YOUNG, C.T.; NORDEN, A.J. e MIXON, A.C. (1980). Chemical Screening for *Aspergillus flavus* resistance in peanuts. Oleagineux 35: 255.
- AOAC. (1970). "Official Methods of Analysis" 10th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- AOAC. (1984). "Official Methods of Analysis". 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- 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.
- AUSTWICK, P.K.C. e AYERST, G. (1963). Groundnut microflora and toxicity. Chem. Ind. (London) 1:55 (January).

- BALZER, I.; BOGDANIC, C. e MUZIC, S. (1977). Natural contamination of corn (*Zea mays*) with mycotoxins in Yugoslavia. Ann. Nutr. Alim. 31: 425.
- BARNES, J.M. e BUTTLER, W.H. (1964). Carcinogenic activities of aflatoxin to rats. Nature 202: 1016.
- BAUR, F.J. (1975). Effect of storage upon aflatoxin levels in peanut materials. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 263.
- BECKMAN 118/119CL. Application Notes. Published by Spinco Division of Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California, April, (1977).
- 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.
- BENNETT, G.A. e ANDERSON, R.A. (1978). Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products: A review. J. Agr. Food Chem. 26: 1055.
- BENNETT, J.W., DUNN, J.J. e GOLSMAN, C.I. (1981). Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environm. Microbiol. 41: 488.
- BLOUNT, W.P. (1961). Turkey "X" disease. Turkeys J. Brit. Turkey Federation 9:52. Em "Aflatoxin" (Goldblatt, L. A., ed.), 1969. Academic Press, London.

- BLIGH, E.C. e DYER, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. Biochem. Physiol. 37: 911.
- BREKKE, O.L., PEPLINSKI, A.J. e GRIFFIN JR., E.L. (1975a). Cleaning trials for corn containing aflatoxin. Cereal Chem. 52: 198.
- BREKKE, O.L., PEPLINSKI, A.J.; NELSON, G.E.N. e GRIFFIN JR., E. L. (1975b). Pilot plant dry milling of corn containing aflatoxin. Cereal Chem. 52: 205.
- 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.
- BUCHANAN, R.L. JR. e AYRES, J.C. (1975). Effect of initial pH on aflatoxin production. Appl. Microbiol. 30: 1050.
- BUCHANAN, R.L. e FLETCHER, A.M. (1978). Methylxanthine Inhibition of Aflatoxin Production. J. Food Sci. 43: 654.
- BUCHANAN, R.L.; APPLEBAUM, R.S. e CONWAY, P. (1978). Effect of theobromine on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. J. Food Safety 1: 211.
- BUCHANAN, R.L.; HOOVER, D.G. e JONES, S.B. (1983). Caffeine Inhibition of aflatoxin production: Mode of action. Appl. Environm. Microbiol. 46: 1193.

- BUCHANAN, R.L. e LEWIS, D.F. (1984). Caffeine inhibitor of aflatoxin synthesis: Probable site of action. Appl. Environm. Microbiol. 47: 1216.
- BULLERMAN, L.B. (1974). Inhibition of Aflatoxin Production by cinnamon. J. Food Sci. 39: 1163.
- BULLERMAN, L.B.; Lieu, F.Y. e SEIER, S.A. (1977). Inhibition of Growth and Aflatoxin Production by Cinnamon and Clove Oils. Cinnamic Aldehyde and Eugenol. J. Food Sci. 42: 1107.
- 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 *A. parasiticus*. Pythopath. 68: 501.
- CARNAGHAN, R.B.A., HARTLEY, R.D. e O'KELLY, J. (1963). Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. Nature 200: 1101.
- CARNAGHAN, R.B.A. (1965). Hepatic tumours in ducks fed a low level of toxic groundnut meal. Nature 208: 308.
- CIEGLER, A.; KADIS, S. e AJL, S.J. (1971). *Microbial Toxins*. vol. 6. Academic Press Inc. New York.
- COKER, R.D.; JEWERS, K. e JONES, B.D. (1985). The destruction of aflatoxin by ammonia: Practical possibilities. Trop. Sci. 25: 139.

- CONWAY, H.F., ANDERSON, R.A. e BAGLEY, E.B. (1978). Detoxification of aflatoxin contaminated corn by roasting. Cereal Chem. 55: 115.
- COOMES, T. J.; CROWTHER, P. C.; FEUELL, A.J. e FRANCIS, B. J. (1966). Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. Nature 209: 406.
- DAVIS, N.D., DIENER, U.L. e ELDRIDGE, D.W. (1966). Production of aflatoxins B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus*, in a semi-synthetic medium. Appl. Microbiol. 14: 378.
- DAVIS, N.D., DIENER, U.L. (1967). Production of aflatoxin B₁ and G₁ in chemically defined medium. Mycopathol. Mycol. Appl. 31: 251.
- DAVIS, N.D., DIENER, U.L. e AGNIHOTRI, V.P. (1967). Production of aflatoxin B₁ and G₁ in chemically defined medium. Mycol. Appl. 31: 251.
- DAVIS, N.D., DIENER, U.L. (1968). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. Appl. Microbiol. 16: 158.
- DIENER, U.L. e DAVIS, N.D. (1966). Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. Phytopathol. 56: 1390.

DIENER, U.L. e DAVIS, N.D. (1977). Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus*. Agricultural Experiment Station Bulletin nº 493, U.S. Agricultural Experimental Station, Auburn, AL.

DIENER, U.L. (1985). Comunicação pessoal.

DOYLE, M.P. e MARTH, E.H. (1978a). Bisulfite degrades aflatoxin: Effect of temperature and concentration of busulfite. J. Food Prot. 41: 774-780.

DOYLE, M.P. e MARTH, E.H. (1978b). Bisulfite degrades aflatoxin: Effect of citric acid methanol and possible mechanism of degradation. J. Food Prot. 41: 891-896.

DRAUGHON, F.A. e CHIDS, E.A. (1982). Chemical and biological evaluation of aflatoxin after treatment with sodium hypochlorite, sodium hydroxide and ammonium hydroxide. J. Food Prot. 45: 703-706.

DUTTON, M.F. e ANDERSON, M.S. (1980). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by organophosphorus Compounds. J. Food Prot. 43: 381.

EL-BANNA, A.A. e Scott, P.M. (1983). Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs. I-Aflatoxin B₁ during making of Egyptian bread. J. Food Prot. 46: 301.

- ELDRIDGE, D.W. (1964). Nutritional factors influencing the synthesis of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. M.S. thesis. Auburn University. Ala. 47p. em "Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn" (Diener, U.L.,ed.) 1983. Craftmaster. Printers. Inc. Alabama.
- ESCHER, L.S., KOEHLER, P.E. e AYRES, J.C. (1973). Effect of roasting on aflatoxin content of artificially contaminated pecans. J. Food Sci. 38: 889.
- 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.
- FERNANDO, T. e BEAN, G. (1985). Production of aflatoxins on Amaranth seeds by *Aspergillus* Spp. Food Chem. 17: 33.
- FEUELL, A.J. (1966). Aflatoxin in groundnuts. IX Problems of detoxification. Trop. Sci. 8: 61. Em "Aflatoxin". (Goldblatt, L.A.,ed.) 1969. Academic Press, London.
- FONSECA, H. e DEL NERY, H. (1970). Ocorrência de aflatoxina em pastas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Anais ESALQ, 27: 181.
- FONSECA, H. (1973a). Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na região noroeste do Estado de São Paulo. Anais ESALQ 30: 387.

- FONSECA, H. (1973b). Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na região de Paulista Nova do Estado de São Paulo. Anais ESALQ 30: 403.
- FONSECA, H. (1973c). Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na região sorocabana do Estado de São Paulo. Anais ESALQ 30: 423.
- FONSECA, H. (1975). Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na região araraquarense, do Estado de São Paulo. Anais ESALQ 32: 7.
- FONSECA, H. SAVY, A.F^o, SOAVE, J. e CANECCHIO, V. F^o. (1976a). Estudo do controle químico de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas no amendoim no campo. Anais ESALQ 33: 337.
- FONSECA, H. (1976c). Estudo da aflatoxina no amendoim da colheita à industrialização na região de Monte Alto, São Paulo. Anais ESALQ 33: 375.
- FONSECA, H. (1976d). Estudo da aflatoxina no amendoim da colheita à industrialização na região de Santa Adélia, São Paulo. Anais ESALQ 33: 385.
- FONSECA, H. (1976e). Estudo da aflatoxina no amendoim da colheita à industrialização, na região de Fernandópolis, São Paulo. Anais ESALQ 33: 395.

FONSECA, H. (1983). Aflatoxina em amendoim. Doc. Tec. CATI nº 46.

FRANK, H.K. (1968). Diffusion of aflatoxin in foodstuffs J. Food Sci, 33: 98.

FRANK, H.K. (1974). Aflatoxine - Bildungsbedingungen, Eigenschaften und bedeutung für die lebensmittelwirtschaft. B. Behr's. Verlag, Hamburg, 126p. Em "Ecology of Micotoxin production" (Gorelova, E.I. e Lvova, L.S., 1980). Food Contamination with Special Reference to mycotoxins training Course in the USSR. United Nations Environment Programme.

GOPALAN, C., TULPULE, P.G. e KRUSHNEMURTHY, D. (1972). Induction of hepatic carcinoma with aflatoxin in rhesus monkey. Food and Cosmet. Toxicol. 10: 519.

GORELOVA, E.I. e LVOVA, L.S. (1980a). Effect of technological methods used in processing of contaminated products on the content of mycotoxins. No "Food Contamination with Special Reference to Mycotoxin Training Course in the USSR". United Nations Environment programme.

GORELOVA, E.I. e LVOVA, L.S. (1980b). 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.

- GUPTA, S.R. e VENKITASUBRAMANIN, T.A. (1975). Production of aflatoxin on soybeans. Appl. Microbiol. 29: 834.
- GUPTA, S.R., PRASANA, H.R., VISWANATHAN, L. e VENKITASUBRAMANIN, T.A. (1975). Synthesis of aflatoxin by nongrowing mycelia of *Aspergillus parasiticus* and effect of inhibitors. J. Gen. Microbiol. 91: 417.
- HAGLER, W.M. JR., HUTCHINS, J.E. e HAMILTON, P.B. (1983). Destruction of aflatoxin B₁ with sodium bisulfite: Isolation of the major product aflatoxin B₁. S. J. Food Prot. 46: 295.
- HAMADA, A.S. e MEGALLA, S.E. (1982). Effect of malting and roasting on reduction of aflatoxin in contaminated soybeans. Mycopathologia 79: 3.
- HARTLEY, R.D., NESBITT, B.F. e O'KELLY, J. (1963). Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature 198: 1056.
- HODGE, J.E. e HOFREITER, B.T. (1962). Determination of reducing sugars and carbohydrates. Em "Methods in carbohydrate chemistry (WHISTLER, R.L. e WOLFROM, M.L.), 1962. Academic Press, New York, vol. 1.
- HODGE, F.A., ZUST, J.R., SMITH, H.R., NELSON, A.A., ARMBRECHT, B.H. e CAMPBELL, A.D. (1964). Mycotoxins: aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*. Science 145: 1439.

- 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.
- JARVIS, B. (1971). Factors affecting the production of mycotoxins, J. Appl. Bact. 34: 199.
- JOFFE, A.Z. e LISKER, N. (1969). Effects of light, temperature and pH value on aflatoxin production *in vitro*. Appl. Microbiol. 18: 517.
- JONES, F.T.; HAGLER, W.M., JR e HAMILTON, P.B. (1984). Correlation of aflatoxin contamination with zinc content of chicken feed. Appl. Environm. Microbiol. 47: 478.
- 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: 41.
- KULIK, M.M. e HOLADAY, C.E. (1966). Aflatoxin: A metabolic product of several fungi. Mycopathologia Mycologia Applicata. 30: 137.
- LANDERS, K.E., DAVIS, N.D. e DIENER, U.L. 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts. Phytopathol. 57: 1086.

- LaPRADE, J.C. e MANWILLER, A. (1976). Aflatoxin production and fungal growth on single cross corn hybrids inoculated with *Aspergillus flavus*. Phytopathol. 66: 675.
- LaPRADE, J.C. e MANWILLER, A. (1977). Relation of insect damage, vector and hybrid reaction ot aflatoxin B₁ recovery from field corn. Phytopathol. 67: 544.
- 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: 432.
- LEE, L.S., CUCULLU, A.F. e GOLDBLATT, L.A. (1968). Appearance and aflatoxin content of raw and dry roasted peanut Kernel . Food Tech. 22: 1131.
- LEE, L.S., CUCULLU, A.F., FRANZ, A.O. JR., e PONS, W.A. JR. (1969). Destruction of aflatoxins in peanuts during dry and oil roasting. J. Agr. Food Chem. 17: 451.
- LENOVICH, L.M. (1981). Effect of caffeine of aflatoxin production on cocoa beans. J. Food Sci. 46: 655.
- LEVI, C. (1980). Mycotoxins in Coffee. J. Ass. Off. Anal. Chem. 63: 1282.
- LIEU, F.Y. e BULLERMAN, L.B. (1977). Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates. J. Food Sci. 42: 1222.

- LILLEHOJ, E.B., GARCIA, W.J. e LAMBROW, M. (1974). *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production in corn: Influence of trace elements. Appl. Microbiol. 28: 763.
- 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.
- LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., FENELL, D.I. e MILBURN, M.S.(1975b). Aflatoxin incidence ad association with bright greenish-yellow fluorescence and insect damage in a limited survey of freshly harvested high-moisture corn. Cereal Chem. 52: 403.
- 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.
- 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.
- 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: 255.

- LILLEHOJ, E.B. e ZUBER, M.S. (1981). Variability in corn hibrid resistance to preharvest aflatoxin contamination. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 971A.
- LLEWELLYN, G.C., BENEFIDES, J. e EADIE, T. (1978). Differential production of aflatoxin on natural and heat-treated cocoa beans. J. Food Prot. 41: 785.
- LLEWELLYN, G.C., JONES, H.C., GATES, J.E. e EADIE, T. (1980). Aflatoxigenic potential for *Aspergilli* on sucrose substrates. J. Off. Anal. Chem. 63: 622.
- LLEWELLYN, G.C., BURKETT, M.L. e EADIE, T. (1981). Potential mold growth, aflatoxin production, and antimycotic activity of selected natural spices and herbs. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 955.
- LUTER, L., WYSLOUZIL, W. e KASHYAP, S.C. (1982). The destruction of aflatoxins in peanuts by microwave roasting. Can. Inst. Food Sci. Tech., J. 15: 236.
- MABROUK, S.S. e EL-SHAYEB, N.M.A. (1980). Inhibition of aflatoxin formation by some spices. Z. Lebensm. Unters. Forsh. 171: 344.
- MALINI, R.; MUKERJI, K.G. e VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1984). Effect of aluminum and nickel on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Folia Microbiol. 29: 104-107.

- MANN, G.E., CODIFER, L.P. JR. e DOLLEAR, F.G. (1967). Effect of heat on aflatoxins in oil seed meals. J. Agr. Food Chem. 15: 1090.
- 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: 52.
- MATELES, R.I. e ADYE, J.C. (1965). Production of aflatoxin in submerged culture. Appl. Microbiol. 13: 208.
- MAYURA, K., BASAPPA, S.C. e MURTHY, V.S. (1985). Studies on some factors affecting aflatoxin production by *A. flavus* and *A. parasiticus*. J. Food Sci. Tech., India 22: 126.
- 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: 83.
- 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.
- METCALFE, L.D.; SCHMITZ, A.A. e PERKA, J.R. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters for gas-chromatographic analysis. Anal. Chem. 38: 514-515.

- MIXON, A.C. e ROGERS, K.M. (1973). Peanut resistant to seed invasion by *Aspergillus flavus*. Oléagineux 28: 85.
- NABNEY, G. e NESBITT, B.F. (1965). A spectrophotometric method for determining the aflatoxins. Analyst 90: 155.
- NAGARAJAN, V. e BHAT, R.V. (1972). Factor responsible for varietal differences in aflatoxin production in maize. J. Agr. Food Chem. 20: 911.
- NAGARAJAN, V., BHAT, R.V. e TULPULE, P.G. (1973). Aflatoxin production in some varieties of soybeans (*Glycine max* L.). Experimentia 29: 1302.
- NAIK, M., MODI, V.V. e PATEL, N.C. (1970). Studies on aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. Indian J. Exp. Biol. 8: 345. Em "Effect of specific amino acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. Appl. Environm. Microbiol. 46: 805. (1983).
- NORRED, W.P. (1982). Ammonia treatment to destroy aflatoxin in corn. J. Food Prot. 45: 972.
- OBIDOA, O. e NDUBUISI, I.E. (1981). The role of zinc in the aflatoxigenic potential of *Aspergillus flavus* NRRL3251 on foodstuffs. Mycopathologia 74: 3.

- PANASSENKO, V.T. (1944). Ecology of the moulds. Microbiology (USSR) 13, 159. Em Rev. Appl. Mycol. 24: 383, 1945.
- PARK, K.Y. e BULLERMAN, L.B. (1983). Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. J. Food Prot. 46: 178.
- PAYNE, G.A. e HAGLER, W.M. JR. (1983). Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. Appl. Environm. Microbiol. 46: 805.
- PEERS, F.G. e LINSELL, C.A. (1973). Dietary aflatoxins and liver cancer - a population based study in Kenya. Br. J. Cancer 27: 473.
- 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.
- PEERS, F.G. e LINSELL, C.A. (1977). Dietary aflatoxin and human primary liver cancer. Ann. Nutr. Alim. 31: 1005.
- PMC - Micotoxinas. (1982). Avaliação do Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas. Apresentado no II Encontro Nacional de Micotoxinas, São Paulo.

- POMERANZ, Y. (1964). Formation of toxic compounds in storage damaged foods and feedstuffs. *Cereal Sci. Today* 9: 93. Em "Aflatoxin" (Goldblatt, L.A., ed.) 1969. Academic Press, London.
- PRADO, R. (1983). Incidência de aflatoxina B₁ em alimentos. Rev. Farm. Bioquim., Belo Horizonte, 5: 147.
- PREGNOLATO, W. e SABINO, M. (1969/1970). Pesquisa e dosagem de aflatoxina em amendoim e derivados e em outros cereais. Rev. Inst. Adolfo Lutz 29/30: 65.
- PRICE, R.L., LOUGH, O.G. e BROWN, W.H. (1982). Ammoniation of whole cottonseed at atmospheric pressure and ambient temperature to reduce aflatoxin M₁ in milk. J. Food Prot. 45: 341.
- PRICE, R.L. e JORGENSEN, K.V. (1985). Effects of processing on aflatoxin levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. J. Food Sci. 50: 347.
- PRIYADARSHINI, E. e TULPUL, P.G. (1980). Effect of free fatty acids on aflatoxin production in a synthetic medium. Food and Cosm. Toxicol. 18: 367.
- PRZYBYLSKI, W. (1975). Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates. J. Ass. Off. Chem. 58:163.

- PURCHIO, A. (1970). Pesquisa de aflatoxina B₁ e substâncias fluorescentes similares em farinha de trigo. Rev. Microbiol. 1: 33.
- 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.
- RABIE, C.J., MEYER, C.J., VanHEERDEN, L. e LUBBERN, A. (1981). Inhibitory effect of molybdenum and vanadium salts on aflatoxin B₁ synthesis by *Aspergillus flavus*. Can. J. Microbiol. 27: 962.
- RAGHU, A., EADIE, T. e LLEWELLYN, G.C. (1978). Evaluating the potential for aflatoxin occurrence on celery, cauliflower, lettuce and fero root inoculated with *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61:998.
- RAMBO, G.R. TUIE, J. e ZACHARIAH, G.L. (1975). Fluorescence associated with corn infected with *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in storage. Cereal Chem. 52: 757.
- REDDY, T.V., VISWANATHAN, L. e VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1971). High aflatoxin production on a chemically defined medium. Appl. Microbiol. 22: 393.
- REDDY, T.V., VISWANATHAN, L. e VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1972). Factors effecting aflatoxin production on a synthetic medium. Biochem. J. 128: 61.

- REDDY, T.V., VISWANATHAN, L. e VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1979). Factors affecting aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a chemically defined medium. J. Gen. Microbiol. 114: 409.
- REHANA, F., BASUPPA, S.C. e MURTHY, V.S. (1979). Destruction of aflatoxin in rice by different cooking methods. J. Food Sci. Tech., India. 16: 11.
- REISS, J. (1978). Mycotoxins in foodstuffs. XI - Fate of aflatoxin B₁ during preparation and baking of whole meal wheat bread. Cereal Chem. 55: 421.
- Resolução Nº 13/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, itens VII_a e XI_a, publicada no D.O.U. em 25/07/78.
- 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 sample. J. Ass. Off. Anal. Chem. 58: 500.
- 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: 153.
- 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 42:39.

- 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.
- SCHINDLER, A.F., PALMER, J.G. e EISENBERG, W.V. (1967). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperature. Appl. Microbiol. 15: 1006.
- SCHINDLER, A.F. (1977). Temperature limits for production of aflatoxin by twenty-five isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. J. Food Prot. 40: 39.
- SCHROEDER, H.W. e HEIN, H. JR. (1967). Aflatoxin: Production of the toxin *in vitro* in relation to temperature. Appl. Microbiol. 15: 441.
- SCHROEDER, H.W. e VERRET, M.J. (1969). Production of aflatoxin by *Aspergillus wentii* Wehmer. Can. J. Microbiol. 15: 895.
- 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.
- SCHULTZ, D.L. e LUIDECKE, L.O. (1977). Effect of natural fats and fatty acids on aflatoxin production. J. Food Prot. 40: 304.

SCOTT, P.M., VAN VELBEEK, W. e FORGACS, J. (1967). Formation of aflatoxin by *Aspergillus ostianus* Wehmer. Appl. Microbiol. 15: 945.

SCOTT, P.M. (1984). Effects of food processing on mycotoxins. J. Food Prot. 47: 489.

SCUSSEL, V.M. (1984). Estudo da incidência de aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogaea*), milho (*Zea mays*) e seus produtos. Tese de Mestrado. UNICAMP. 151p.

SCUSSEL, V.M. e RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1985). Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980-1982. Boletim SBCTA 19: 109.

SEENAPPA, M. e NYAGAHUNGU, I.K. (1982). Retention of aflatoxin in UGALI and bread made from contaminated maize. J. Food Sci. Tech., India 19: 64.

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/O₂) variety of maize (*Zea mays* L.). J. Agr. Food Chem. 25: 1098.

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: 180.

- SHERERTZ, P.C., EADIE, T., YOUNG, J.W. e LLEWELLYN, G.C. (1976). Aflatoxin occurrence on raw and cooked York soybeans inoculated with three *Aspergillus* isolates. J. Assoc. Anal. Chem. 59: 662.
- SHIH, C.N. e MARTH, E.H. (1972). Experimental production of aflatoxin on brick cheese. J. Milk Food Tech. 35: 585.
- 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: 421.
- SHOTWELL, O.L., GOUDEN, M.L., JEPSON, L.K., KWOLEK, W.F. e HESSELTINE, C.W. (1975a). Aflatoxin occurrence in some white corn under loan. 1971. III. Association with bright greenish-yellow fluorescence in corn. Cereal Chem. 52: 670.
- SHOTWELL, O.L., KWOLEK, W.F., GOULDEN, M.L., JACKSON, L.K. e HESSELTINE, C.W. (1975b). Aflatoxin occurrence in some white corn under loan. 1971. I. Incidence and level. Cereal Chem. 52: 373.
- 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 23: 129.
- SOMOGYI, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160: 61.

- SORENSEN, 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.
- 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: 66.
- STOLOFF, L., TRUCKSESS, M.W., ANDERSON, P.W., GLABE, E.F. e ALDRIDGE, J.G. (1978). Determination of the potential for mycotoxin contamination of pasta products. J. Food Sci. 43:228.
- STOLOFF, L. e TRUCKSESS, M.W. (1981). Effect of boiling, frying, and baking on recovery of aflatoxin from naturally contaminated corn grits or cornmeal. J. Ass. Off. Anal. Chem. 64: 678.
- SWAMINATHAN, B. e KOEHLER, P.E. (1976). Isolation of an inhibition of *Aspergillus parasiticus* from white potatoes (*Solanum tuberosum*). J. Food Sci. 41: 313.
- 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.
- TANGO, J.S., NAKAMURA, I.M. LEITÃO, M.F.F. e JORDÃO, B.A. (1971/1972). Influência da umidade relativa do ar na estabilidade do amendoim em grão em armazenamento. Col. ITAL 4: 71.

UNICEF, (1963). Meeting on groundnut toxicity at Tropical Products Institute. London, Proceedings. Em "Aflatoxin" (Goldblatt, L.A. ed.). Academic Press, London.

VANDERGRAFT, E.E., SHOTWELL, O.L., SMITH, M.L. e HESSELTINE, C. W. (1973). Mycotoxin formation affected by fumigation of wheat. Cereal Sci. Today 18: 412.

VANDERGRAFT, E.E., HESSELTINE, C.W. e SHOTWELL, O.L. (1975). Grain preservatives: Effects on aflatoxin and ochratoxin production. Cereal Chem. 52: 79.

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.

WALTKING, A.E. (1971). Fate of aflatoxin during roasting and storage of contaminated peanut products. J. Ass. Off. Anal. Chem. 54: 533.

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.

WILSON, D.M. e BILL, D.K. (1984). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on visibly sound rehydrated peanut, corn and soybean seed. Peanut Sci. 11: 43.

WOGAN, G.N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bacteriol. Rev. 30: 460.

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.