

HOMERO FONSECA
ENGENHEIRO - AGRÔNOMO

Instrutor da 21.^a Cadeira - Tecnologia e
Conservação de Alimentos da Escola Su-
perior de Agricultura «Luiz de Queiroz».
U. S. P.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA OCORRÊNCIA
DE AFLATOXINA EM TORTAS, FARELOS E
FARINHAS DE AMENDOIM (*Arachis hypogaea L.*)
NO ESTADO DE SÃO PAULO

Tese para doutoramento apresentada à
Escola Superior de Agricultura «Luiz de
Queiroz» da Universidade de São Paulo.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo
BRASIL — 1968

H O M E R O F O N S E C A

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Instrutor da 21ª Cadeira - Tecnologia e Conservação
de Alimentos - da Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", U.S.P.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA EM
TORTAS, FARELOS E FARINHAS DE AMENDOIM (Arachis hypogaea L.)
NO ESTADO DE SÃO PAULO.

Tese para Doutorado
apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
da Universidade de São Paulo.

PIRACICABA - ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

1 9 6 8

"IN MEMORIAN"

Ao meu pai.

OFEREÇO

à minha esposa, incansável colaboradora e principal incentivadora deste trabalho, a meus filhos e minha mãe.

DEDICO

aos irmãos, que tornaram possível a minha formação profissional.

- AGRADECIMENTOS -

Desejamos expressar aqui os nossos sinceros agradecimentos às seguintes pessoas e entidades:

Prof. Dr. Jorge Leme Jr., professor de Tecnologia e Conservação de Alimentos, como orientador da tese.

Dr. Peter C. Crowther, do Tropical Products Institute, pelo assessoramento em vários pontos desta tese e pela cessão de vários trabalhos e documentos não publicados.

Dr. Roland Vencovsky, pela orientação recebida na execução das análises estatísticas.

Aos colegas Drs. Darcy M. da Silva e Otto J. Crócomo, pelas sugestões apresentadas.

Aos funcionários da 21ª Cadeira, Tecnologia e Conservação de Alimentos, Rudney de Almeida Silva e Roque Arthur, pela colaboração prestada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio recebido, sem o qual, não teria sido possível a realização dêste trabalho.

À UNICEF, (United Nations International Children Fund), da Organização das Nações Unidas, pelo auxílio recebido em material.

Às fábricas de óleo de amendoim, pelas facilidades que nos proporcionaram na retirada das amostras.

ÍNDICE

	página
1.- INTRODUÇÃO	1
2.- REVISÃO DA LITERATURA	3
3.- MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1- Material	10
3.2.- Métodos	11
3.2.1.- Métodos analíticos	11
3.2.1.1.- Preparo das amostras	11
3.2.1.2.- Extração da toxina	11
3.2.1.3.- Preparo das cromatoplasmas	12
3.2.1.4.- Cromatografia da toxina	12
3.2.1.5.- Avaliação do nível de toxidês	12
3.2.2.- Métodos estatísticos	14
4.- RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1.- Resultados	17
4.2.- Discussão	25
4.2.1.- Considerações gerais	25
4.2.2.- Aflatoxina B	27
4.2.2.1.- Apreciação global	27
4.2.2.2.- Influência da safra	31
4.2.2.3.- Influência da época, dentro da safra	32
4.2.2.4.- Influência da região	35
4.2.2.5.- Análise da variância	38
4.2.3.- Aflatoxina G	40
4.2.3.1.- Apreciação global	40
4.2.3.2.- Influência da safra	41
4.2.3.3.- Influência da época, dentro da safra	42
4.2.3.4.- Influência da região	45
4.2.4.- Correlações entre as aflatoxinas B e G	48

	página
5.- RESUMO E CONCLUSÕES	51
6.- SUMMARY AND CONCLUSIONS	53
7.- BIBLIOGRAFIA CITADA	55

0 0 0 0

1.- INTRODUÇÃO

O amendoim (Arachis hypogaea L.), é atualmente uma cultura de grande importância econômica no Estado de São Paulo.

A produção paulista de amendoim em casca no ano de 1965 foi de 672 mil toneladas (IBGE, 1966), o que representou 90% da produção brasileira.

A maior parte deste produto é industrializado para obtenção de óleo comestível. Em 1965, o Brasil exportou, para vários países, 18.437 toneladas de amendoim e 5.799 toneladas de torta e farelo, num valor de 4,4 milhões de dólares (IBGE, 1966). Se verificarmos estes mesmos itens para o ano de 1962, veremos que exportamos 21.912 toneladas de amendoim e 83.677 toneladas de torta e farelo, num valor de 9,1 milhões de dólares (IBGE, 1963). Este decréscimo brutal na exportação de tortas e farelos, deve-se, principalmente, à aflatoxina presente nos mesmos. As exportações estão em ritmo decrescente e ameaçadas de serem sustadas, visto, os países consumidores, estarem cogitando de não mais importar tortas tóxicas. Daí depreende-se a importância do problema do ponto de vista econômico.

Do ponto de vista alimentar, também é muito importante, porque estas tortas e farelos são usados nas rações de animais. Isto pode, não só, ser prejudicial aos animais sensíveis à aflatoxina, como também, indiretamente, atingir o homem. Isto porque, uma parcela da aflatoxina ingerida por vacas leiteiras, por exemplo, passa para o leite (ALLCROFT & CARNAGHAN, 1962 e De IONGH e cols., 1964).

Podemos, também, estar sendo atingidos diretamente, pois, a torta tóxica provém de um amendoim contaminado, e este pode estar à venda nos mercados, "in natura" ou sob a forma de confeitos como pés-de-moleque, passoquinhas, pastas de amendoim, etc. (FONSECA & LEME Jr., 1967).

Diante da amplitude e magnitude do problema, aliado ao fato de que a Cadeira de Tecnologia e Conservação de Alimentos tem convênio firmado com a UNICEF (United Nations International Children Fund) pa

ra o estudo de tortas oleaginosas para alimentação humana, resolvemos, como primeiro passo, estudar a situação das tortas, farelos e farinhas de amendoim, quanto à aflatoxina, no Estado de São Paulo, procurando esclarecer, principalmente, os seguintes pontos:

1) Se a incidência da aflatoxina estava em níveis baixos ou altos.

2) Se a ocorrência da mesma era geral ou localizada.

3) Se havia variação no teor de aflatoxina entre as épocas de coleta de amostras.

4) Qual a correlação entre a produção de aflatoxina B e aflatoxina G.

Êstes são os objetivos da tese.

0 0 0 0

2.- REVISÃO DA LITERATURA

A história da aflatoxina começou a ser contada quando STEVENS e cols. (1960), descreveram o aparecimento de uma nova doença em peruzinhos. As aves morriam geralmente dentro de uma semana, sendo, seus sintomas, a perda de apetite, diminuição da mobilidade, fraqueza das asas, das pernas, etc. A necrópsia sempre revelava lesões necróticas no fígado e congestionamento nos rins. Os autores, não conseguindo isolar nenhum agente infeccioso, suspeitaram que ela deveria ser de origem nutricional, visto que, com a mudança da ração, frequentemente cessava a mortalidade, fato êste que ficou mais ou menos comprovado por SMITH (1960).

Logo em seguida, MANN (1960), pensou ser um cereal o responsável pela doença. Quase ao mesmo tempo, foi descrita também por SWARBRICK (1960), WANNOP (1960), BLOUNT (1960) e WILEY (1960).

Veterinários e pesquisadores ingleses batizaram-na de "Doença "X" dos perús", e foi responsabilizada pela morte de mais de 100.000 peruzinhos no período compreendido entre maio e agosto de 1960 (BLOUNT, 1961a). Enorme número de análises de rações foram feitas, tendo sido pesquisados alcalóides, mercúrio, chumbo, venenos de ratos, inseticidas, mas êstes, quando presentes, não se apresentavam em níveis tóxicos (BLOUNT, 1961b).

Verificou-se, posteriormente, que uma partida de torta de amendoim, proveniente do Brasil, era o fator comum a todos os surtos de envenenamento (ASPLIN & CARNAGHAN, 1961), ao mesmo tempo que, entre nós, AMARAL (1961), relacionava a morte de suínos alimentados com torta de amendoim.

Sucessivamente, CARNAGHAN & SARGEANT (1961), GRAY (1961), LANCASTER e cols. (1961), SARGEANT e cols. (1961a), incriminavam a torta de amendoim como responsável pela doença e ALLCROFT e cols. (1961), extraíam o princípio tóxico da torta, davam-no a marrecos e reproduziam a doença.

Ao mesmo tempo, LOOSMORE & MARKSON (1961), relatavam o en-

venenamento de bovinos com torta brasileira e LOOSMORE & HARDING (1961), complicações em suínos pelo uso da mesma. Na RHODESIA & NYASALAND (1961), era relatada mortandade de marrequinhos alimentados com torta de amendoim proveniente de Katanga, e, ASPLIN & CARNAGHAN (1961), reportavam surtos, da doença, em marrequinhos, aparecidos em Kênia com o uso de torta, cujo amendoim era proveniente de Uganda.

A disseminação dos surtos, bem como o fato de que apenas algumas partidas exibiam toxidez, sugeriam que a contaminação por um microorganismo poderia ser a causa. O amendoim, que ocasionou o surto de Kênia, estava visivelmente contaminado por fungos, dos quais foram isoladas oito espécies e cultivadas em solução Agar-Czapek. Os extratos clorofórmicos destas culturas foram cromatografados em papel e um deles apresentou uma mancha fluorescente azul, quando observada à luz ultra-violeta, com $R_f = 0,7$ com o solvente butanol-ácido acético (95:5). Testes biológicos, feitos com marrequinhos de um dia, mostraram que apenas o extrato que tinha a mancha fluorescente era tóxico, matando as aves e produzindo as lesões típicas no fígado.

O fungo foi cultivado em amendoim esterilizado e repetido o teste, foi confirmada a toxidez. O fungo foi identificado como sendo o Aspergillus flavus LINK EX FRIES (SARGEANT e cols., 1961b) e a substância recebeu o nome de Aflatoxina (A.flavus toxina).

O processo de purificação e dosagem foi melhorado passando-se a usar cromatografia em camada delgada, empregando-se como adsorvente, o óxido de alumínio pelo grupo do TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE (1962) e a silicagel-G, pelo grupo da Unilever (De IONGH e cols., 1962). Esta última mostrou-se mais eficiente e é universalmente usada.

No óxido de alumínio, a mancha fluorescente que aparecia na cromatografia em papel, foi resolvida em duas separadas, que foram denominadas aflatoxina B (de "blue" = azul) e aflatoxina G (de "green" = verde) devido à cor de sua fluorescência à luz ultra-violeta. Em silicagel-G, De IONGH e cols. (1962), conseguiram separar em quatro frações que eles denominaram FB1, FB2, FB3 e FB4.

Os mesmos grupos (TPI e Unilever) conseguiram obter as substâncias em estado cristalino e determinar suas propriedades físico-químicas, tais como: peso molecular, composição elementar, espectros ultravioleta e de ressonância magnética nuclear, rotação óptica específica e ponto de fusão (Van der ZIJDEN e cols., 1962 e NESBITT e cols., 1962).

HARTLEY e cols. (1963), verificaram que a aflatoxina B correspondia a duas frações que eles denominaram B1 e B2 e que a G, também a outras duas, que denominaram G1 e G2. Verificaram também, que elas eram produzidas, geralmente, na proporção de 40:1:50:1, respectivamente, para B1, B2, G1, G2. Forneceram ainda alguns dados sobre a estrutura da substância acusando a presença do anel dehidrofurano, nas aflatoxinas B1 e G1, o qual é hidrogenado nas B2 e G2, bem como a presença do grupo metoxilo em todas elas.

CARNAGHAN e cols. (1963), determinaram a DL_{50}^{+} das quatro frações em marrequinhos de um dia, verificando que eram 18,2, 39,2, 84,8 e 172,5 microgramas, respectivamente, para B1, G1, B2 e G2.

Finalmente, as fórmulas estruturais das aflatoxinas B e G foram elucidadas por ASAO e cols. (1963), nos EE.UU. e Van der MERWE e cols. (1963), na África do Sul. A fórmula da B2 foi determinada simultaneamente por CHANG e cols. (1963), nos EE.UU., e por Van DORP e cols. (1963), na Bélgica, enquanto CHEUNG & SIM (1964), na Escócia, determinaram a estrutura da G1.

Hoje sabe-se da existência das aflatoxinas M1 e M2, excretadas no leite de animais alimentados com torta tóxica (ALLCROFT & CARNAGHAN, 1962^a e De IONGH e cols., 1964) e das B2a e G2a, isoladas recentemente por DUTTON & HEATHCOTE (1966), em tortas de amendoim.

A esta altura já havia sido constatado que outras espécies animais eram sensíveis à aflatoxina. Atualmente conhece-se um grande número de espécies suscetíveis, tais como galináceos (ASPLIN & CARNAGHAN, 1961, CARNAGHAN & SARGEANT, 1961, RAIMO e cols., 1962, ANDRADE e cols.,

(+) Dose com a qual morrem pelo menos 50% dos animais.

1962, GARDINER, 1962, ARCHIBALD e cols., 1962, LOIZELIER, 1963 e MORCOS & LEBSHTEIN, 1963), em suínos (AMARAL, 1961, LOOSMORE & HARDING, 1961, ZHURAVLEV, 1962, HARDING, ^{e cols.} 1963, LIM, 1964 e ZWART & HARDING, 1964), em bovinos (LOOSMORE & MARKSON, 1961, GRAY, 1961, CLEGG & BRYSON, 1962 e ALLCROFT & LEWIS, 1963a e 1963b), em bubalinos (SASTRY e cols., 1965), em caprinos (MINNE e cols., 1964).

ALLCROFT & CARNAGHAN (1963), afirmam que os ovinos são resistentes. Também entre as espécies sensíveis estão os ratos (LANCASTER e cols., 1961, LE BRETON e cols., 1962, BUTLER & BARNES, 1963, SALMON & NEWBERNE, 1963, e RICHIR e cols., 1964), sendo os camundongos, resistentes (PLATONOW, 1964).

GUILLOIN & RENAULT, (1961), relataram hepatomas em cães e KING (1963), reproduziu, experimentalmente, a doença, usando torta de amendoim. HOLDING (1964), na África do Sul, relata a morte de cães resultante do que chamou aflatoxicose.

HUEPER & PAYNE (1961), observaram a ocorrência de hepatomas em trutas tendo sido confirmado por ASHLEY e cols. (1962) e ASHLEY e cols. (1964).

TULPULE e cols. (1964) e MADHAVAN e cols. (1965), constataram a suscetibilidade em macacos e PATERSON e cols. (1962) e BUTLER & BARNES (1963), em cobaias.

O órgão afetado por excelência é o fígado, que se apresenta hemorrágico ou com carcinomas (RICHIR e cols., 1964) e também os rins que podem se apresentar congestionados e hemorrágicos. Outros órgãos podem ser atacados também como por exemplo o mesentério e pulmões (NEWBERNE e cols., 1964).

A aflatoxina hoje é considerada como um dos agentes cancerígenos naturais mais potentes (SCHOENTAL, 1967).

Sabe-se também que a aflatoxina é produzida pelo A.flavus, em quase todo o mundo, no amendoim e em outros produtos. RICHMOND e cols (1962a e 1962b), demonstraram que a doença se reproduzia em marrecos, quando alimentados com soja, feijão ("runner bean"), semente de algodão

e trigo nos quais tinha crescido o A. flavus. Posteriormente, constatou-se que a aflatoxina era produzida também em rações (WILSON & WILSON, 1962) em milho (GIBSON, 1962, AUST e cols., 1963, STANKUSHEV, 1963, ALBRIGHT e cols., 1964, e ZWART & HARDING, 1964), em torta de algodão (LOOSMORE e cols., 1964), em arroz (SHOTWELL, e cols., 1966) e em mandioca (NARTEY, 1966).

Sabe-se também que nem tôdas as linhagens de A. flavus produzem aflatoxina (HESSELTINE e cols., 1966), assim como outros dois microorganismos podem produzi-la: o Aspergillus parasiticus SPEARS (CODNER e cols., 1963) que se mostrou o mais ativo produtor, e o Penicillium puberulum BAINER (HODGES e cols., 1964).

As plantas também podem ser afetadas pela aflatoxina. SCHONENTAL & WHITE (1965), demonstraram que a aflatoxina não só inibia a germinação de sementes de mastruço (Lepidium sativum, L.), como também provocou o albinismo das folhas das poucas que germinaram.

Com relação ao homem, há já alguma evidência da sua sensibilidade à aflatoxina. KENSLER, citado por MILNER (1965) na Reunião Anual de 1965 do Institute of Food Technologists, realizada em Kansas City, Estados Unidos, apresentou evidência, baseada em extensivas análises, da virtual eliminação da aflatoxina em produtos comerciais de amendoim naquele país. Citou também que, paralelamente, a incidência do câncer primário do fígado tinha baixado consideravelmente em relação a anos anteriores, insinuando uma provável correlação entre êsses fatos.

Mais recentemente, ZUCKERMAN & FULTON (1966), colocando células hepáticas de embrião humano em contacto com suspensão de aflatoxina, observou que havia redução no tamanho das células, destruição de RNA, nucléolos e cromatina.

A importância do problema tem despertado o interesse de governos e cientistas, no sentido de conhecerem a situação da aflatoxina - em seus países, quer no amendoim, quer nas tortas e farelos. Já em 1961, na Nigéria, McDONALD & HARKNESS (1963), faziam uma investigação da presença de aflatoxina nas colheitas de amendoim provenientes de duas regiões distintas: Riverain e do Norte. Procuraram verificar também se ha-

de amendoim
via alguma variedade mais resistente e se a ocorrência de aflatoxina era
geral ou localizada.

MCDONALD & A'BROOK (1963), no norte da Nigéria, pesquisaram a presença de aflatoxina em amendoim proveniente de vários experimentos de secagem, nas safras de 1961 e 1962.

GOPALAN (1965), relata o levantamento feito em 1964 por SU RYANARAYANA e colaboradores em sete distritos litorâneos da Índia, cobrindo uma área de aproximadamente 85.000 quilômetros quadrados, zona esta de maior produção do país. Os estudos foram feitos em amendoim e tortas e farelos de amendoim, tendo sido pesquisada também, a possível variação entre safras de estação chuvosa e estação seca.

SELLSCHOP e cols. (1965), apresentaram um levantamento feito na África do Sul por uma equipe de doze técnicos nos anos de 1963 e 1964, quando examinaram a ocorrência de aflatoxina em aproximadamente 2.000 amostras de amendoim, tortas, farelos e pasta de amendoim. As regiões pesquisadas foram as províncias do Transvaal, do Estado Livre do Orange, de Natal e do Cabo. As análises efetuadas por esta equipe foram predominantemente em amendoim e pasta de amendoim, restringindo-se a analisar as tortas e farelos, somente quando suspeitos de terem causado mortes em animais.

PEERS (1965), apresentou a melhor pesquisa até hoje efetuada neste campo, quando relatou o trabalho por ele feito em Vom, no Norte da Nigéria, durante os anos de 1963, 1964, e 1965, em dez partidas de amendoim provenientes da região de Zaria. Seu trabalho visou o controle da aflatoxina em tortas e farelos resultantes daquele amendoim, e destinados à composição de Arlac⁺, bem como verificar o efeito das medidas de melhoria das condições de secagem, armazenamento e seleção do amendoim.

LIM & YEAP (1966), levaram a efeito na Malaia, no ano de

(+) Concentrado protéico destinado à infância cujos ingredientes são o farelo de amendoim, mais 33,33%, em peso, de leite em pó e suplementado com vitaminas e minerais.

1965, um pequeno levantamento em vários produtos como o amendoim descascado e tortas de amendoim, de gergelim, de côco, de soja e milho, importados da Tailândia, China e Vietnã e também da própria Malaia, num total de 69 amostras. Os autores procuraram determinar a presença das aflatoxinas B e G.

CROWTHER (1966a), em Gâmbia, no período de fins de 1965 a meados de 1966, examinou 186 amostras de amendoim e tortas de amendoim, provenientes de várias regiões do país, tendo determinado nelas as aflatoxinas B1 e G1, teor de óleo nas sementes, ácidos graxos livres, contaminação fúngica e deterioração da casca. Faz a sugestão de que se use o índice de contaminação por fungos, como um guia da provável presença ou ausência da aflatoxina, quando, no local, não há possibilidade de análises químicas.

TOURY (1966), no Senegal, determinou aflatoxina em dez lotes constituídos de 246 amostras de amendoim e 9 de torta de amendoim, representando cêrca de 200 toneladas de material. Com as tortas levou a cabo também, testes biológicos com marrequinhos de um dia.

MENEZES e cols. (1966), em trabalho que denominaram de preliminar, examinaram, do ponto de vista microbiológico, amostras de amendoim, torta e farelo, procedentes de várias fábricas do Estado de São Paulo. Dosaram aflatoxina nesses três materiais tendo usado a técnica da cromatografia em papel. O trabalho, todavia, não informa qual a época da coleta das amostras, porém, pelos resultados elevados, deve-se tratar de safra das "águas".

TANGO e cols. (1967), trabalhando com amendoim das "águas" e da "sêca", colhido em fábricas de óleo no Estado de São Paulo, procuraram estabelecer um paralelo entre as duas safras, determinando aflatoxina, ácidos graxos livres e efetuando contagem de fungos.

Finalmente, quanto à possível correlação entre a produção das aflatoxinas B e G, não encontramos nenhuma referência específica em trabalhos desta natureza. Os autores que determinaram ambos metabólitos, não se deram ao trabalho de analisar êste aspecto.

3.- MATERIAL E MÉTODOS

3.1.- Material.

O material utilizado para execução deste trabalho, constou de amostras de torta e farelo de amendoim da safra de 1966/67, coletadas em quarenta fábricas de óleo, localizadas nas principais regiões produtoras de amendoim do Estado de São Paulo, abrangendo uma área de aproximadamente 150.000 quilômetros quadrados. A produção destas fábricas representa cerca de 90% do óleo de amendoim produzido neste Estado.

As fábricas foram agrupadas segundo regiões características deste Estado, cujas denominações são atribuídas em função das ferrovias que as servem, a saber:

a) Sorocabana: de Ourinhos a Santo Anastácio, compreendendo as fábricas de números 1 - 2 - 3 - 4 - 5 e 6.

b) Paulista Nova: de Garça a Dracena, compreendendo as fábricas de números 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 21 - 22 e 23.

c) Noroeste: de Bauru a Guararapes, incluindo Barirí, e compreendendo as fábricas de números 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 e 31.

d) Araraquarense: de Araraquara a Fernandópolis, incluindo Jaboticabal, Monte Alto e Bebedouro, e compreendendo as fábricas de números 32 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 38 - 39 e 40.

O cultivo do amendoim, que é feito em duas épocas do ano, permite a obtenção de duas colheitas por ano, que se processam na estação chuvosa, por volta de janeiro, e na estação seca, por volta de junho. Os amendoins assim chamados, respectivamente, das "águas" e da "seca", estão sujeitos, pelas diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar, a maior ou menor infestação de fungos e, por conseguinte, a maior ou menor elaboração de aflatoxina.

Assim sendo, as amostras foram coletadas em quatro épocas, a saber: março e maio, representando material proveniente da industrialização da safra das "águas", num total de 80 amostras e julho e setembro,

representando material da safra da "sêca", num total de 52 amostras, visto que, nesta, apenas vinte e seis fábricas trabalharam. As análises foram feitas nos dias imediatos após o término das coletas.

De cada fábrica era retirada uma amostra representativa do material e recolhida em sacos plásticos o qual era, posteriormente, colocado dentro de um saco de papel, sobre o qual era feita a identificação da fábrica, da região e da época da coleta.

O material era retirado de vários sacos (entre 10 e 20) , dentre os estocados e quando no momento não havia estoque, o mesmo era retirado na bica de saída do farelo moído.

As fábricas foram identificadas por números, e as épocas de coleta com os nomes dos meses em que foram coletadas as amostras. Como foram feitas duas análises de cada amostra, estas foram identificadas como a e b.

3.2.- Métodos.

3.2.1.- Métodos analíticos.

3.2.1.1.- Preparo das amostras.

As amostras retiradas nas fábricas foram trituradas, passando-se quatro a cinco vezes em moinho de discos (Disc Mill, modelo 4E , The Straub Co., Philadelphia, EE.UU.), para obtenção da finura adequada para a análise, sendo posteriormente, passadas em peneiras de crivo de 841 micra (20 "mesh"). Com estas operações obtinha-se, também, uma melhor homogeneização das mesmas. Em seguida, as amostras eram subdivididas em duas sub-amostras, a e b, que eram novamente guardadas em sacos de plástico ou em vidros fechados, até o momento de serem analisadas.

3.2.1.2.- Extração da toxina.

De cada sub-amostra foram tomadas 20 g, das quais foi extraída a toxina com clorofórmio, de acôrdo com o método LEE (1965). O filtrado obtido denominaremos de solução X. Desta, foram tomados 8 ml e di-

luidos com clorofórmio, a 100 ml em balão volumétrico: solução Y.

3.2.1.3.- Preparo das cromatoplasas.

Placas de vidro de 10 x 20 cm eram preparadas com camada de 500 micra de silicagel-G, segundo o método de COOMES & FEUELL (1965), e guardadas em dessecador contendo silicagel granulada com indicador, até o momento de serem usadas.

3.2.1.4.- Cromatografia da toxina.

A 2 cm da base da cromatoplasa eram colocadas, com o auxílio de micropipetas (Drummond Microcaps), as seguintes alíquotas: 20 microlitros da solução X e 25, 10, 5 e 2,5 microlitros da solução Y. Imediatamente eram colocadas em cubas de vidro, fechadas e desenvolvidas com o solvente clorofórmio-metanol, 95:5, até o solvente atingir 10 cm acima do local das alíquotas. Neste ponto, a placa era retirada, seca rapidamente ao ar e levada à sala escura para dosagem da toxina.

Para o desenvolvimento de cada placa, novo solvente era colocado na cuba, visto que a proporção dos componentes do solvente se modifica, o que altera o caminamento e separação das toxinas.

Para ajudar a saturação da câmara, papel de filtro era colocado no seu interior, encostado em suas paredes.

Com este solvente a aflatoxina era resolvida em dois grupos, a saber: o das B, ficando juntas, portanto, B1 e B2 e o das G, com G1 e G2. Como a produção de B2 e G2 é de, aproximadamente, 1/40 e 1/50 (HARTLEY e cols., 1963), em relação a B1 e G1, respectivamente, não havia interesse, para trabalhos de rotina, em separar os quatro metabólitos, o que demandaria uma técnica mais trabalhosa.

3.2.1.5.- Avaliação do nível de toxidês.

As placas secas, após a cromatografia, eram examinadas em sala escura a distância de 30 cm de uma lâmpada ultra-violeta Phillips Tipo HPW, de 125 watts, com emissão máxima em 365 milimicra. Era observa

da a presença ou ausência de manchas fluorescentes, azul-violeta da aflatoxina B, num $R_f = 0,50 - 0,55$, e esverdeada da aflatoxina G, num $R_f = 0,45 - 0,50$. A menor alíquota em que se podia observar fluorescência, e a seguinte, em que não se conseguia ver manchas, eram usadas para o cálculo do nível de toxidês. Desta maneira, o nível de toxidês era calculado entre dois limites e expresso em partes por milhão, ou seja, em miligramas de aflatoxina por quilo de torta.

O cálculo da aflatoxina presente foi efetuado com o uso da seguinte fórmula (COOMES & FEUELL, 1965):-

Para aflatoxina B:

$$\frac{0,4 \times D}{P \times V} = \text{ppm ou mg/kg}$$

Onde,

D = volume total necessário para diluir a amostra. No nosso caso, se a menor alíquota for proveniente da solução X este valor é igual a 100 e se proveniente da solução Y é igual a 1250.

P = peso da amostra. Usamos sempre 20 g.

V = volume, em microlitros, da menor alíquota em que foi observada fluorescência, o que nos fornecia o limite inferior. Para o limite superior era usada a alíquota seguinte em que não foi observada fluorescência.

Para aflatoxina G:

$$\frac{0,3 \times D}{P \times V} = \text{ppm ou mg/kg}$$

Os valores 0,4 e 0,3, contidos nas fórmulas acima, são de correntes do fato de que, nas condições estabelecidas para esta determinação por COOMES & FEUELL (1965), a menor quantidade de aflatoxina B1 em que pode ser observada fluorescência na placa é 0,0004 microgramas. Da mesma forma, o limite visual para a aflatoxina G1 é 0,0003 microgramas.

Assim sendo, as alíquotas aplicadas fornecem os níveis ou intervalos abaixo relacionados.

Para a aflatoxina B:

Quando a última alíquota em que foi observada fluorescência foi,

- 20 microlitros da solução \underline{X} = entre 0,10 e 1,00 ppm
- 25 microlitros da solução \underline{Y} = entre 1,00 e 2,50 ppm
- 10 microlitros da solução \underline{Y} = entre 2,50 e 5,00 ppm
- 5 microlitros da solução \underline{Y} = entre 5,00 e 10,00 ppm
- 2,5 microlitros da solução \underline{Y} = mais de 10,00 ppm.

Para a aflatoxina G temos:

- 20 microlitros da solução \underline{X} = entre 0,075 e 0,75 ppm
- 25 microlitros da solução \underline{Y} = entre 0,75 e 1,87 ppm
- 10 microlitros da solução \underline{Y} = entre 1,87 e 3,75 ppm
- 5 microlitros da solução \underline{Y} = entre 3,75 e 7,50 ppm
- 2,5 microlitros da solução \underline{Y} = mais de 7,50 ppm

Nos casos em que foi observada fluorescência na menor das alíquotas aplicadas, a solução \underline{Y} foi rediluída e recromatografada, para sabermos qual o limite superior: isso aconteceu em apenas nove amostras.

Periòdicamente, fazíamos correr, na mesma placa que as amostras, extratos de torta com toxidês conhecida e padronizada que trouxeram do Tropical Products Institute, de Londres, ou, então, usávamos uma solução de aflatoxina de concentração conhecida, por nós preparada a partir de aflatoxina B1 pura e cristalizada, que recebemos por cortezia do Dr. Gerald N. Wogan, do Massachusetts Institute of Technology, dos EE.UU.

3.2.2.- Métodos estatísticos.

Para a comparação de incidências, foi empregado o teste χ^2 (chi quadrado), em tabela de contingência (SNEDECOR, 1956).

Para computação de médias foi usado o centro dos intervalos (PEERS, 1965), com as variáveis transformadas em $\log(x+1)$, (SNEDECOR, 1956 e STEEL & TORRIE, 1960).

Para comparação das médias das fábricas foi utilizado o teste "t" (SNEDECOR, 1956). Para êste teste, tomamos as 26 fábricas que trabalharam nas duas safras, calculamos a média de cada uma em cada safra,

computamos a diferença entre estes dois valores e aplicamos o teste "t", nas diferenças das médias das "águas" menos a média da "sêca".

O cálculo da correlação entre as aflatoxinas B e G foi feito de acordo com SNEDECOR (1956), também com as variáveis transformadas em $\log(x+1)$.

Para a análise da variância dos dados consideramos o modelo:

$$Y_{ijkl} = u + f_i + p_j + (fp)_{ij} + n_{k(j)} + (fn)_{ik(j)} + a_l(ijk)$$

onde:

$$i = 1, 2, 3, \dots, 26.$$

$$j = 1, 2.$$

$$k = 1, 2.$$

$$l = 1, 2.$$

tendo os efeitos, todos aleatórios, o seguinte significado:

f = efeito de fábricas.

p = efeito de safras.

(fp) = efeito da interação fábrica x safra.

n = efeito do mês (ou época) dentro da safra.

(fn) = efeito da interação fábrica x mês, dentro da safra.

a = efeito da amostra dentro de safra, fábrica e mês.

A análise da variância foi feita para estimar as variâncias relativas a cada efeito. Também analisamos os dados transformados para $\log(x+1)$.

A esperança matemática dos quadrados médios foi computada, conforme BENNETT & FRANKLIN (1954).

Os centros dos intervalos com os quais foram feitos os cálculos acima referidos, são os seguintes:

<u>Aflatoxina B</u>		<u>Aflatoxina G</u>	
Intervalo	Centro	Intervalo	Centro
0,00 - 0,05	0,025	0,00 - 0,075	0,0375
0,05 - 0,10	0,075	0,075 - 0,75	0,4125
0,10 - 1,00	0,55	0,75 - 1,87	1,31
1,00 - 2,50	1,75	1,87 - 3,75	2,81
2,50 - 5,00	3,75	3,75 - 7,50	5,625
5,00 - 10,00	7,50	7,50 - 10,00	8,75
10,00 - 20,00	15,00	-	-

0 0 0 0

4.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.- Resultados.

Os resultados das análises das aflatoxinas B e G para tôdas as amostras são apresentados, por região e por safra, nos quadros de números 1 a 16, a seguir.

QUADRO Nº 1

Ocorrência de aflatoxina B na região Sorocabana, nas "águas".

(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	M A R Ç O		M A I O	
	a	b	a	b
1	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
2	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0
3	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	5,0 - 10,0
4	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
6	2,5 - 5,0	5,0 - 10,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0

QUADRO Nº 2

Ocorrência de aflatoxina B na região Sorocabana, na "sêca".

(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	J U L H O		S E T E M B R O	
	a	b	a	b
1	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0
2	-	-	-	-
3	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5
4	2,5 - 5,0	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5
5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5
6	2,5 - 5,0	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5

Obs.- Os locais não preenchidos referem-se às fábricas que não trabalharam com a safra da "sêca".

QUADRO Nº 3

Ocorrência de aflatoxina B na região Paulista Nova, nas "águas".
(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	M A R Ç O				M A I O				
	a		b		a		b		
7	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0	10,0	-	20,0
8	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0	1,0	-	2,5
9	10,0	-	20,0	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0
10	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0
11	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0	10,0	-	20,0
12	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0
13	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0	5,0	-	10,0
14	1,0	-	2,5	1,0	-	2,5	5,0	-	10,0
15	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0	5,0	-	10,0
16	5,0	-	10,0	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0
17	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0	10,0	-	20,0
18	2,5	-	5,0	5,0	-	10,0	2,5	-	5,0
19	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0	1,0	-	2,5
20	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0	2,5	-	5,0
21	2,5	-	5,0	5,0	-	10,0	2,5	-	5,0
22	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0	5,0	-	10,0
23	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0

QUADRO Nº 4

Ocorrência de aflatoxina B na região Paulista Nova, na "sêca".
(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	J U L H O				S E T E M B R O				
	a		b		a		b		
7	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	0,1	-	1,0	1,0	-	2,5	0,1	-	1,0
9	1,0	-	2,5	1,0	-	2,5	0,1	-	1,0
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1,0	-	2,5	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0
15	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0	1,0	-	2,5
16	0,1	-	1,0	1,0	-	2,5	2,5	-	5,0
17	2,5	-	5,0	2,5	-	5,0	1,0	-	2,5
18	0,1	-	1,0	0,1	-	1,0	1,0	-	2,5
19	2,5	-	5,0	5,0	-	10,0	1,0	-	2,5
20	1,0	-	2,5	0,1	-	1,0	0,1	-	1,0
21	1,0	-	2,5	1,0	-	2,5	0,1	-	1,0
22	1,0	-	2,5	1,0	-	2,5	1,0	-	2,5
23	1,0	-	2,5	1,0	-	2,5	2,5	-	5,0

Obs.- Os locais não preenchidos referem-se às fábricas que não trabalharam com a safra da "sêca".

QUADRO Nº 5

Ocorrência de aflatoxina B na região Noroeste, nas "águas".

(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	M A R Ç O		M A I O	
	a	b	a	b
24	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
25	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
26	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	5,0 - 10,0
27	2,5 - 5,0	5,0 - 10,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
28	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0	10,0 - 20,0	5,0 - 10,0
29	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0
30	2,5 - 5,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0	2,5 - 5,0
31	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0

QUADRO Nº 6

Ocorrência de aflatoxina B na região Noroeste, na "sêca".

(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	J U L H O		S E T E M B R O	
	a	b	a	b
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0
27	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0
28	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5

Obs.- Os locais não preenchidos referem-se às fábricas que não trabalharam com a safra da "sêca".

QUADRO Nº 7

Ocorrência de aflatoxina B na região Araraquarense, nas "águas".
(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	M A R Ç O		M A I O	
	a	b	a	b
32	2,5 - 5,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0
33	0,1 - 1,0	1,0 - 2,5	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0
34	5,0 - 10,0	10,0 - 20,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0
35	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0
36	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	5,0 - 10,0
37	10,0 - 20,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0
38	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0
39	2,5 - 5,0	5,0 - 10,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
40	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0

QUADRO Nº 8

Ocorrência de aflatoxina B na região Araraquarense, na "sêca".
(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	J U L H O		S E T E M B R O	
	a	b	a	b
32	- -	- -	- -	- -
33	- -	- -	- -	- -
34	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
35	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
36	- -	- -	- -	- -
37	1,0 - 2,5	2,5 - 5,0	1,0 - 2,5	1,0 - 2,5
38	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
39	- -	- -	- -	- -
40	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0	0,1 - 1,0

Obs.- Os locais não preenchidos referem-se às fábricas que não trabalharam com a safra da "sêca".

QUADRO Nº 9

Ocorrência de aflatoxina G na região Sorocabana, nas "águas".

(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	M A R Ç O		M A I O	
	a	b	a	b
1	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
2	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
3	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75
4	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
5	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
6	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87

QUADRO Nº 10

Ocorrência de aflatoxina G na região Sorocabana, na "sêca".

(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	J U L H O		S E T E M B R O	
	a	b	a	b
1	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
2	-	-	-	-
3	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
4	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87
5	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
6	1,87 - 3,75	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87

Obs.- Os locais não preenchidos referem-se às fábricas que não trabalharam com a safra da "sêca".

QUADRO Nº 11

Ocorrência de aflatoxina G na região Paulista Nova, nas "águas".
(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	M A R Ç O		M A I O	
	a	b	a	b
7	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	3,75 - 7,50	1,87 - 3,75
8	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
9	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75
10	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
11	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75
12	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75
13	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87
14	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	1,87 - 3,75
15	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
16	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
17	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
18	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87
19	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75
20	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
21	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,00 - 0,075
22	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	0,075 - 0,75
23	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75

QUADRO Nº 12

Ocorrência de aflatoxina G na região Paulista Nova, na "sêca".
(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	J U L H O		S E T E M B R O	
	a	b	a	b
7	-	-	-	-
8	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
9	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	0,75 - 1,87	1,87 - 3,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
15	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
16	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
17	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
18	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75
19	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
20	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
21	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
22	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
23	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75

Obs.- Os locais não preenchidos referem-se às fábricas que não trabalharam com a safra da "sêca".

QUADRO Nº 13

Ocorrência de aflatoxina G na região Noroeste, nas "águas".

(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	M A R Ç O		M A I O	
	a	b	a	b
24	0,00 - 0,075	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
25	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
26	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	1,87 - 3,75	3,75 - 7,50
27	0,75 - 1,87	1,87 - 3,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
28	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87
29	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
30	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87
31	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75

QUADRO Nº 14

Ocorrência de aflatoxina G na região Noroeste, na "sêca".

(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	J U L H O		S E T E M B R O	
	a	b	a	b
24	- -	- -	- -	- -
25	- -	- -	- -	- -
26	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
27	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
28	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
29	- -	- -	- -	- -
30	- -	- -	- -	- -
31	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75

Obs.- Os locais não preenchidos referem-se às fábricas que não trabalharam com a safra da "sêca".

QUADRO Nº 15

Ocorrência de aflatoxina G na região Araraquarense, nas "águas".
(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	M A R Ç O		M A I O	
	a	b	a	b
32	0,75 - 1,87	1,87 - 3,75	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50
33	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	7,50 - 10,00	7,50 - 10,00
34	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50	7,50 - 10,00
35	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	1,87 - 3,75
36	1,87 - 3,75	3,75 - 7,50	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75
37	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50
38	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50	3,75 - 7,50
39	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
40	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75

QUADRO Nº 16

Ocorrência de aflatoxina G na região Araraquarense, na "sêca".
(expresso em partes por milhão)

Fábrica número	J U L H O		S E T E M B R O	
	a	b	a	b
32	- -	- -	- -	- -
33	- -	- -	- -	- -
34	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75
35	0,075 - 0,75	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87	0,75 - 1,87
36	- -	- -	- -	- -
37	0,75 - 1,87	1,87 - 3,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75
38	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75	1,87 - 3,75
39	- -	- -	- -	- -
40	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75	0,075 - 0,75

Obs.- Os locais não preenchidos referem-se às fábricas que não trabalharam com a safra da "sêca".

4.2.- Discussão.

4.2.1- Considerações gerais.

Neste trabalho fizemos dosagem das aflatoxinas B e G, embora os autores em geral, até bem pouco tempo, costumassem expressar a toxicidade em termos de B1, que é a mais tóxica e a produzida em maior quantidade, conforme havia sido preconizado por ALLCROFT & CARNAGHAN (1963). Todavia, estudos posteriores demonstraram que este procedimento era inadequado, pois que, os resultados baseados unicamente na fluorescência da aflatoxina B1 não correlacionavam bem com os testes biológicos, visto que em muitos casos, a aflatoxina G era o composto mais abundante na mistura (SARGEANT e cols., 1963). Além disso, há linhagens de A.flavus que só produzem aflatoxina G (ANÔNIMO, 1963 e LIM & YEAP, 1966).

Hoje há preocupação de fornecer os teores de B1 e G1, ou simplesmente de B e G, visto que a aflatoxina G1 tem metade da toxicidade da B1 e quando é produzida em grande quantidade, realmente contribui para o aumento da toxicidade da torta.

A avaliação da toxicidade em níveis ou categorias é plenamente justificada num trabalho desta natureza onde se deseja saber qual a extensão e nível de incidência da toxina. Uma aferição mais precisa é de interesse mais acadêmico ou especial, ou em análises esparsas (CROWTHER, 1966b, FEUELL, 1966, WOGAN, 1966). Este procedimento é corrente entre os autores, o que pode ser observado, por exemplo em PEERS (1965), SELLS-CHOP e cols. (1965), LIM & YEAP (1966), TOURY (1966), MENEZES e cols. (1966) e TANGO e cols. (1967).

Os níveis ou categorias de toxicidade estão intimamente relacionados com os testes biológicos em marrequinhos de um dia, que foi a primeira maneira de avaliar a toxicidade de tortas (SARGEANT e cols., 1961b). É evidente que os números absolutos do conteúdo de aflatoxina não darão qualquer informação de sua toxicidade, a não ser quando relacionados seus efeitos nos referidos testes. Estas categorias variam ligeiramente, de

um laboratório para outro, mas, em linhas gerais, o critério estabelecido é o mesmo e pode ser observado no quadro nº 17.

QUADRO Nº 17

Correspondência entre níveis de aflatoxina e categorias de toxidês.

Categoria de toxidês	Nível de aflatoxina B1
Muito alta	Acima de 1,00 ppm
Alta	Entre 0,25 e 1,00 ppm
Média	Entre 0,05 e 0,25 ppm
Baixa ou Negativa	Abaixo de 0,05 ppm

Quadro elaborado pelo Tropical Products Institute (1962).

Os termos usados na classificação da toxidês da torta, baseada nos testes biológicos, são definidos pelo CENTRAL VETERINARY LABORATORY, de Weybridge, Inglaterra, da seguinte maneira:

- a) Fortemente tóxica - Os marrequinhos morrem com lesões histológicas características no fígado.
(correspondendo a proximadamente a categoria físico-química "Muito alta").
- b) Moderadamente tóxica - Os marrequinhos sobrevivem e são sacrificados sete dias após o início da administração das doses. Lesões histológicas do fígado estão presentes em alto grau.
(correspondendo aproximadamente à categoria "Alta").
- c) Ligeiramente tóxica - Os marrequinhos sobrevivem e são sacrificados sete dias após o início da administração das doses. Lesões histológicas estão presentes no fígado, mas são menos severas que na categoria anterior.
(correspondendo aproximadamente à categoria "Média").

d) Não tóxica

(correspondendo às categorias "Baixa" e "Negativa").

- Os marrequinhos sobrevivem e são sacrificados sete dias após o início da administração das doses. Não ha mudanças-histológicas no fígado.

Conforme frisa o TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE (1962), " a correlação do teste biológico com o teste físico-químico é aproximado e sujeito à variação comumente experimentada em ensaios biológicos ".

A nossa escala de categorias foi ligeiramente modificada , conforme pôde ser observado, para maior facilidade dos trabalhos de análise. Além disso, quando do início dos nossos trabalhos, verificamos que os valôres encontrados eram bastante elevados, o que foi plenamente confirmado pelos resultados, e por isso resolvemos esmiuçar mais a categoria "Muito alta", ou seja, tortas com mais de 1,00 ppm.

A discussão dos resultados, para maior clareza, foi dividida em três partes: na primeira é discutido o comportamento da aflatoxina B, na segunda o comportamento da aflatoxina G e na terceira, as interações, comparações e correlações.

4.2.2.- Aflatoxina B.

4.2.2.1.- Apreciação global.

Conforme se pode inferir dos quadros de números 1 a 8, a aflatoxina B esteve presente em tôdas as tortas e variou entre os limites de 0,10 e 20,00 ppm, com esmagadora maioria na categoria de toxidês-"Muito alta", conforme podemos ver no quadro nº 18.

Pelos dados do quadro nº 18 verificamos que não temos nenhuma incidência nas categorias "Baixa ou Negativa" e "Média", que 10,22% estão na categoria "Alta" e que 89,78% estão na "Muito alta". A toxidês - das tortas, como se vê, é bastante elevada e para que se tenha uma idéia do significado dos resultados encontrados, podemos citar que a concentração de aflatoxina B1 na torta brasileira que dizimou os peruzinhos na In

QUADRO Nº 18

Distribuição do número de incidências de aflatoxina B, por níveis e respectivas categorias de toxidês.

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Nível	n	%	Categoria de toxidês
0,0 - 0,05	0	0,00	Baixa ou Negativa
0,05 - 0,1	0	0,00	Média
0,1 - 1,0	27	10,22	Alta
1,0 - 2,5	65	24,62	Muito alta
2,5 - 5,0	103	39,02	
5,0 - 10,0	61	23,11	
10,0 - 20,0	8	3,03	
Total	264	100,00	

glaterra em 1960, estava, principalmente, entre 2,0 e 5,0 ppm (CENTRAL VETERINARY LABORATORY, Weybridge). Note-se, ainda com dados do quadro nº 18, que temos 65,16% de amostras com mais de 2,5 ppm.

É interessante assinalar também, dentro desta discussão, - duas ocorrências. Uma delas é a presença, na safra das "águas", de duas amostras com 20,0 ppm de aflatoxina B, que foram as mais tóxicas. A outra é referente à fábrica nº 40 que apresentou as tortas menos tóxicas em tôdas as análises: suas oito sub-amostras estavam no intervalo 0,1 a 1,0 ppm.

Entre nós, MENEZES e cols. (1966), embora tenham usado a cromatografia em papel para determinação da aflatoxina que, segundo CROWTHER (1966c), é menos precisa e fornece resultados um pouco mais baixos, em relação à cromatografia em camada delgada, encontraram uma situação - bastante semelhante à nossa. Concluíram, pelos seus trabalhos que apenas 3% das tortas e farelos analisados estariam em condições de serem

usados em rações para animais.

TANGO e cols. (1967), trabalhando com amendoim em casca, verificaram que o material examinado era muito tóxico e encontraram, numa das coletas, 59,40% das amostras nas categorias "Alta" e "Muito alta".

De acôrdo com estudos ainda em andamento no Central Laboratory de Weybridge, Inglaterra, e portanto ainda sujeitos a comprovação, tortas com menos de 0,1 ppm podem entrar em proporções normais na composição de rações. Nesta categoria não tivemos nenhuma incidência, o que significa que nenhuma das tortas estaria em condições de ser usada indiscriminadamente. Dentro daqueles mesmos estudos, tortas que tenham entre 0,1 e 1,0 ppm de aflatoxina, poderiam ser usadas em proporções de 5 a 15% nas rações destinadas à determinadas espécies animais e, dentro destas, ainda dependendo da finalidade e da idade do animal, nunca sendo permitido seu uso para animais em lactação. Dentro desta categoria temos apenas 10,22% das nossas tortas. Acima de 1,0 ppm até 5,0 ppm seu uso é restrito em rações destinadas apenas a animais adultos, em regime de engorda, de algumas poucas espécies: bovinos, ovinos, suínos, galinhas poedeiras e frangos de engorda. O uso das tortas, neste caso, seria de 3 a 10% do total da ração. Nesta categoria temos 63,64%, ou seja, a maioria. O restante das tortas analisadas, representando 26,14%, teriam seu uso em rações praticamente proscrito, sendo permitido apenas para ovinos de engorda que, surpreendentemente, resistem à elevadas doses de aflatoxina sem mostrarem efeito adverso.

A situação, em outros países, é bastante variável. McDONALD & HARKNESS (1963), na Nigéria, mostraram, em seu trabalho, que as 40 amostras de amendoim analisadas variaram, em sua maioria, de "Negativas" a 0,5 ppm, apenas 3 ultrapassando aquele limite.

McDONALD & A'BROOK (1963), em levantamento no norte da Nigéria, não encontraram valores acima de 0,5 ppm, no amendoim.

SELLSCHOP e cols. (1965), relatam que, na África do Sul, quando iniciaram seu trabalho em 1963, a toxidês e a percentagem de amostras

tras tóxicas de amendoim, eram elevadas. Certas partidas chegaram a apresentar 75,00% das amostras com mais de 2,0 ppm. Já no ano seguinte decresceu o número de amostras tóxicas, o que foi, segundo aqueles autores, em parte devido à medidas restritivas na aceitação de amendoim mofado. Tortas de amendoim foram analisadas somente quando eram suspeitas de terem causado mortes em animais e, das 16 examinadas, 11 tinham mais de 2,0 ppm.

Os excelentes estudos de PEERS (1965), em Vom, também na Nigéria, revelaram que a toxidês das primeiras partidas de torta em 1963, deu a média de 0,34 ppm, e que, com as medidas de melhoria de armazenamento e seleção, a toxidês média foi baixando até estabilizar-se, em 1965, nas duas últimas partidas, em 0,02 ppm o que representa um nível bastante satisfatório.

LIM & YEAP (1966), verificaram na Malaia que, das 69 amostras examinadas, 25 estavam isentas e que, das tóxicas, apenas 8 tinham aflatoxina B e estavam nas categorias "Alta" e "Muito alta".

Pelo relato de CROWTHER (1966a), sobre seu trabalho em Gâmbia, verifica-se que a incidência de aflatoxina e o nível de toxidês em tortas de amendoim, variaram bastante. Na primeira partida, proveniente de Denton Bridge, 52,80% eram "Negativas", 18,80% "Médias" e 28,40% eram "Altas", não se registrando nenhuma na categoria "Muito alta". Já na partida proveniente de Bansang, houve registro de tortas extremamente tóxicas, chegando a apresentar uma amostra com 40,0 ppm da B1 e 30,0 ppm da G1. Este material estava bastante mofado e o autor observa que, o fato deste local ser muito úmido, o armazenamento péssimo ou deficiente deve ser a causa desta elevadíssima quantidade de aflatoxina. As restantes partidas não registraram resultados muito altos, predominando as categorias "Negativa" e "Média".

Os estudos de TOURY (1966), no Senegal, revelaram que, das 246 amostras de amendoim analisadas, apenas 16,00% eram tóxicas e que destas, somente 2 tinham mais de 1,0 ppm. Quanto às tortas de amendoim, todas eram tóxicas, porém, estavam na categoria "Média", pois variavam en-

tre 0,05 e 0,12 ppm.

Pelo que se pode concluir, o nível de toxidês por nós encontrado, é bem mais elevado, no cômputo geral, do que o encontrado pelos demais autores, especialmente em levantamentos de outros países.

4.2.2.2.- Influência da safra.

O nível de toxidês nas tortas e farelos, provenientes da safra das "águas", foi bem mais elevado que nas provenientes da safra da "sêca", o que pode ser observado no quadro nº 19.

QUADRO Nº 19

Distribuição do número de incidências de aflatoxina B por categoria e por safra.

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categoria	"Á g u a s"		"S ê c a"	
	n	%	n	%
0,0 - 0,05	0	0,00	0	0,00
0,05 - 0,1	0	0,00	0	0,00
0,1 - 1,0	5	3,12	22	21,15
1,0 - 2,5	14	8,75	51	49,04
2,5 - 5,0	73	45,63	30	28,85
5,0 - 10,0	60	37,50	1	0,96
10,0 - 20,0	8	5,00	0	0,00
Total	160	100,00	104	100,00

Isto já era de se esperar, visto que, as condições de clima durante a colheita, secagem e armazenamento, precedente à industrialização da safra das "águas" é bastante favorável ao desenvolvimento de fungos. Pelo quadro nº 19 vemos que, embora na "sêca" a toxidês tenha diminuído, ainda temos na categoria "Muito alta", 78,85% das amostras, con

tra 96,88% nas "águas".

Este mesmo comportamento foi constatado na Índia (GOPALAN, 1965), onde o material proveniente da estação chuvosa foi quase três vezes mais tóxico que o da seca.

Entre nós, TANGO e cols. (1967), trabalhando com amendoim, encontraram nas categorias "Alta" e "Muito alta", 59,40% das amostras das "águas" e apenas 37,10% das amostras da "seca".

Aplicando o teste do χ^2 para comparar as percentagens de incidência em cada categoria, nas "águas" e na "seca", e assumindo que as percentagens para cada categoria seriam as mesmas em ambas as safras, obtivemos um valor igual a 105,11⁺⁺⁺, com 4 graus de liberdade (foram eliminadas deste cálculo as duas categorias mais baixas por apresentarem incidências iguais a zero). Este valor nos mostra que houve uma diferença altamente significativa, ao nível de 0,1% de probabilidade. Aliás, a diferença das médias encontradas para as duas safras, decorrente da significância do χ^2 , é bastante eloquente: 4,78 ppm para as "águas" e 1,88 ppm para a "seca". A média geral foi de 3,08 ppm.

O que, de certo modo, nos surpreende é o valor ainda muito elevado para a safra da "seca", porém, confirma os resultados de TANGO e cols. (1967). Muito provavelmente é devido ao armazenamento, na fábrica, do amendoim recebido do lavrador, ainda com elevado teor de umidade. Corroborando esta hipótese, PARPIA (1966), na Índia, cita que amendoim seco totalmente ao sol, em condições idênticas às da "seca" em nosso Estado, estavam livres de aflatoxina, ou tinham menos de 0,05 ppm.

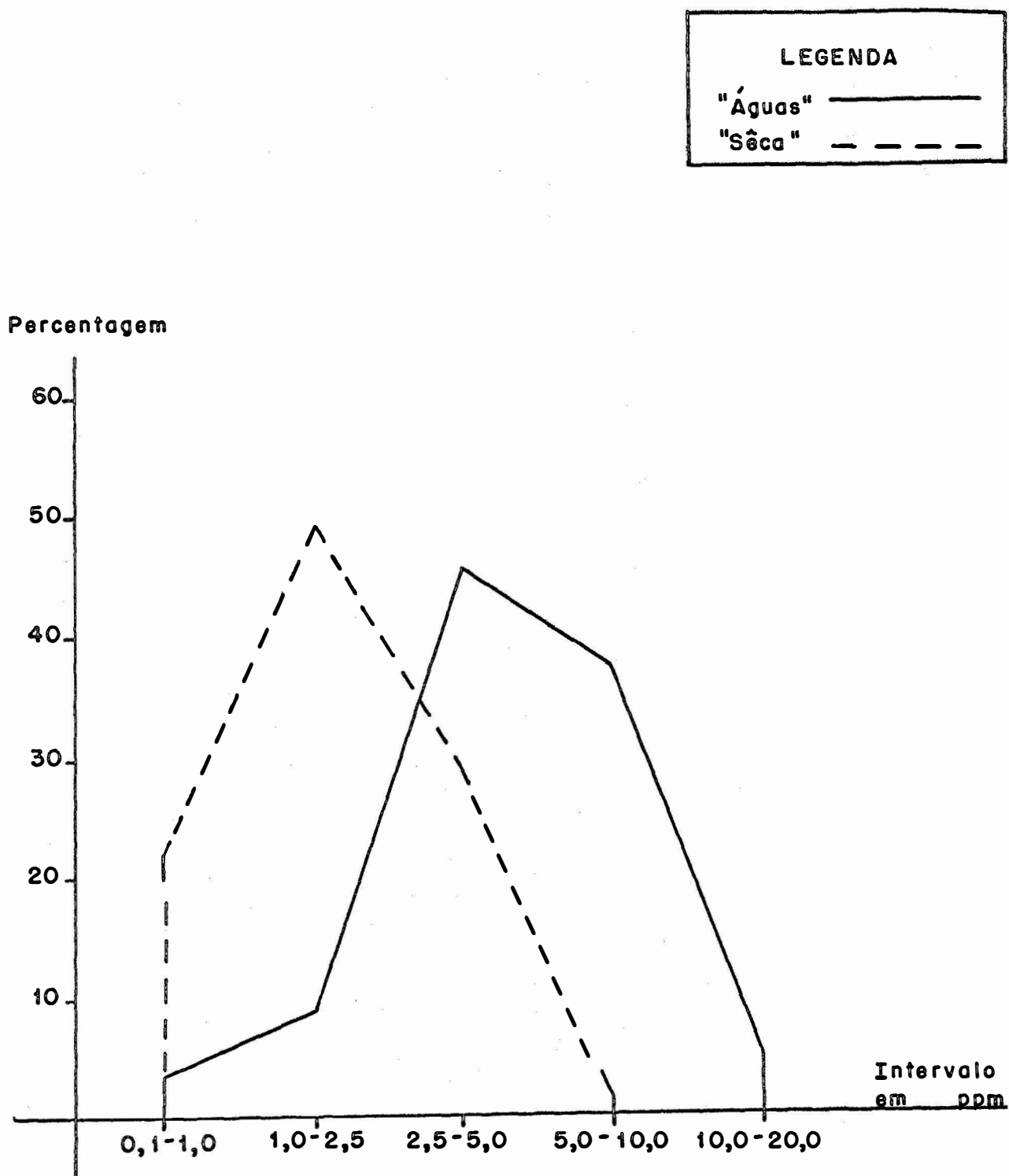
Para melhor visualização da distribuição das incidências entre "águas" e "seca" apresentamos a figura nº 1.

4.2.2.3.- Influência da época, dentro da safra.

Fizemos tomada de amostras em duas épocas, dentro de uma mesma safra, com a finalidade de termos amostras cronologicamente diferentes, para verificarmos se haveria diferença entre elas, no tocante à

FIGURA Nº 1

Distribuição da incidência de aflatoxina B.



Polígonos de frequência das incidências da aflatoxina B, por intervalos e percentagens, nas "águas" e na "sêca".

toxidês. De fato, houve variação entre as épocas de coleta dentro de uma mesma safra, porém pequena, conforme pode ser observado nos quadros de números 20 e 21.

QUADRO Nº 20

Distribuição do número de incidências de aflatoxina B, por categoria e por época de coleta, dentro da safra das "águas".

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categoria	M a r ç o		M a i o	
	n	%	n	%
0,0 - 0,05	0	0,00	0	0,00
0,05 - 0,1	0	0,00	0	0,00
0,1 - 1,0	3	3,75	2	2,50
1,0 - 2,5	11	13,75	3	3,75
2,5 - 5,0	36	45,00	37	46,25
5,0 - 10,0	27	33,75	33	41,25
10,0 - 20,0	3	3,75	5	6,25
Total	80	100,00	80	100,00

As percentagens de incidência por época de coleta, assumindo a hipótese de serem iguais para cada categoria, foram comparadas estatisticamente e ofereceram o seguinte resultado: março vs. maio, $\chi^2 = 5,87$, com 4 graus de liberdade (foram eliminadas deste cálculo as duas categorias mais baixas por não apresentarem incidências), e julho vs. setembro, $\chi^2 = 0,87$, com 2 graus de liberdade (foram eliminadas deste cálculo as duas categorias mais baixas, por não apresentarem incidências e as duas mais altas por apresentarem incidência quase nula). Ambas acusaram diferenças não significativas. Todavia observa-se, pelos valores do χ^2 , que, entre março e maio houve uma diferença maior que entre julho e setembro.

As médias obtidas para as diversas épocas foram: 4,38 ppm

QUADRO Nº 21

Distribuição do número de incidências de aflatoxina B₁ por categoria e por época de coleta, dentro da safra da "sêca".

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categoria	J u l h o		S e t e m b r o	
	n	%	n	%
0,0 - 0,05	0	0,00	0	0,00
0,05 - 0,1	0	0,00	0	0,00
0,1 - 1,0	9	17,31	13	25,00
1,0 - 2,5	26	50,00	25	48,08
2,5 - 5,0	16	30,77	14	26,92
5,0 - 10,0	1	1,92	0	0,00
10,0 - 20,0	0	0,00	0	0,00
Total	52	100,00	52	100,00

para março e 5,21 ppm para maio, dentro da safra das "águas" e 2,01 ppm para julho e 1,76 ppm para setembro, dentro da "sêca".

Fizemos também uma comparação das diferenças das médias entre "águas" e "sêca", por fábricas individualmente, assumindo não haver diferença entre as duas safras. Para isto tomamos as diferenças das médias de cada fábrica e aplicamos o teste "t" que foi igual a 8,56^{***} com 25 graus de liberdade. Isto nos indica que houve uma diferença altamente significativa, ao nível de 0,1% de probabilidade. A diferença média entre as duas safras foi de 2,99 ppm.

4.2.2.4.- Influência da região.

Os resultados mostram que houve variação entre as regiões-pesquisadas, o que pode ser constatado no quadro nº 22.

O teste X^2 , aplicado para verificarmos se havia diferença-

QUADRO Nº 22

Distribuição do número de incidências de aflatoxina B₁ por categoria e por região.

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categoria	Sorocabana		Paulista Nova		Noroeste		Araraquarense	
	n	%	n	%	n	%	n	%
0,0 - 0,05	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
0,05 - 0,1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
0,1 - 1,0	2	4,54	12	10,35	4	8,33	9	16,07
1,0 - 2,5	20	45,46	28	24,14	11	22,92	6	10,71
2,5 - 5,0	18	40,91	40	34,48	23	47,92	22	39,29
5,0 - 10,0	4	9,09	31	26,72	9	18,75	17	30,36
10,0 - 20,0	0	0,00	5	4,31	1	2,08	2	3,57
Total	44	100,00	116	100,00	48	100,00	56	100,00

significativa nas percentagens de incidência por categorias entre as regiões, englobadamente, nos forneceu um valor igual a 25,06^{**}, com 9 graus de liberdade (tendo sido eliminadas as duas categorias mais baixas por não registrarem incidências e agrupadas as duas mais elevadas por apresentarem pequena frequência), evidenciou que houve um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade.

As médias calculadas para as regiões, foram as constantes do quadro nº 23.

Pelo exame das médias verificamos que, tanto nas "águas" como na "sêca", a região que apresentou menor toxidês foi a Sorocabana. A Paulista Nova foi a mais tóxica nas "águas" e a Araraquarense o foi na "sêca", ficando também, esta região, com a maior média geral.

QUADRO Nº 23

Médias de aflatoxina B das regiões, por safra e geral.

(espresso em partes por milhão)

Região	"Águas"	"Sêca"	Geral
Sorocabana	3,78	1,74	2,62
Paulista Nova	5,50	1,76	3,24
Noroeste	4,43	1,83	2,92
Araraquarense	4,55	2,40	3,35

Os trabalhos anteriores levados a efeito em nosso Estado, por MENEZES e cols. (1966) e por TANGO e cols. (1967), não permitem estabelecer um paralelo com a presente pesquisa, visto aqueles autores não terem abordado a questão.

Os trabalhos de McDONALD & HARKNESS (1963), na Nigéria, de SELLSCHOP e cols. (1965), na África do Sul e de CROWTHER (1966a), em Gâmbia, revelaram que tôdas as regiões pesquisadas acusaram a presença de a flatoxina e que houve bastante variação entre elas.

Estudando também a variação nas percentagens de incidência das regiões, duas a duas, aplicamos também o teste X^2 , que forneceu os resultados constantes do quadro nº 24.

Os resultados nos indicam que houve diferenças acentuadas entre a Sorocabana e a Paulista Nova, e entre a Sorocabana e a Araraquarense. As diferenças não foram grandes no confronto das demais regiões.

Fizemos apenas uma comparação visual, sem consultar as tabelas do X^2 e sem interpretar os resultados em termos de probabilidade, visto o número total de graus de liberdade, no desdobramento, exceder o valor real.

Os fatores que mais contribuíram para essas diferenças ainda nos são desconhecidos, mas, entre êles, poderíamos alinhar os seguintes:

QUADRO Nº 24

Valores de X^2 na comparação de regiões, duas a duas.

Regiões Comparadas	G.L.	X^2
Sorocabana vs. Paulista Nova	3	12,61
Sorocabana vs. Noroeste	3	6,30
Sorocabana vs. Araraquarense	3	21,03
Paulista Nova vs. Noroeste	3	2,89
Paulista Nova vs. Araraquarense	3	4,73
Noroeste vs. Araraquarense	3	5,61

a) recebimento, pela fábrica, de matéria prima com alto teor de umidade, variável entre as regiões;

b) tipo e tempo de armazenamento diferentes;

c) umidade relativa do ar na região;

d) linhagens diferentes de Aspergillus flavus.

Somos de opinião que os dois primeiros itens são os principais responsáveis pelas diferenças encontradas na incidência de aflatoxina B, entre as regiões.

4.2.2.5.- Análise da variância.

Os resultados obtidos pela análise da variância constam do quadro nº 25.

A seguir foram calculadas as estimativas das variâncias de cada fator, para que pudessemos avaliar a participação de cada um deles na variância total das observações. Os resultados constam do quadro número 26.

QUADRO Nº 25

Análise da variância de todos os dados, transformados em $\log(x+1)$.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	E (Q.M.)
Fábricas (F)	25	3,56695	0,14268	$\sigma_a^2 + 2\sigma_{fn}^2 + 8\sigma_f^2$
Safras (S)	1	4,31355	4,31355	$\sigma_a^2 + 0,7\sigma_{fn}^2 + 52\sigma_n^2 + 1,46\sigma_{fp}^2 + 104\sigma_p^2$
F x S	25	1,46735	0,05869	$\sigma_a^2 + 2\sigma_{fn}^2 + 4\sigma_{fp}^2$
Meses d. safra (M)	2	0,03701	0,01850	$\sigma_a^2 + 0,7\sigma_{fn}^2 + 52\sigma_n^2$
M x F dentro de S	50	1,68155	0,03363	$\sigma_a^2 + 2\sigma_{fn}^2$
Amostragem	104	1,05079	0,01010	σ_a^2
Total	207	12,11720	4,57715	

QUADRO Nº 26

Estimativa das variâncias de cada fator de variação.

Fator de variação	$\hat{\sigma}^2$	%	
Fábricas (F)	σ_f^2	0,013630	16,45
Safras (S)	σ_p^2	0,041120	49,62
F x S	σ_{fp}^2	0,006260	7,55
Meses d. safra (M)	σ_n^2	0,000003	0,00
M x F dentro de S	σ_{fn}^2	0,011760	14,19
Amostragem	σ_a^2	0,010100	12,19
Total		0,082873	100,00

Pelo que se pode deduzir facilmente do quadro nº 26, o maior fator de variação foram as safras, respondendo por 49,62% do total. A participação do erro de amostragem foi pequeno, com 12,19%, o que é plenamente satisfatório em trabalhos desta natureza. A variação entre as fábricas contribuiu com 16,45% e a variação entre os meses de coleta, dentro de uma mesma safra, foi quase nula, dentro da variação total.

4.2.3.- Aflatoxina G.4.2.3.1.- Apreciação global.

Como se pode observar nos quadros de números 9 a 16, a aflatoxina G esteve presente em praticamente tôdas as tortas, e variou de 0,0 a 10,0 ppm. O maior número de incidências caiu no intervalo de 0,075 a 0,75 ppm, o que pode ser constatado pelos dados do quadro nº 27.

QUADRO Nº 27

Distribuição do número de incidências de aflatoxina G, por categorias.

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categorias	n	%
0,00 - 0,075	3	1,13
0,075 - 0,75	155	58,72
0,75 - 1,87	54	20,45
1,87 - 3,75	33	12,50
3,75 - 7,50	16	6,06
7,50 - 10,00	3	1,13
Total	264	100,00

Pelo que se pode inferir do quadro nº 27, a aflatoxina G, embora ocorrendo em níveis mais baixos que a aflatoxina B, também participa, com uma bôa parcela, na toxidês total das tortas. Se considerarmos que a G tem a metade da toxidês da B e tomássemos a metade do valor médio de cada intervalo, veríamos que nas quatro categorias mais elevadas, equivalendo a mais de 0,25 ppm de B, cairiam 106 amostras, representando 40,14% do total. Estas, só pela presença da aflatoxina G, já seriam incluídas nas categorias de toxidês "Alta" e "Muito alta".

Se determinarmos os valôres absolutos das aflatoxinas B e G para cada torta, e somarmos o valor da B com metade do valor da G, te-

remos a toxidês total da torta ainda maior, tornando a situação mais delicada.

A determinação da aflatoxina G, além da B, em trabalhos desta natureza, já foi efetuada por LIM & YEAP (1966), os quais constataram que, das 69 amostras examinadas, 19 eram tóxicas e tôdas tinham a aflatoxina G em níveis que foram até 2,00 ppm.

CROWTHER (1966a), em Gâmbia, das 186 amostras que examinou, constatou a presença da aflatoxina G em 46 delas. Uma das amostras chegou a apresentar 30,00 ppm.

Comparando os resultados por nós encontrados com os dêstes autores, verificamos que, em seus trabalhos, a aflatoxina G ocorreu de uma maneira parcial, ao passo que, no nosso, sua ocorrência foi geral.

Os demais levantamentos não abordaram o problema.

4.2.3.2.- Influência da safra.

O nível de toxidês das tortas e farelos das "águas" foi um pouco mais elevado que o da "sêca", o que se pode constatar pelo quadro nº 28.

QUADRO Nº 28

Distribuição do número de incidências de aflatoxina G, por categoria e por safra.

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categoria	"Á g u a s"		"S ê c a"	
	n	%	n	%
0,00 - 0,075	3	1,87	0	0,00
0,075 - 0,75	81	50,62	74	71,15
0,75 - 1,87	35	21,88	19	18,27
1,87 - 3,75	22	13,76	11	10,58
3,75 - 7,50	16	10,00	0	0,00
7,50 - 10,00	3	1,87	0	0,00
Total	160	100,00	104	100,00

Nas quatro categorias mais elevadas, que equivalem a mais de 0,25 ppm de B, temos, nas "águas", 47,51% das amostras e na "sêca", 28,85%.

Aplicando o teste X^2 para comparar as percentagens de incidência em cada categoria, nas "águas" e na "sêca", e assumindo que as percentagens seriam as mesmas para ambas as safras, obtivemos um valor igual a 15,62**, com 3 graus de liberdade (foram eliminadas deste cálculo a primeira e a última categorias, por apresentarem frequência quase nula). Este valor nos mostra que houve uma diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

A diferença das médias, calculadas para as duas safras, mostra que realmente a diferença existente, não foi tão grande: 1,17 ppm para as "águas" e 0,72 ppm para a "sêca", dando uma média geral de 0,93 ppm.

Não nos foi possível estabelecer um paralelo com outros trabalhos, visto que, os autores que determinaram também a aflatoxina G, (LIM & YEAP, 1966 e CROWTHER, 1966a), não a estudaram sob este aspecto.

Para uma melhor visualização da distribuição das incidências nas "águas" e na "sêca", apresentamos, na página seguinte, a figura nº 2.

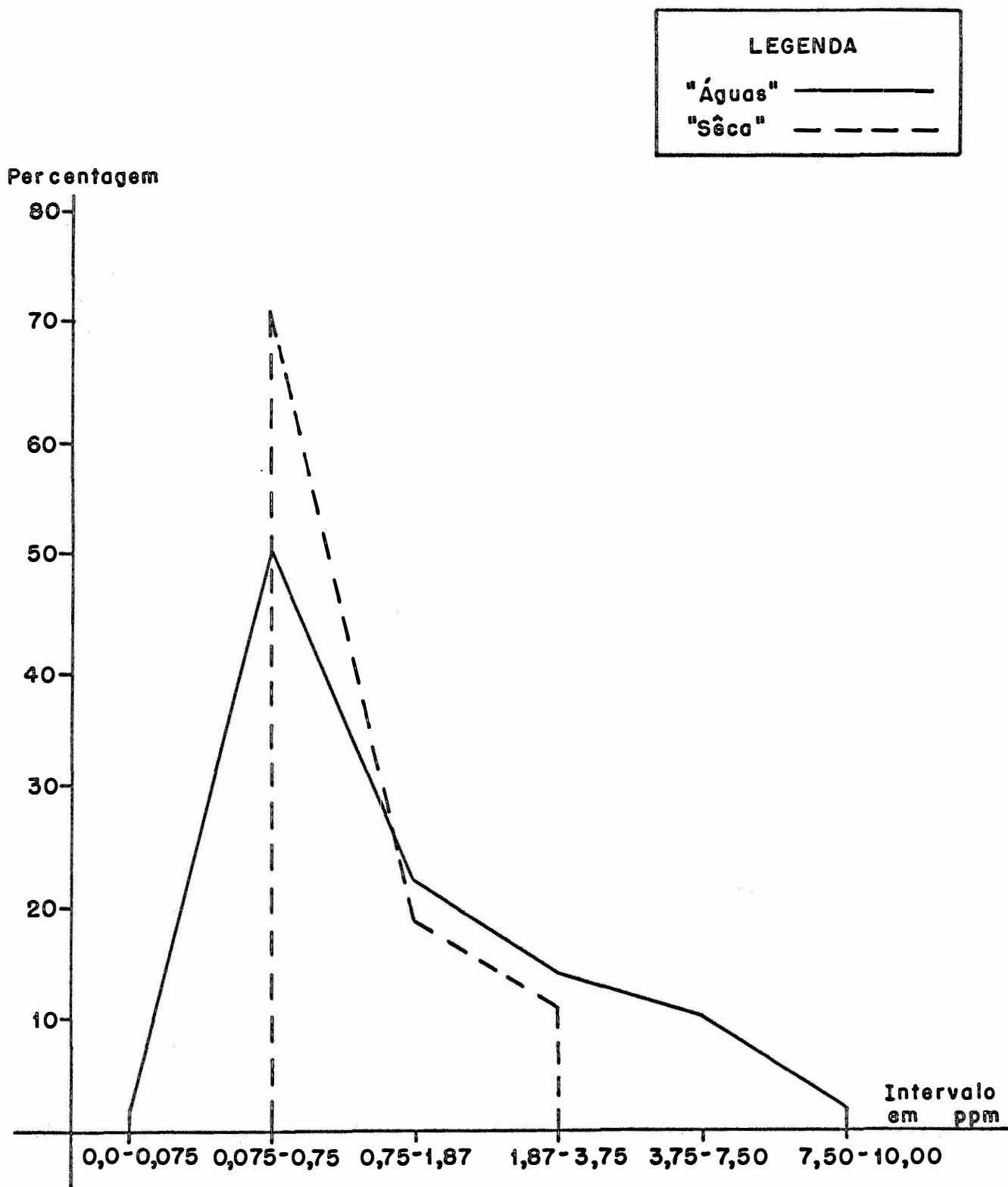
4.2.3.3.- Influência da época, dentro da safra.

Houve uma diferença muito pequena entre as épocas de coleta, dentro de uma mesma safra, conforme pode ser observado nos quadros de números 29 e 30.

Comparando, estatisticamente, as percentagens de incidência por categoria, nas épocas de coleta, e, assumindo como hipótese, serem iguais, obtivemos o seguinte resultado: março vs. maio, $X^2 = 2,35$, com 3 graus de liberdade (foram eliminadas deste cálculo as categorias - mais baixa e mais alta, por apresentarem frequência quase nula) e julho vs. setembro, $X^2 = 3,00$, com 2 graus de liberdade (foram eliminadas a

FIGURA Nº 2

Distribuição da incidência de aflatoxina G.



Polígonos de frequência das incidências da aflatoxina G, por intervalos e percentagens, nas "águas" e na "sêca".

QUADRO Nº 29

Distribuição do número de incidências de aflatoxina G₁ por categoria e por época de coleta, dentro da safra das "águas".

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categoria	M a r ç o		M a i o	
	n	%	n	%
0,00 - 0,075	2	2,50	1	1,25
0,075 - 0,75	41	51,25	40	50,00
0,75 - 1,87	21	26,25	14	17,50
1,87 - 3,75	9	11,25	13	16,25
3,75 - 7,50	7	8,75	9	11,25
7,50 - 10,00	0	0,00	3	3,75
Total	80	100,00	80	100,00

QUADRO Nº 30

Distribuição do número de incidências de aflatoxina G₁ por categoria e por época de coleta, dentro da safra da "sêca".

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categoria	J u l h o		S e t e m b r o	
	n	%	n	%
0,00 - 0,075	0	0,00	0	0,00
0,075 - 0,75	33	63,46	41	78,85
0,75 - 1,87	12	23,08	7	13,46
1,87 - 3,75	7	13,46	4	7,69
3,75 - 7,50	0	0,00	0	0,00
7,50 - 10,00	0	0,00	0	0,00
Total	52	100,00	52	100,00

categoria mais baixa e as duas mais altas por apresentarem frequência quase nula), acusando, ambas, diferenças não significativas.

As médias, calculadas para as quatro épocas de coleta, foram: 1,00 ppm para março e 1,30 ppm para maio, dentro da safra das "águas" e 0,81 ppm para julho, e 0,63 ppm para setembro, dentro da "sêca".

Fizemos também uma comparação das diferenças das médias entre "águas" e "sêca", por fábricas, individualmente, assumindo, por hipótese, não haver diferença entre as duas safras. Para isto, tomamos as diferenças das médias de cada fábrica e aplicamos o teste "t", que foi igual a 2,94^{**}, com 25 graus de liberdade. Isto nos indica que houve uma diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade.

Cumpramos assinalar que nada menos de sete fábricas apresentaram médias de aflatoxina G mais elevadas na "sêca" que nas "águas".

4.2.3.4.- Influência da região.

Os resultados mostram que as regiões variaram também em relação à aflatoxina G, o que pode ser observado no quadro nº 31.

O teste X^2 , aplicado para verificarmos se havia diferença significativa nas percentagens de incidência, por categoria, entre as regiões, nos forneceu um valor igual a 87,54^{***}, com 9 graus de liberdade, (tendo sido eliminada a categoria mais baixa, por apresentar frequência quase nula e agrupadas as duas mais elevadas, por apresentarem baixa frequência). Este alto valor para o X^2 evidenciou que houve uma diferença altamente significativa, ao nível de 0,1% de probabilidade.

As médias calculadas para as regiões são as que constam do quadro nº 32.

QUADRO Nº 31

Distribuição do número de incidências de aflatoxina G, por categoria e por região.

(expresso em números absolutos (n) e percentagens)

Categoria	Sorocabana		Paulista Nova		Noroeste		Araraquarense	
	n	%	n	%	n	%	n	%
0,00 - 0,075	0	0,00	1	0,86	1	2,08	1	1,79
0,075 - 0,75	28	63,63	82	70,70	30	62,50	15	26,78
0,75 - 1,87	15	34,10	16	13,79	14	29,17	9	16,07
1,87 - 3,75	1	2,27	16	13,79	2	4,17	14	25,00
3,75 - 7,50	0	0,00	1	0,86	1	2,08	14	25,00
7,50 - 10,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	5,36
Total	44	100,00	116	100,00	48	100,00	56	100,00

QUADRO Nº 32

Médias da aflatoxina G das regiões, por safra e geral.

(expresso em partes por milhão)

Região	"Águas"	"Sêca"	Geral
Sorocabana	0,66	0,76	0,71
Paulista Nova	0,92	0,53	0,72
Noroeste	0,88	0,50	0,68
Araraquarense	2,69	1,44	2,00

Pelo exame do quadro nº 32 vemos que a Araraquarense foi a região de maior nível de toxidês, destacando-se das demais, que se apresentaram num mesmo padrão.

No comportamento entre safras vemos que a Sorocabana quase não variou, tendo, ao contrário das outras, apresentado toxidês ligeira-

mente maior na "sêca" que nas "águas".

Com o fim de estudar a variação nas percentagens de incidência nas regiões, duas a duas, foi aplicado o teste χ^2 que nos forneceu os resultados constantes do quadro nº 33.

QUADRO Nº 33

Valores de χ^2 na comparação de regiões, duas a duas.

Regiões Comparadas	G.L.	χ^2
Sorocabana vs. Paulista Nova	2	11,42
Sorocabana vs. Noroeste	2	1,01
Sorocabana vs. Araraquarense	3	32,06
Paulista Nova vs. Noroeste	2	6,58
Paulista Nova vs. Araraquarense	3	46,95
Noroeste vs. Araraquarense	3	28,64

O quadro nº 33 está a nos indicar que houve diferença bastante grande entre a Araraquarense e todas as demais regiões. Houve também uma boa diferença entre a Sorocabana e a Paulista Nova. No confronto entre as demais regiões, o comportamento da aflatoxina G não apresentou quase diferença.

Fizemos apenas uma comparação visual, sem consultar as tabelas do χ^2 e sem interpretar os resultados em termos de probabilidade, visto, o número total de graus de liberdade, no desdobramento, exceder o valor real.

Não nos foi possível estabelecer um paralelo entre os resultados por nós encontrados e os de outros autores que também pesquisaram a aflatoxina G (LIM & YEAP, 1966 e CROWTHER, 1966a), pois que, êstes autores não abordaram a questão.

4.2.4.- Correlações entre as aflatoxinas B e G.

Praticamente todas as tortas examinadas tinham as aflatoxinas B e G. A produção da B foi sempre maior que a da G, em todas as amostras.

A região Araraquarense apresentou um nível bem mais elevado de aflatoxina G que as demais. Nestas, ela se manteve num nível igual e mais baixo.

Procuramos investigar se havia correlação entre a produção dos dois metabólitos, visto que, em trabalhos de campo, não há referências na literatura, tendo sido estudada apenas em condições de laboratório.

O resultado obtido no estudo desta possível correlação, foi $r = + 0,507^{**}$, o que indica que houve uma correlação positiva e relativamente estreita, ao nível de 1% de probabilidade, pela tabela de r , com 25 graus de liberdade.

A variação das médias das aflatoxinas B e G nas quatro épocas de coleta (figura nº 3), mostra, gráficamente, que há realmente essa correlação.

É difícil apontarmos, exatamente, a causa do elevado teor de aflatoxina G na Araraquarense, em relação às outras regiões. Verificando as médias das regiões para as aflatoxinas B e G (quadros números 23 e 32, respectivamente), vemos que as médias gerais das regiões Araraquarense e Paulista Nova, para a aflatoxina B, são praticamente iguais, ou sejam, 3,35 ppm e 3,24 ppm, respectivamente, ao passo que, em relação à G, a Araraquarense, com 2,00 ppm, apresenta quase o triplo do valor da Paulista Nova, que foi de 0,72 ppm.

Sabe-se, de ensaios de laboratório (DAVIS e cols., 1966), que a presença de zinco no substrato, geralmente leva o A.flavus a produzir mais aflatoxina G do que B. Nós não encontramos mais aflatoxina G do que B em nosso trabalho, mas aquela pode ser uma das causas da alta pro-

dução da G: um teor mais elevado de zinco no solo, maior absorção do mesmo pela planta e, subsequentemente, uma maior concentração na semente, poderia levar uma mesma linhagem do A.flavus a elaborar maior quantidade de aflatoxina G.

Outra possível causa, a mais viável no nosso ponto de vista, seria a ocorrência de linhagens específicas de A.flavus, produtoras de aflatoxina G em maior escala.

LIM & YEAP (1966), observaram em suas análises que, das 19 tortas encontradas tóxicas, 8 tinham ambos metabólitos e 11 revalaram somente a G. Concluem, como provável causa deste fato, a presença de linhagens específicas de A.flavus.

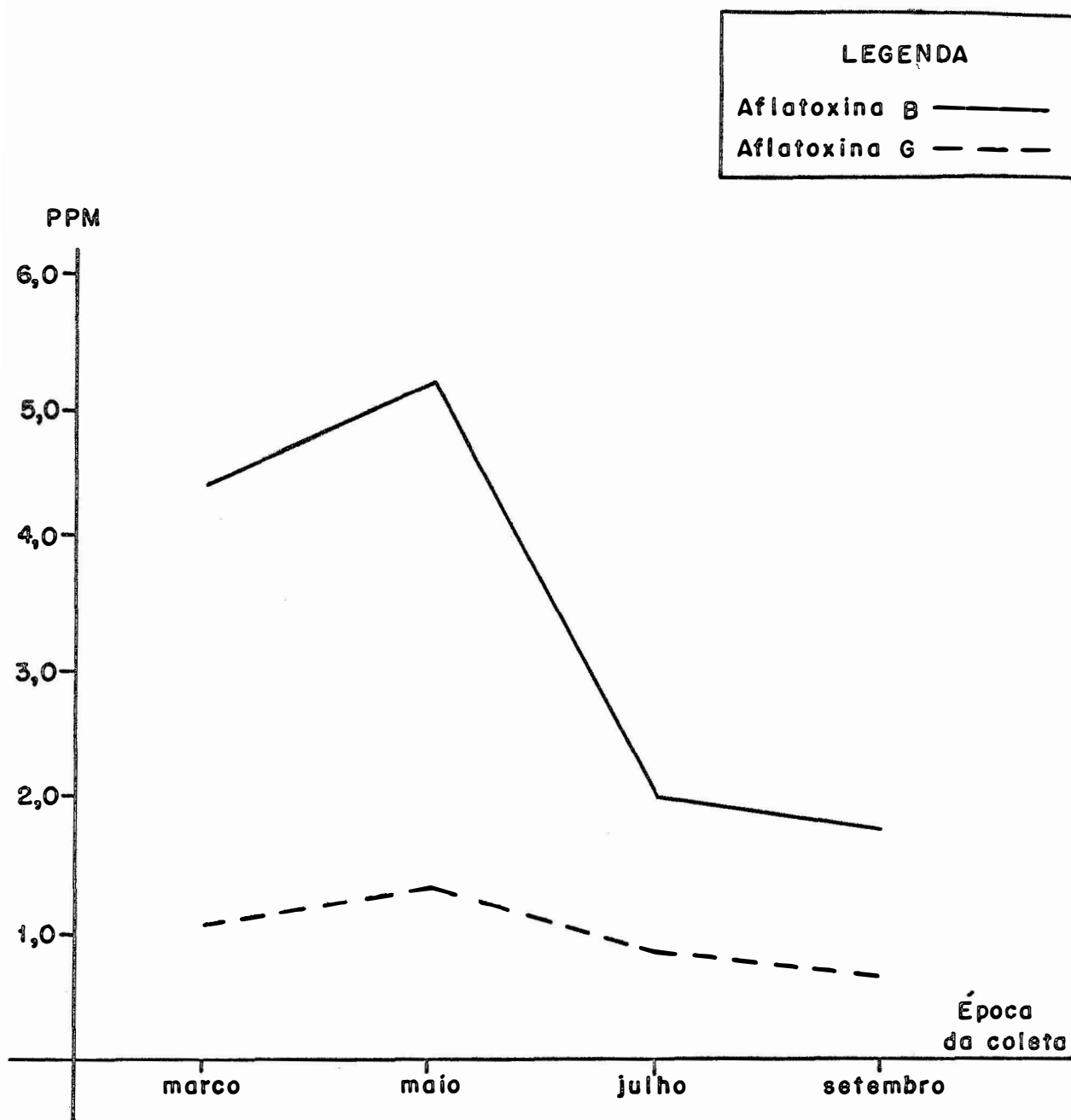
Em CROWTHER (1966a), notamos que, das 64 amostras achadas tóxicas, todas tinham a aflatoxina B e apenas 46 tinham a G. Nestas últimas, apenas uma tinha a G em nível mais elevado que a B.

Estes autores não estudaram a possível correlação entre os dois metabólitos.

0 0 0 0

FIGURA Nº 3

Variacão das médias das aflatoxinas B e G.



Valores médios das aflatoxinas B e G, por coleta:

\bar{B} (março) = 4,38 ppm

\bar{G} (março) = 1,00 ppm

\bar{B} (maio) = 5,21 ppm

\bar{G} (maio) = 1,30 ppm

\bar{B} (julho) = 2,01 ppm

\bar{G} (julho) = 0,81 ppm

\bar{B} (setembro) = 1,76 ppm

\bar{G} (setembro) = 0,63 ppm

5.- RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho, o Autor estudou a incidência de aflatoxina em tortas e farelos de amendoim (Arachis hypogaea, L.), no Estado de São Paulo.

Dentro deste trabalho, o Autor determinou os teores das aflatoxinas B e G em 264 amostras de tortas e farelos de amendoim, bem como estudou uma possível correlação na produção de ambas, pelo fungo Aspergillus flavus, LINK EX FRIES.

As amostras foram colhidas em quatro épocas, representando material proveniente da industrialização de duas safras distintas, a saber: março e maio - "águas" - e julho e setembro - "sêca".

O levantamento abrangeu quarenta indústrias de extração de óleo, situadas nas principais regiões produtoras de amendoim: Sorocabana, Paulista Nova, Noroeste e Araraquarense.

Foi discutida, à luz dos resultados obtidos, a influência na produção das aflatoxinas B e G, dos seguintes fatores: a) safra, b) época de coleta dentro de uma mesma safra, c) região.

Dos resultados obtidos no presente trabalho, o Autor extraiu as seguintes conclusões:

1) A incidência da aflatoxina é geral no Estado de São Paulo, pois, tôdas as amostras examinadas eram tóxicas.

2) O nível de incidência foi, no geral, muitíssimo elevado, chegando a 20,0 ppm em duas amostras.

3) Foram encontradas 89,78% das amostras com mais de 1,0 ppm, ou seja, na categoria de toxidês "Muito alta".

4) As tortas provenientes da safra das "águas" foram muito mais tóxicas que as da "sêca". As médias, para o Estado, foram: "águas" = 4,78 ppm e "sêca" = 1,88 ppm de aflatoxina B.

5) Mesmo o material da "sêca" ainda apresentou toxidês na faixa "Muito alta".

6) A influência da época de coleta, dentro de uma mesma sa
fra, foi pequena.

7) Houve variação entre as fábricas no confronto "águas"
vs. "sêca".

8) Houve diferença significativa entre as regiões pesquisa
das, sendo, a Araraquarense e a Paulista Nova, as que apresentaram tor-
tas com maior toxidês.

9) Tôdas as tortas continham a aflatoxina B; apenas três
não tinham aflatoxina G.

10) A região Araraquarense destacou-se por apresentar eleva
do teôr de aflatoxina G, com tortas contendo até 10,0 ppm. Nas outras re
giões o teôr da G foi relativamente pequeno e esteve num mesmo plano.

11) O elevado teôr da aflatoxina G, na Araraquarense, pode
indicar a possibilidade de existência de linhagem diferente do Aspergil-
lus flavus, ou, talvez, um teôr mais elevado de zinco nos solos daquela
região, com uma maior concentração do mesmo na semente, o que poderia le
var o fungo a produzir maior quantidade daquele metabólito.

12) Houve uma correlação,relativamente estreita, na produ-
ção das aflatoxinas B e G.

0 0 0 0

6.- SUMMARY AND CONCLUSIONS

In the present work, the Author studied the incidence of aflatoxin in peanut (Arachis hypogaea, L.) meals, in the State of São Paulo.

In this work, the Author has determined the aflatoxins B and G in 264 samples and studied the possible correlation in the production of both metabolites by the fungus Aspergillus flavus, LINK EX FRIES, as well.

The samples were obtained in four collections representing materials from two crops, in two different seasons: March and May, in the rainy season, and July and September, in the dry season.

The survey was made in forty oil mills located in the major producing regions, namely: Sorocabana, Paulista Nova, Noroeste and Araraquarense.

The following influences, in the production of the aflatoxins B and G, are discussed: a) the crop or season, b) the collection, within the season, c) the region.

From the results, the following conclusions can be drawn:

1) The incidence of aflatoxin is widespread in the State of São Paulo, for all the samples were toxic.

2) The toxicity, in general, was very high, reaching to 20,0 ppm in two samples.

3) It was found that 89.78% of the samples had more than 1,0 ppm, i.e., in the category of toxicity "Very high".

4) The samples from the rainy season were much more toxic than those from the dry season. The mean values for the aflatoxin B, in the State of São Paulo, were: 4.78 ppm for the rainy season and 1.88 ppm for the dry season.

5) The samples from the dry season were still highly toxic.

6) There was very little difference between collections, within the crops.

7) There was variation among the mills, when comparing the rainy season against the dry season.

8) There was significant difference among regions studied; Araraquarense and Paulista Nova presented the highest toxicity in samples.

9) All the samples showed aflatoxin B; only three were negative for aflatoxin G.

10) The Araraquarense region presented the highest yield of aflatoxin G, with samples reaching 10.0 ppm. The amount of this metabolite was relatively small and stayed at the same level for all the other regions.

11) The high yield of aflatoxin G in the Araraquarense region, may suggest the possibility of the presence of a different strain of Aspergillus flavus, or, maybe, a higher content of zinc in the soils that region, with a higher concentration of that element in the seed, which, could lead the fungus to produce a higher amount of that metabolite.

12) There was a relatively sharp correlation in the production of the aflatoxins B and G.

0 0 0 0

7.- BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALBRIGHT, J.L., AUST, S.D., BYERS, J.H., FRITZ, T.E., BRODIE, B.O., OLSEN, R.E., LINK, R.P., SIMON, J., RHOADES, H.E. & BREWER, R.L., 1964 - Moldy corn toxicosis in cattle. J. Amer. Vet. Med. Ass., 144: 1013-1019.
- ALLCROFT, R., CARNAGHAN, R.B.A., SARGEANT, K. & O'KELLY, J., 1961 - A toxic factor in Brazilian groundnut meal. Vet. Rec., 73: 428-429.
- ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R.B.A., 1962 - Groundnut toxicity. Aspergillus flavus toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communications. Vet. Rec., 74: 863-864.
- ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R.B.A., 1963a - Toxic products in groundnuts. Biological effects. Chem. Ind., (2): 50-53.
- ALLCROFT, R. & LEWIS, G., 1963b - Groundnut (meal) toxicity in cattle: experimental poisoning of calves and a report on clinical effects in older cattle. Vet. Rec., 75: 487-494.
- ALLCROFT, R. & LEWIS, G., 1963c - Aflatoxicosis in animals caused by a mycotoxin present in some batches of peanuts Arachis hypogaea. Biochem. J., 88(3): 58.
- AMARAL, L.B.S., 1961 - Torta de amendoim e morte de suínos. O Biológico, 27(3): 63.
- ANDRADE, B.M., PENTEADO, L.A. & RAIMO, H.F., 1962 - Ação tóxica dos farelos e torta de café e amendoim nas aves em crescimento. Bol. Ind. Ani., 20 (Vol. único): 379-383.
- ANÔNIMO, 1963 - Tropical metabolites of A. flavus. Tropical Products Institute Report, pp 14-17.
- ARCHIBALD, R.M., SMITH, H.J. & SMITH, J.D., 1962 - Brazilian groundnut toxicosis in Canadian broiler chickens. Can. Vet. J., 3(10): 322-325.

- ASAO, T., BUECHI, G., ABDEL-KADER, M.M., CHANG, S.B., WICK, E.L. & WOGAN, G.N., 1963 - Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* 85 (11): 1706-1707.
- ASHLEY, L.M., HALVER, J.E. & JOHNSON, C.L., 1962 - Histopathology of induced trout hepatoma. *Fed. Proc.*, 21: 304.
- ASHLEY, L.M., HALVER, J.E. & WOGAN, G.N., 1964 - Hepatoma and aflatoxicosis in trout. *Fed. Proc.*, 23: 105.
- ASPLIN, F.D. & CARNAGHAN, R.B.A., 1961 - The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Vet. Rec.*, 73: 1215-1219.
- AUST, S.D., ALBRIGHT, J.L., OLSEN, R.E., BYERS, J.H. & BROQUIST, H.P. - 1963 - Observations on moldy corn toxicosis (Abs.). *J. Anim. Sci.*, 22: 831-832.
- BENNETT, C.A. & FRANKLIN, N.L., 1963 - Statistical Analysis in Chemistry and the Chemical Industry. John Wiley & Sons, Inc., New York, London. 3ª Impressão, 724 pp., Cap. 7.
- BLOUNT, W.P., 1960 - Disease of turkey poults. *Vet. Rec.*, 72(38): 786.
- BLOUNT, W.P., 1961a - Turkey "X" disease. *Turkeys*, 9(2): 52, 55-58, 61, 77.
- BLOUNT, W.P., 1961b - Turkey "X" disease mystery. *Agric. Merchant.*, 41 (2): 85-88.
- BUTLER, W.H. & BARNES, J.M., 1963 - Toxic effects of peanut meal containing aflatoxin to rats and guinea pigs. *Brit. J. Cancer*, 17(4): 699-710.
- CARNAGHAN, R.B.A. & SARGEANT, K., 1961 - The toxicity of certain groundnut meals to poultry. *Vet. Rec.*, 73: 726-727.
- CARNAGHAN, R.B.A., HARTLEY, R.D. & O'KELLY, J., 1963 - Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200(4911): 1101.

- CENTRAL VETERINARY LABORATORY, sem data - Biological test for the assessment of the concentration of aflatoxin in groundnuts and groundnut products. Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Inglaterra, D/3 - 3 pp. mimeografadas.
- CHANG, S.B., ABDEL-KADER, M.M., WICK, E.L. & WOGAN, G.N., 1963 - Aflatoxin B₂. Chemical identity and biological activity. *Science*, 142: 1191-1192.
- CHEUNG, K.K. & SIM, G.A., 1964 - Aflatoxin G₁: direct determination of the structure by the method of isomorphous replacement. *Nature*, 201: 1185-1188.
- CLEGG, F.G. & BRYSON, H., 1962 - An outbreak of poisoning in store cattle attributed to Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.*, 74: 992-994.
- CODNER, R.C., SARGEANT, K. & YEO, R., 1963 - Production of aflatoxin by the culture of strains of Aspergillus flavus-oryzae on sterilized peanuts. *Biotechnol. Bioeng.*, 5(3): 185-192.
- COOMES, T.J. & FEUELL, A.J., 1965 - Recommended procedures for the detection of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnut materials. Tropical Products Institute, Report N^o G 13, Ministry of Overseas Development, London.
- CROWTHER, P.C., 1966a - Report of the Produce Chemist, 4th November 1965 - 4th May 1966. The Laboratory, Department of Agriculture, Yundum Experimental Station, The GAMBIA. Não publicado, 15 pp. xerografadas.
- CROWTHER, P.C., 1966b - Comunicação pessoal. Tropical Products Institute, London.
- CROWTHER, P.C., 1966c - Comunicação pessoal. Tropical Products Institute, London.
- DAVIS, N.D., DIENER, U.L. & ELDRIDGE, D.W., 1966 - Production of aflatoxin B₁ and G₁ by Aspergillus flavus in a semi-synthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 14(3): 378-380.

- De IONGH, H., BEERTHUIS, R.K., VLES, R.O., BARRET, C.B. & ORD, W.O., 1962
- Investigation of the factor in groundnut meals responsible for "turkey X disease. *Bioch. Biophys. Acta*, 65:548-551.
- De IONGH, H., VLES, R.O. & Van PELT, J.G., 1964 - Milk of mammals fed on aflatoxin-containing diet. *Nature*, 202(4931): 466-467.
- DUTTON, M.F. & HEATHCOTE, J.G., 1966 - Two new aflatoxins. *Biochem. J.*, 101(2): 21P-22P.
- FEUELL, A.J., 1966 - Comunicação pessoal. Tropical Products Institute, London.
- FONSECA, H. & LEME Jr., J., 1967 - Ocorrência de aflatoxina em amendoim (*Arachis hypogaea*, L.) do comércio. Enviado para publicação.
- GARDNER, E.E., 1962 - A comparison of the toxicity to poults and chicks of a certain peanut oil meal. *Poult. Sci.*, 41:1348-1350.
- GIBSON, W.W.C., 1962 - Groundnut toxicity. *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. *Vet. Rec.*, 74(32): 884.
- GOPALAN, C., 1965 - Investigations on aflatoxin toxicity. *Nutr. Docum. Aflatoxin/9*. WHO/FAO/UNICEF, July 1965 Meeting, Rome.
- GRAY, W.V., 1961 - Groundnut toxicity. *Vet. Rec.*, 73: 865.
- GUILLOIN, J.C. & RENAULT, L., 1961 - Apparition d'hepatomes chez les canes. *Bull. Acad. Vet. Fr.*, 34(2): 93-97.
- HARDING, J.D.J., DONE, J.T., LEWIS, G. & ALLCROFT, R., 1963 - Experimental groundnut poisoning in pigs. *Res. Vet. Sci.*, 4(2):217-219.
- HARTLEY, R.D., NESBITT, B.F. & O'KELLY, J., 1963 - Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 198(4885): 1056-1058.
- HESELDTINE, C.W., SHOTWELL, O.L., ELLIS, J.J. & STUBBLEFIELD, R.D., 1966 - Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bacter. Rev.*, 30(4): 795-805.

- HISCOCKS, E.S., 1965 - The importance of molds in the deterioration of tropical foods and feedstuffs. In Wogan, G.N., ed: Mycotoxins in Foodstuffs. The M.I.T. Press, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass., 1965, 291 pp.
- HODGES, F.A., ZUST, J.R., SMITH, H.R., NELSON, A.A., ARMBRECHT, B.H. & CAMPBELL, A.D., 1964 - Mycotoxins: Aflatoxin isolated from Penicillium puberulum. Science, 145: 1439.
- HOLDING, A.S., 1964 - Death due to aflatoxicosis in the dog: an initial-report. Pennant, (Johannesburg), (44): 5 e 7.
- HUEPER, W.C. & PAYNE, W.W., 1961 - Observation on the occurrence of hepatomas in rainbow trout. J. Natn. Cancer Inst., 27: 1123 - 1143.
- I.B.G.E., 1963 - Anuário Estatístico do Brasil. Conselho Nacional de Estatística, Vol. 24, Rio de Janeiro, 446 pp.
- I.B.G.E., 1966 - Anuário Estatístico do Brasil. Conselho Nacional de Estatística, Vol. 27, Rio de Janeiro, 545 pp.
- KING, J.M., 1963 - The correlation of liver function test with the hepatic lesion in dogs fed peanut meal. Thesis, Cornell. 115 pp., resumo in Vet. Bull., 34(10): 3646.
- LANCASTER, M.C., JENKINS, F.P. & PHILP, J.McL., 1961 - Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, 192: 1095-1096.
- LE BRETON, E., FRAYSSINET, C. & BOY, J., 1962 - Sur l'apparition d'hépatomes "spontanes" chez le rat wistar. Rôle de la toxine de l'Aspergillus flavus. Intéret en pathologie humaine et cancerologie expérimentale. C. r. Acad. Sci., Paris, 255: 784-786.
- LEE, W.V., 1965 - Quantitative determination of aflatoxin in groundnut products. Analyst, (Lond.), 90(1070): 305-307.
- LIM, S.C., 1964 - Suspected groundnut poisoning in pigs. J. Malay. Vet. Med. Ass., 3: 151.

- LIM, H.K. & YEAP, G.S., 1966 - The occurrence of aflatoxin in Malayan imported oil cakes and groundnut kernels. *The Malaysian Agric. J.*, 45(3): 232-244.
- LOIZELIER, A.B., 1963 - Groundnut poisoning of fowls in Spain. *Revta. Patron. Biol. Anim.*, 7(3): 25-33.
- LOOSMORE, R.M. & HARDING, J.D.J., 1961 - A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. *Vet. Rec.*, 73: - 1362-1364.
- LOOSMORE, R.M. & MARKSON, L.M., 1961 - Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.*, 73: 813-814.
- LOOSMORE, R.M., ALLCROFT, R., TUTTON, E.A. & CARNAGHAN, R.B.A., 1964-The presence of aflatoxin in a sample of cottonseed cake. *Vet. Rec.*, 76(2): 64-65.
- MADHAVAN, T.V., TULPULÉ, P.G. & GOPALAN, C., 1965 - Aflatoxin-induced hepatic fibrosis in rhesus monkeys. Pathological features. *Archs. Path.*, 79: 466-469.
- MANN, T.B., 1960 - "Disease" of turkey poults. *Vet. Rec.*, 72(35): 715.
- MCDONALD, D. & A'BROOK, J., 1963 - Growth of Aspergillus flavus and production of aflatoxin in groundnuts. Part III. *Trop.Sci.* 5(4): 208-214.
- MCDONALD, D. & HARKNESS, C., 1963 - Growth of Aspergillus flavus and production of aflatoxin in groundnuts. Part II. *Trop. Sci.*, - 5(3): 143-154.
- MENEZES, T.J.B., TANGO, J.S., COELHO, F.A.S. & TEIXEIRA, C.G., 1966 - Ocorrência do Aspergillus flavus e da aflatoxina em sementes e farelo de amendoim. Apresentado à XVIII Reunião Anual da S.B.P.C., Blumenau, S.C., 1966.
- MILNER, M., 1965 - Report of the Institute of Food Technologists Symposium on Food Toxins of Fungal Origin. *Nutr. Docum. Aflatoxin/10*. WHO/FAO/UNICEF, July 1965 Meeting, Rome.

- MINNE, J.A., ADELAAR, T.F., TERBLANCHE, M. & SMITH, J.D., 1964 - Groundnut poisoning due to aflatoxin in stock in South Africa. J. S. Afr. Vet. Med. Ass., 35: 7-8.
- MORCOS, S.R. & LEBSHTEIN, A.K., 1963 - Proteins and Toxicity. The effect of different dietary levels of protein on the changes produced by the "groundnut toxin" in chicks. J. Arab. Vet. Med. Ass., 23: 375-380.
- NARTEY, F., 1966 - Aflatoxins of Aspergillus flavus grown on cassava. - Physiol. Plantarum, 19(31): 818-822.
- NESBITT, B.F., O'KELLY, J., SARGEANT, K. & SHERIDAN, A., 1962 - Toxic metabolites of Aspergillus flavus. Nature, 195: 1062-1063.
- NEWBERNE, P.M., CARLTON, W.W. & WOGAN, G.N., 1964 - Hepatomas in rats and hepatorenal injury in ducklings fed peanut meal and Aspergillus flavus extracts. Pathol. Vet., 1: 105-132.
- PARPIA, H.A.B., 1966 - Aflatoxin situation in India. In News Bull., No 6: 47-55, April 1966. WHO/FAO/UNICEF - Protein Advisory Group. United Nations Headquarters, New York, N.Y.
- PATERSON, J.S., CROOK, J.C., SHAND, A., LEWIS, G. & ALLCROFT, R., 1962 - Groundnut toxicity as the cause of exudative hepatitis - (oedema disease) of guinea pigs. Vet. Rec., 74: 639-640.
- PEERS, F.G., 1965 - Summary of the work done at Vom (Northern Nigeria), on Aflatoxin levels in groundnut flour and Arlac. Nutr. Docum. Aflatoxin/8. WHO/FAO/UNICEF - Protein Advisory Group 1965 Meeting, Rome.
- PLATONOW, N., 1964 - Effect of prolonged feeding of toxic groundnut meal in mice. Vet. Rec., 76(21): 589-590.
- RAIMO, H.F., CORRÊA, R. & ANDRADE, B.M., 1962 - Ação tóxica de torta de amendoim produzido em S.Paulo, para aves e outros animais. Bol. Ind. Ani., 20: 361-364.

- RHODESIA AND NYASALAND (FEDERATION). MINISTRY OF AGRICULTURE, 1961 - Mortality in ducklings fed groundnut meal from Katanga. Annual Report of the Secretary, Zomba, Nyasaland, pp.212-213.
- RICHIR, C., MARTINAUD, M., TOURY, J. & DUPIN, H., 1964 - Cancerigenic effects of a regimen containing peanuts contaminated with Aspergillus flavus. Comp. Rend. Soc. Biol., 158(6): 1375-1379.
- RICHMOND, J.W., SUTCLIFFE, N.H., DANIELS, N.W.R., RUSSEL-EGGITT, P.W. & COPPOCK, J.B.M., 1962a - Factors other than groundnut relating to "turkey X disease". Vet. Rec., 74(18): 544-545.
- RICHMOND, J.W., SUTCLIFFE, N.H., DANIELS, N.W.R., RUSSEL-EGGITT, P.W. & COPPOCK, J.B.M., 1962b - Factors other than groundnut in the production of aflatoxin. Vet. Rec., 74(35): 962.
- SALMON, W.D. & NEWBERNE, P.M., 1963 - Occurrence of hepatomas in rats fed diets containing peanut meal as major source of protein. Cancer Res., 23: 571-575.
- SARGEANT, K., ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R.B.A., 1961a - Groundnut toxicity. Vet. Rec., 73(35): 865.
- SARGEANT, K., SHERIDAN, A., O'KELLY, J. & CARNAGHAN, R.B.A., 1961b - Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, 192: 1096-1097.
- SARGEANT, K., CARNAGHAN, R.B.A. & ALLCROFT, R., 1963 - Toxic products in groundnuts: chemistry and origin. Chem. Ind., 2: 53-55.
- SASTRY, G.A. e colaboradores, 1965 - A report on the groundnut toxicity in Murrah buffaloes in Andhra Pradesh (India). Indian Vet. J., 42: 79-82.
- SCHOENTAL, R. & WHITE, A.F., 1965 - Aflatoxins and "albinism" in plants. Nature, 205(4966): 57-58.
- SCHOENTAL, R., 1967 - Aflatoxins. Annual Review of Pharmacology, 7: 343-356.

- SELLSCHOP, J.P.F., KRIEK, N.P.J. & du PREEZ, J.C.G., 1965 - Distribution and degree of occurrence of aflatoxin in groundnuts and groundnut products. Symp. Mycotoxins Foodstuffs, Agr. Aspects, Febr. 1965, Pretoria, South Africa: 9-17.
- SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., STUBBLEFIELD, R.D. & SORENSEN, W.G. 1966 - Production of aflatoxin in rice. Appl. Microbiol., 14(3): 425-428.
- SMITH, K.M., 1960 - "Disease" of turkey poults. Vet. Rec., 72(32): 652.
- SNEDECOR, G.W., 1956 - Statistical Methods. The Iowa State College Press Ames, Iowa, EE.UU., 5ª ed., 534 pp.
- STANKUSHEV, Kh.I., 1963 - Mycological examination of maize in storage for animal feeding. II. Toxicity tests on Aspergillus species in young store pigs and pregnant sows. Izv. Vet. Inst. neza razni Bolesti i Zoonigiena (Sofia), 3: 123-134, e 135-139, Em búlgaro, sumário em inglês.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H., 1960 - Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 481 pp.
- STEVENS, A.J., SAUNDERS, C.N., SPENCE, J.B. & NEWHAM, A.G., 1960 - Investigations into "diseases" of turkey poults. Vet. Rec., 72 (31): 627-628.
- SWARBRICK, O., 1960 - "Disease" of turkey poults. Vet. Rec., 72(33): 671.
- TANGO, J.S., MENEZES, T.J.B. & TEIXEIRA, C.G., 1967 - Levantamento da ocorrência da aflatoxina em sementes de amendoim nas safras das águas e da seca de 1965. Apresentado à XIX Reunião Anual da S.B.P.C., Rio de Janeiro, 1967.
- TOURY, J., 1966 - Rapport sur l'Opération Exagraf. In Rapport sur les recherches effectuées sur l'aflatoxine au cours de l'année 1965-1966. (Confidentiel). Organisme de Recherches sur l'Alimentation et la Nutrition Africaines, O.R.A.N.A., Dakar, Senegal, 12 pp. mimeografadas.

- TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE, 1962a - A method for the detection of aflatoxin in groundnuts and groundnut products. T.P.I., Ministry of Overseas Development, London, T.P.I. Rept. No 30/62.
- TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE, 1962b - Aflatoxin in groundnut and groundnut products. Interpretation of physico-chemical and biological test results. T.P.I., Ministry of Overseas Development, London, 1 pag. mimeografada.
- TULPULE, P.G., MADHAVAN, T.V. & GOPALAN, C., 1964 - Effect of feeding aflatoxin to young monkeys. Lancet, 1: 962-963.
- Van DORP, D.A., Van der ZIJDEN, A.S.M., BEERTHUIS, R.K., SPARREBOOM, S., ORD, W.O., DeJONG, K. & KEUNING, R., 1963 - Dihydro-Aflatoxin B, a metabolite of Aspergillus flavus. Remarks on the structure of Aflatoxin B. Rech. Trav. Chim. Pays-Bas, Belg. 82: 578-592.
- Van der MERWE, K.J., FOURIE, L. & SCOTT, B., 1963 - The structure of aflatoxins. Chem. Ind., 41: 1660-1661.
- Van der ZIJDEN, A.S.M., KOELENSMID, W.A., BOLDING, J., BARRET, C.B., ORD, W.O. & PHILP, J., 1962 - Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey "X" disease. Nature, 195: 1060-1062.
- WANNOP, C.C., 1960 - Disease of turkey poults. Vet. Rec., 72(33): 671 - 672.
- WILEY, J.R., 1960 - "Disease" of turkey poults. Vet. Rec., 72(38): 786-787.
- WILSON, B.J. & WILSON, C.H., 1962 - Studies on toxic substances produced on feedstuffs by fungi isolates from moldy feed. Bact. - Proc., 62: 28.

WOGAN, G.N., & DUNN, C.G., 1962 - Toxicity and carcinogenicity associated with fungal growth on feedstuffs. Dept. of Nutrition and Food Science (M.I.T.), presented on May 14, 1962, at departmental meeting, 12 pp. mimeografadas.

WOGAN, G.N., 1966 - Comunicação pessoal. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass., EE.UU.

ZHURAVLEV, V.V., 1962 - Aspergillotoxicosis of swine. Veterinaria (Rússia), 39(9): 33-34. Em russo, sumário em inglês.

ZUCKERMAN, A.J. & FULTON, F., 1966 - Acute toxic effects of aflatoxin on human embryo liver cells in culture. Brit. Med. J., 2: 90-91.

ZWART, D. & HARDING, H.P., 1964 - Dietetic liver cirrhosis of pigs in Ghana. Res. Vet. Sci., 5: 257-267.

oooooooo