OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM FARELO DE ALGODÃO
(*Gossypium hirsutum* L.) DA SAFRA DE 1986

CECILIA MARIA RESENDE GONÇALVES
Nutricionista

Orientador: Prof. Dr. HOMERO FONSECA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1987

G635o

GONÇALVES, Cecilia Maria Resende

Ocorrência de aflatoxinas em farelo de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) da safra de 1986. Piracicaba, 1987.

63 p.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Aflatoxina em farelo de algodão. 2. Algodão - Produto derivado. 3. Farelo de algodão - Aflatoxina. I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. II. Título.

CDD 664.726

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM FARELO DE ALGODÃO
(*Gossypium hirsutum* L.) DA SAFRA DE 1986

Cecília Maria Resende Gonçalves

Aprovada em 08.07.1987

Comissão julgadora

Prof. Dr. Homero Fonseca

ESALQ/USP

Prof. Dr. João Nunes Nogueira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso

ESALQ/USP

Prof. Dr. Homero Fonseca

Aos meus pais,
Luizinha e Carlos;

aos meus irmãos,
Áurea, Tânia, Luiza e Carlos;

aos meus sobrinhos,
Lucas e Daniela,

— DEDICO —

Ao Prof. Dr. HOMERO FONSECA pela orientação segura, confiança e amizade que sempre me dedicou demonstrando carinho e paciência, sendo um grande exemplo de mestre.

À amiga ALAÍDE HERMÍNIA DE-AGUIAR OLIVEIRA e
ao amigo VALDENIR QUEIROZ RIBEIRO, pela relevante contribui-
ção científica indispensáveis à conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- À Fundação Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado em Tecnologia de Alimentos.
- A todos os professores do Departamento de Tecnologia Rural, pela amizade, colaboração e ensinamentos efetivamente prestados.
- Ao Programa de Incentivo à Capacitação de Docentes - MEC, pela bolsa de estudo concedida no decorrer do curso de Mestrado.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro necessário à realização desta pesquisa.
- Às indústrias de óleo pelo fornecimento do material, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.
- À Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual (UEPAE de Teresina), pertencente à EMBRAPA, pelo apoio e colaboração na análise estatística.
- À equipe da biblioteca do Departamento de Tecnologia Rural pela prestimosidade no atendimento durante as fases de estudo e elaboração do trabalho.
- A todos os colegas do curso de Pós-Graduação pela convivência e amizade.
- Aos Pesquisadores Humberto de Campos, Antonio Francisco Iemma e Valdenir Queiroz Ribeiro, pela orientação, sugges-

tão e revisão das análises estatísticas.

- À técnica de laboratório Ivani Valarini e ao Sr. João Baptista Beraldo pela colaboração nos trabalhos de laboratório, bem como a todos os funcionários do Departamento de Tecnologia Rural pela boa vontade demonstrada.
- A Maria Antonia Calori pelas sugestões e pelo apoio amigo.
- Às amigas Suzana Oellers Ferreira e Marília Gonçalves Borges Silveira pelas sugestões e revisão do manuscrito.
- À bibliotecária Sônia Corrêa da Rocha pela atenção dedicada à revisão bibliográfica.
- Ao Mestre amigo Paulo Roberto Cantarelli pela ajuda na elaboração do Summary.
- Aos colegas do Departamento de Nutrição da Fundação Universidade Federal do Piauí pela colaboração e confiança demonstrada concedendo-me afastamento para a conclusão do Mestrado.
- A Marcos David Figueiredo de Carvalho que a todo momento acompanhou minhas atividades, pelo apoio constante, carinho e compreensão.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Material	23
3.2. Métodos	24
3.2.1. Coleta das amostras	24
3.2.2. Preparo das amostras	24
3.2.3. Determinação das aflatoxinas	24
3.2.3.1. Extração e purificação do extrato	25
3.2.3.2. Cromatografia em camada delgada	26
3.2.4. Análise estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE TABELAS

Página

1	Conteúdo de aflatoxinas em alimentos animais e percentagens máximas permissíveis de mistura destes componentes em rações, conforme a espécie e a idade do animal	20
2	Ocorrência de aflatoxina B ₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "A", Araraquara (SP), Paraguaçu Paulista (SP) e Londrina (PR), no ano de 1986 (média semanal)	31
3	Ocorrência de aflatoxina B ₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "B", Maringá (PR), no ano de 1986 (média semanal)	33
4	Ocorrência de aflatoxina B ₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "C", Bauru (SP) e Maringá (PR), no ano de 1986 (média semanal)	34
5	Ocorrência de aflatoxina B ₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "D", Campinas (SP), no ano de 1986 (média semanal)	36

6	Ocorrência de aflatoxina B_1 (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "E", Guararapes (SP), no ano de 1986 (média semanal)	37
7	Variação na incidência de aflatoxina B_1 (ppb) em farelo de algodão, proveniente de diversas regiões, em função do tempo, no ano de 1986 ...	38
8	Ocorrência de aflatoxina B_1 (ppb) em farelo de algodão, proveniente de 5 empresas com 8 indústrias localizadas em 7 regiões e os dados (ordens) apropriados à aplicação do teste de Kruskal-Wallis, no ano de 1986	39
9	Diferenças $ \bar{R}_i - \bar{R}_j $ em valores absolutos entre pares de médias das somas das ordens atribuídas às indústrias na classificação conjunta das 169 amostras de ocorrência de aflatoxina B_1 (ppb) em farelo de algodão, no ano de 1986	41

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM FARELO DE ALGODÃO
(*Gossypium hirsutum* L.) DA SAFRA DE 1986

Autora: Cecilia Maria Resende Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Homero Fonseca

RESUMO

Neste trabalho foram determinados a ocorrência e o nível de contaminação, com aflatoxinas, de 169 amostras de farelo de algodão. As amostras foram fornecidas por indústrias de óleo localizadas nas regiões de Araraquara, Campinas, Bauru, Paraguaçu Paulista, Guararapes, Londrina e Maringá e foram coletadas nos meses de abril a novembro da safra de 1986. A determinação das aflatoxinas foi feita por cromatografia em camada delgada.

Dos resultados pôde-se concluir que: 1) 114 amostras estavam contaminadas com aflatoxina, representando 67,45% do total; 2) o nível de contaminação foi baixo, com valores variando de menos de 10 a 40 ppb, sendo que as amostras com 40 ppb representaram apenas 12,30% do total contaminado; 3) houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre as diversas regiões estudadas, tendo a de Maringá apresentando a maior incidência e os teores mais elevados de aflatoxina B_1 ; 4) as regiões de menor incidência e menor teor de aflatoxina B_1 foram Araraquara, Campinas e Bauru; 5) não houve predominância da incidência de aflatoxina B_1 em qualquer época de toda a safra; 6) em todas as amostras investigadas, a única aflatoxina encontrada foi a B_1 .

OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN COTTONSEED MEALS

(*Gossypium hirsutum* L.) DURING THE 1986 CROP

Author: Cecília Maria Resende Gonçalves

Adviser: Prof. Dr. Homero Fonseca

SUMMARY

In the present work the occurrence and the level of aflatoxin contamination in 169 samples of cottonseed meals were investigated. The samples were furnished by oil processing plants located in the regions of Araraquara, Campinas, Bauru, Paraguaçu Paulista, Guararapes, Londrina and Maringá from April to November 1986 and aflatoxin determined by thin layer chromatography.

From the results the following conclusions could be drawn: 1) 114 samples, representing 67.45%, were contaminated with aflatoxin; 2) the level of contamination was considered low with values ranging from 10 to 40 ppb. The latter value represented only 12.30% from the total positive samples; 3) there was a significant difference ($\alpha = 0.05$) among the regions studied having Maringá showed the higher incidence and level of contamination, while Araraquara, Campinas and Bauru lower values; 4) there was no predominance of the aflatoxin incidence any time during the whole processing period; 5) in all investigated samples the sole aflatoxin found was the B₁.

1. INTRODUÇÃO

As sementes oleaginosas normalmente são boas fontes de proteínas e calorias, e os seus subprodutos também são ricos em proteínas e aminoácidos essenciais, além de contribuírem para o conteúdo energético das rações (TAFURI & RODRIGUES, 1984).

O processo de industrialização das sementes oleaginosas produz dois compostos distintos: os óleos vegetais e as tortas ou farelos. As tortas ou farelos, assim chamados segundo o tipo de extração a que foram submetidas as sementes oleaginosas, são, em sua composição, praticamente iguais às sementes originais (ROHR, 1978), porém com teor de óleo baixo na torta ou insignificante no farelo.

O farelo de algodão, um subproduto de elevado valor nutritivo, contém cerca de 45 a 48% de proteína, 6,8% de nitrogênio, 2,9% de fósforo, menores quantidades de óleo, cálcio, sódio, magnésio, ferro, vitaminas do complexo B e vitamina C (ABRAHÃO et alii, s.d.). Por possuir uma grande quantidade de proteína (TANGO 1965 e 1966) considerada de boa qualidade é muito utilizado como suplemento protéico no balanceamento de rações animais.

Sabe-se que em todo o globo terrestre, sobretudo nos países menos desenvolvidos, onde há uma enorme concentração de pessoas de menor poder aquisitivo, o problema do déficit calórico-protéico assume proporções alarmantes. É cada

vez mais problemático alimentar a população humana, pois o consumo "per capita" de alimentos vem diminuindo, ao mesmo tempo em que a desnutrição dissemina-se como consequência da má distribuição de riquezas, do rápido crescimento dos povos, da crise na produção de alimentos, entre tantos outros fatores. Uma alternativa para consumo humano é a produção de farinhas de sementes ou de tortas de algodão, através da aplicação de processos tecnológicos simples a custos reduzidos.

Diante desse quadro de desnutrição e da grande quantidade excedente de farelo de algodão, que pode ser aproveitado como farinha, no enriquecimento de alimentos básicos destinados ao consumo por parte de grupos de escasso poder de compra e vulneráveis à desnutrição, há na atualidade, uma enorme necessidade e um crescente interesse no emprego do farelo de algodão para consumo humano (ELIAS & BRESSANI, 1969; BUCKLE & SILVA, 1975; MONCADA & GUTIÉRREZ, 1979).

Entretanto, muitas vezes a ocorrência de fungos toxigênicos em sementes, tortas e farelos torna-os impróprios ao preparo de rações destinadas à alimentação animal e também à alimentação humana. O consumo de alimentos que contêm essas toxinas tem provocado efeitos prejudiciais à saúde, pois promove uma redução na resistência imunológica, possibilitando a instalação de doenças infecciosas nos animais e no homem, ocorrendo, em alguns casos, a morte. Algumas dessas toxinas são ainda cancerígenas e mutagênicas para muitas espécies de animais. Além de prejudicar os animais mais sensíveis, elas podem ser encontradas no leite de vacas alimentadas com farelo tóxico e atingir o homem através do consumo do leite contaminado.

Um dos principais fungos produtores de toxinas cancerígenas é o *Aspergillus flavus*. Este, em condições favoráveis de temperatura e umidade, produz um conjunto de

substâncias tóxicas denominadas aflatoxinas. Dentre estas, a que vem despertando maior atenção dos pesquisadores é a aflatoxina B₁, porque, de um modo geral, seus efeitos são mais importantes, além de ter maior potencial cancerígeno que as demais (CLIFFORD & REES, 1965; WOGAN, 1966 e 1968; TANGO, 1974).

A maioria dos trabalhos consultados mostra que, dentre as sementes oleaginosas, o amendoim e seus derivados constituem-se nos produtos mais freqüentemente contaminados pelas aflatoxinas. No entanto, sabe-se hoje que essas toxinas, sobretudo a aflatoxina B₁, vêm sendo detectadas em grande parcela dos gêneros alimentícios consumidos por populações de diferentes regiões (LAPA, 1983).

Em regiões de clima quente e úmido o fungo encontra as condições mais favoráveis ao seu completo desenvolvimento e produção de aflatoxinas nos alimentos, contaminando-os.

O uso de rações à base de subprodutos de sementes oleaginosas tem como finalidade suplementar a alimentação dos animais e de populações carentes de uma nutrição adequada. Assim, em regiões onde predomina a desnutrição e que apresentam as condições climáticas favoráveis à produção de aflatoxinas, é inútil e até prejudicial complementar a dieta através de um produto contaminado com tais toxinas.

No Brasil, o problema das aflatoxinas assume um caráter muito sério porque a secagem e o armazenamento das vagens e amêndoas são feitos em condições inadequadas. Esse problema aumenta consideravelmente diante da constatação de que a ocorrência de aflatoxinas em farelo de algodão não é monitorada no país. Portanto, há um risco para a saúde humana e animal, que estão expostas aos efeitos nocivos ocasionados pelas toxinas. Por isso, é necessário determinar

os níveis de aflatoxinas em farelo de algodão, já que este é utilizado na alimentação animal e pode ainda ser empregado na alimentação humana com o fim de contribuir para a melhoria do estado de nutrição de indivíduos que vivem em constante déficit alimentar.

Não tendo sido encontrado na literatura relato de levantamentos ou monitorações em nosso país de ocorrência de aflatoxinas em farelo de algodão, decidiu-se efetuar esta pesquisa.

Com base nesses antecedentes, este trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Determinar a ocorrência e o nível de contaminação com aflatoxinas do farelo de algodão procedente de indústrias de óleo localizadas em determinadas regiões, durante a safra de 1986;
2. Investigar se haveria variação na incidência e no teor de aflatoxinas ao longo da safra, bem como, se haveria diferença entre as regiões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os efeitos tóxicos ocasionados pelas aflatoxinas foram observados pela primeira vez por STEVENS et alii (1960) quando descreveram o aparecimento de uma doença, na Inglaterra, que causou a morte de um grande número de peruzinhos. Estas observações foram confirmadas por BLOUNT (1960), MANN (1960), SMITH (1960), SWARBRICK (1960) e WANNOP (1960).

Muitas hipóteses surgiram para tentar explicar a morte dos animais. Enquanto MANN (1960) acreditava ser um cereal o responsável pela doença, SMITH (1960) suspeitava que ela deveria ser causada por algum fator nutricional.

Posteriormente, ASPLIN & CARNAGHAN (1961) verificaram que o envenenamento das aves era causado pela ingestão do farelo de amendoim importado do Brasil. Ao mesmo tempo, CARNAGHAN & SARGEANT (1961), GRAY (1961) e LOOSMORE & HARDING (1961) constatavam também a morte de animais que tinham o farelo de amendoim como componente básico da dieta. Logo a seguir, foi sugerido que a torta de amendoim poderia estar contaminada com microrganismos.

SARGEANT et alii (1961), pesquisando os microrganismos presentes na ração dos animais, isolaram e identificaram o fungo *Aspergillus flavus* Link ex Fries como sendo o produtor do fator tóxico, denominado de aflatoxina.

Estudos posteriormente realizados sobre os métodos de purificação e de dosagem das toxinas, identificaram dois tipos de aflatoxinas designadas de B ("blue") e G ("green") em função de suas fluorescências azul e verde quando observadas sob luz ultravioleta de 365 nm (TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE, 1962).

HARTLEY et alii (1963) verificaram que as aflatoxinas B e G eram constituídas por quatro frações denominadas: B₁, B₂, G₁ e G₂. Em seguida, ficou demonstrado que essas toxinas normalmente eram produzidas na proporção aproximada de 40:1:50:1, respectivamente (HARTLEY et alii, 1963; CUCULLU et alii, 1966).

Das quatro aflatoxinas principais (B₁, B₂, G₁ e G₂), a mais tóxica e cancerígena é a B₁. A forte habilidade de ligação da aflatoxina B₁ com o ácido desoxiribonucléico (ADN) é o principal aspecto de suas propriedades tóxicas e cancerígenas (SPORN et alii, 1966). Por causa de sua elevada toxicidade, a aflatoxina B₁ é utilizada para a determinação da toxidez de produtos contaminados com as aflatoxinas (COSTA, 1967). A aflatoxina G₁ também deve ser considerada quando presente em altas concentrações pois possui aproximadamente a metade da toxidez da aflatoxina B₁ (NAKAMURA, 1968).

Segundo FRAYSSINET & LAFARGE (1970), LAFONT (1970) e EDDS (1973), todos os seres vivos são sensíveis, em diferentes graus, à ação da aflatoxina B₁ e as lesões provocadas por ela podem ser de dois tipos: agudas, ocasionadas pela ingestão de doses relativamente elevadas, provocando lesões hepáticas graves e de efeito quase sempre letal; crônicas, produzindo lesões progressivas, severa depressão do crescimento corporal, alterações histológicas e hepatomas, após um período mais ou menos prolongado de ingestão de doses subagudas.

Foi constatada a existência de outras toxinas denominadas M_1 e M_2 no leite, na urina e nas fezes de animais alimentados com tortas e farelos tóxicos (DE IONGH et alii, 1964; ALLCROFT et alii, 1966). Estas substâncias apresentam praticamente a mesma toxicidade das aflatoxinas B_1 e B_2 , respectivamente. Outros metabólitos, B_{2a} e G_{2a} , com toxicidade 60 a 100 vezes inferior à das aflatoxinas B_1 e G_1 , também foram isolados e identificados (DUTTON & HEATHCOTE, 1966).

CLEGG & BRYSON (1962), ALLCROFT & LEWIS (1963), NEWBERNE (1973) e PIER (1973) verificaram que muitas espécies de animais são sensíveis à ação das aflatoxinas e os efeitos crônicos ocasionados pela ingestão dessas substâncias são: hemorragia, cirrose, necrose e câncer no fígado, seu principal órgão de ação. Além disso, os animais podem diminuir seu ganho de peso e seu desempenho geral devido a redução de sua resistência imunológica, diretamente proporcional à quantidade e/ou ao período de ingestão das aflatoxinas, podendo em muitos casos, morrer ou serem acometidos por várias doenças secundárias (ALLCROFT & LEWIS, 1963; MUSTAKAS et alii, 1964; WOGAN, 1968; FONSECA, 1968 e 1969). As toxinas podem alojar-se nos tecidos e órgãos dos animais e também estar presentes em alimentos que são consumidos pelo homem, como leite, queijo, ovos e produtos cárneos, entre outros (WESSEL & STOLOFF, 1973).

Ainda com relação à suscetibilidade dos animais, sabe-se que a mesma varia conforme a espécie, havendo algumas que são totalmente resistentes, como o camundongo (PLATONOW, 1964) e o carneiro (NEWBERNE, 1973), enquanto que, dentro de uma mesma espécie, os mais jovens são mais sensíveis (ALLCROFT & LEWIS, 1963). Dentre as espécies mais sensíveis estão os ratos (LANCASTER et alii, 1961) e as trutas (NEWBERNE), 1973).

Com relação à ação das aflatoxinas sobre o homem, vários autores consideram a hipótese dessas micotoxinas serem cancerígenas, mostrando que há uma correlação altamente positiva entre a quantidade de aflatoxinas ingeridas e a incidência de câncer primário no fígado, em países onde a população freqüentemente consome alimentos mofados. Além do câncer, as aflatoxinas podem ocasionar o surgimento de outras graves doenças, como a encefalopatia e degeneração gorda das vísceras (EDFV - Encephalopathy and Fatty Degeneration of the Viscera), a hepatite infecciosa do vírus B e o "kwashiorkor" (DAVIDSON, 1970; EDDS, 1973; CAMPBELL & STOLOFF, 1974; HENDRICKSE et alii, 1982; FONSECA, 1983; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983; FONSECA, 1984).

Alguns estudos sugerem a possibilidade de que as aflatoxinas sejam responsáveis por hepatopatias, encontradas com freqüência em habitantes de determinadas regiões da África, onde predomina a deficiência de proteínas (BANKS JUNIOR et alii, 1964; ALBERT & DAVIDSON, 1969).

Até o momento, as aflatoxinas continuam sendo consideradas como um dos mais potentes agentes químicos cancerígenos já conhecidos.

O nível de 30 ppb das aflatoxinas ($B_1 + G_1$) é o limite máximo permitido em alimentos destinados ao consumo humano, segundo as normas brasileiras (FONSECA, 1983). Em outros países esse valor varia entre zero e 50 ppb (CAMARGO, 1986).

O fungo *Aspergillus flavus* é encontrado normalmente no ar, no solo, nas plantas e nos animais (TANGO, 1974; CARVALHO & CHALFOUN, 1984). Entretanto, CARVALHO & CHALFOUN (1984) observaram que sua ocorrência em solos de regiões tropicais é muito maior do que nos de regiões temperadas, e sua incidência pode ser facilmente reconhecida pela

coloração verde-amarelada e pelo aspecto floculado que apresenta.

HESSELTINE et alii (1966), analisando o comportamento do *Aspergillus flavus* quanto à sua capacidade de produzir aflatoxinas, observaram que nem todas as cepas são capazes de produzi-la. Outros fungos, como por exemplo, o *Aspergillus parasiticus* também produzem aflatoxinas.

Segundo SCHINDLER et alii (1967), SCHROEDER & HEIN JUNIOR (1968), NORTHOLT & BULLERMAN (1982) e ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1983) as aflatoxinas podem ser produzidas em qualquer tipo de alimento e de rações, desde que as condições favoráveis de temperatura e umidade, principais fatores que regulam o crescimento do fungo e a produção de toxinas, estejam presentes. De uma maneira geral, a atividade de água mínima em alimentos necessário ao crescimento do *Aspergillus flavus* e à produção de aflatoxinas está em torno de 0,85 (SANDERS et alii, 1968; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983). A faixa de temperatura para que o fungo possa crescer situa-se num intervalo de 10 a 40°C, sendo a temperatura ótima aproximadamente 25°C (FONSECA, 1984).

RICHMOND et alii (1962a e 1962b) estudando a toxigenicidade do *Aspergillus flavus* verificaram que o crescimento do fungo e a produção de aflatoxinas podem ocorrer em rações que não contêm amendoim. A doença também se reproduziu em animais quando alimentados com soja, feijão, semente de algodão e trigo contaminados com o *Aspergillus flavus*. Mais tarde, GIBSON (1962) constatou a presença de aflatoxinas em milho e LOOSMORE et alii (1964) obtiveram semelhante resultado em torta de algodão, onde encontraram níveis considerados tóxicos de aflatoxina B₁.

Embora o amendoim seja o substrato preferido

pelo *Aspergillus flavus*, no estudo realizado por Sinnhuber et alii*, citados por SALUNKE et alii (1982) foi observado o aparecimento de hepatomas em trutas alimentadas com farelo de algodão. Além disso, a descoberta de altos teores de aflatoxinas em sementes e farelos de algodão serve para demonstrar a falta de especificidade do *Aspergillus flavus* para o substrato no qual cresce (SGARBIERI, 1969).

COSTA (1967), TANGO (1974), STOLOFF (1980), MALOZZI (1984) e FARAG et alii (1986) também encontraram cepas aflatoxigênicas em sementes e tortas de algodão, entre outros produtos.

SCHNEIDER et alii (1972) estudaram a ocorrência de aflatoxinas em 99 amostras de sementes de algodão durante os meses de abril a novembro de 1971, em diversas regiões da América Central. Os resultados obtidos demonstraram a presença de aflatoxinas em 4 amostras, o que representou uma incidência de 4% do total. A aflatoxina B₁ foi a única encontrada em todas as amostras contaminadas, enquanto a B₂ esteve presente em 2 amostras e a G₁ foi identificada em apenas uma amostra. Baseados neste comportamento, PONS JUNIOR et alii (1980) investigaram as toxinas que mais ocorrem em sementes de algodão. Os autores observaram as aflatoxinas B₁ e B₂ com maior frequência do que as demais.

MAYNE et alii (1966) chama a atenção para o fato de que o gossipol, pigmento polifenólico encontrado naturalmente na semente de algodão em proporções

* SINNHUBER, R.O.; WALES, J.H.; ENGELBRECHT, R.H.; AMEND, D.E.; AYRES, J.L.; ASHTON, W.F.; KRAY, W. Aflatoxins in cottonseed meal and heptoma rainbow trout. Federation Proceedings, Washington, 24: 267, 1965.

que variam de 0,4 a 1,5% de seu peso, provavelmente pode modificar a produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus flavus*.

Segundo MAYNE et alii (1966), GOLDBLATT (1971) e ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1983) as aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 podem ocorrer simultaneamente ou não, sendo que suas presenças e concentrações variam em função da capacidade genética da cepa produtora, do tipo de substrato em que o fungo cresce e dos fatores ambientais. Todos concordam que as modificações que ocorrem no teor e no tipo de aflatoxina presente na semente de algodão se devem mais às características individuais da linhagem do fungo do que ao efeito inibitório dos constituintes da semente.

ENGBRECHT et alii (1965) examinaram 8 amostras de farelo de algodão e encontraram aflatoxina B_1 em 4 amostras, tendo determinado nelas valores que variaram entre 19 e 186 ppb.

Em trabalhos realizados por Pons Junior et alii*, citados por MAYNE et alii (1966), foram identificadas as aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 em torta de algodão. Por outro lado, MAYNE et alii (1966), realizando o mesmo estudo encontraram com maior frequência as aflatoxinas B_1 e B_2 , em sementes e farelo de algodão. Sugerem, ainda, estes autores que as aflatoxinas G_1 e G_2 normalmente não estão presentes em sementes de algodão. Resultados similares foram obtidos com as pesquisas de PONS JUNIOR et alii (1968 e 1980) e com os trabalhos de CUCULLU et alii (1972), que comprovaram não ser comum a ocorrência de aflatoxinas G_1 e G_2 em sementes e farelo de algodão.

*PONS JUNIOR, W.A.; HOFFPAUIR, C.L.; HOPPER, T.H. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 42: 471-5, 1965.

McMEANS et alii (1968) estudaram a ocorrência de aflatoxinas em farelo de algodão e verificaram que elas podem estar presentes ou não no farelo obtido de caroços contaminados. Estes autores demonstraram que havia amostras de caroço de algodão sem aflatoxinas, mas cujo farelo estava infectado. A situação inversa também foi observada. Muitos trabalhos foram feitos para avaliar esse fenômeno, e os resultados indicam que as aflatoxinas ficam concentradas em poucas sementes de um dado lote. Como por exemplo, pode-se citar o trabalho de WHITTEN & SMITH (1972), no qual amostras de caroço de algodão continham, em média, 8000 ppb de aflatoxina B₁. De um lote de 150 sementes, só 18 estavam contaminadas com a toxina, e em apenas uma semente foram encontrados 600.000 ppb de aflatoxina B₁. Por causa do acúmulo de aflatoxina em níveis elevados em alguns grãos, vários estudos foram feitos para tentar descobrir métodos que permitam separar os caroços de algodão contaminados com aflatoxinas antes do processamento para que se consiga uma torta isenta de contaminação. Os métodos de remoção física usados são relacionados com o peso, o tamanho, ou a cor da semente ou da fibra. Entretanto, nenhuma dessas características parece ser um bom indicativo do teor de aflatoxinas em sementes de algodão (KOLTUN et alii, 1974).

Um sinal característico da infecção pelo *Aspergillus flavus* é a presença de um brilho fluorescente amarelo-esverdeado na fibra ou na semente de algodão quando observados sob luz ultravioleta (BOLLENBACHER & MARSH, 1954; ASHWORTH JUNIOR et alii, 1968; HAMSA & AYRES, 1977). Esta fluorescência, denominada de BGYF (bright greenish-yellow fluorescence) ou fluorescência "cateye" ("olho de gato") parece ser um forte indicativo da presença do *Aspergillus flavus* e das aflatoxinas em sementes e fibras de algodão (KOLTUN et alii, 1974; LEE & RUSSELL, 1981; LEE et alii, 1986).

ASHWORTH JUNIOR & McMEANS (1966), pesquisando o teor de aflatoxinas nas sementes, verificaram que nem sempre há uma relação entre o aparecimento da fluorescência BGYF no caroço e na fibra de algodão e a presença de aflatoxinas, ou seja, é possível existir fibras ou caroços infectados mas que não manifestam a fluorescência BGYF sob luz ultravioleta. Da mesma forma, podem existir amostras fluorescentes sem estarem contaminadas.

Baseados no comportamento fluorescente das fibras e caroços de algodão, GOLDBLATT (1971), LEE & CUCULLU (1978), LEE & RUSSELL (1981) e LEE et alii (1986) investigaram também a relação desse fenômeno com a presença do *Aspergillus flavus*. Os autores observaram uma alta correlação entre a fluorescência amarelo-esverdeada, sob luz ultravioleta, de sementes de algodão comprometidas, com seus conteúdos de aflatoxinas.

Entretanto, ASHWORTH JUNIOR et alii (1968), mesmo sabendo que o método de triagem de caroços de algodão infectados com base nas suas características fluorescentes não é 100% eficiente, propuseram um equipamento para separação eletrônica das sementes fluorescentes das não fluorescentes.

No processo de seleção das sementes de algodão, além da fluorescência BGYF, outras características também devem ser observadas, como ausência de linter em alguns pontos da semente, que pode ocorrer devido à invasão de fungos, caroços com linter delgado e amarelado e sementes quebradas.

As características de densidade das sementes de algodão têm sido também usadas para discriminar as sementes contaminadas das não contaminadas através da utilização de um aparelho de projeção. As sementes sadias e maduras são

projetadas a uma maior distância que as sementes contaminadas devido à sua maior densidade. Em testes iniciais, sementes de algodão contendo de 40 a 80 ppb de aflatoxina B₁ apresentaram mais de 63% da toxina concentrada em 6% das sementes, enquanto que 85% da toxina B₁ poderia ser obtida de 25% das sementes, conforme citado por GOLDBLATT (1971). Outros testes, posteriormente desenvolvidos empregando esta técnica, indicaram que este método é inconsistente.

O principal problema de contaminação da cultura do algodão resulta da infecção das sementes que ocorre no campo (ASHWORTH JUNIOR & McMEANS, 1966; WIDSTROM, 1979; KLICH & LEE, 1982). Entretanto, se a contaminação pelo *Aspergillus flavus* e a subsequente produção de toxinas não ocorrer no campo, antes da colheita, ela poderá ocorrer no período pós-colheita, durante o armazenamento, o transporte ou o processamento (HAMSA & AYRES, 1977).

Dentre os fungos que podem aparecer no campo, o *Aspergillus flavus* é o mais importante (ASHWORTH JUNIOR et alii, 1971a). Este microrganismo, embora predominantemente considerado um fungo de armazenamento (GOLDBLATT, 1971; HAMSA & AYRES, 1977), tem a capacidade de invadir o línter, a casca da semente e o embrião no campo, antes mesmo de ser realizada a colheita do algodão (McMEANS et alii, 1968; ASHWORTH JUNIOR et alii, 1969b e 1971a).

Quando o fungo penetra no capulho, ele passa a se desenvolver, e o ideal para ele é que não ocorram lesões que exponham as fibras e as sementes à aeração, pois isso provocaria uma secagem e a não formação de toxinas, o que acontece quando 90% do capulho está aberto (ASHWORTH JUNIOR et alii, 1969a; RUSSELL et alii, 1976).

O línter do caroço de algodão é um substrato pobre para o crescimento do *Aspergillus flavus* mas, após a

penetração do micélio na casca da semente, o crescimento do fungo é rápido (TANGO, 1974).

Os conídios, quando entram em contato com o caroço de algodão, encontrando condições favoráveis, germinam e invadem o embrião das sementes (HAMSA & AYRES, 1977). O fungo, após estabilizar-se na semente, cresce dentro das cavidades por onde penetrou e esporula intensamente. O micélio (tecido vegetativo) cresce entre a casca da semente e o embrião e, por isso, caroços aparentemente sadios, ou seja, com a superfície sem apresentar sinais visíveis de crescimento de fungos, não estão necessariamente isentos de toxinas (CUCCULU et alii, 1966; LEE et alii, 1967; FONSECA, 1984).

A invasão da semente pelo fungo pode acontecer em decorrência de alguns fatores, como condições adequadas de temperatura e umidade, danos mecânicos que ocorrem na casca da semente durante a secagem e/ou desfibramento, e orifícios ocasionados por insetos (HAMSA & AYRES, 1977).

Os insetos são veículos de esporos do *Aspergillus flavus* e podem levar o fungo diretamente para a semente (RUSSELL et alii, 1976). A lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), uma das principais pragas do algodoeiro, é responsabilizada como um agente que facilita a entrada do fungo pelo seu buraco de emergência na superfície do capulho (BRAZZEL, 1955; LUKEFAHR & MARTIN, 1963; ASHWORTH JUNIOR et alii, 1971a e 1971b; KIYOMOTO & ASHWORTH JUNIOR, 1974; McMEANS & BROWN, 1975; HAMSA & AYRES, 1977). Da mesma forma que a lagarta rosada, o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) também é um importante disseminador do fungo (WIDSTROM, 1979).

Muito embora os danos causados pelos insetos no campo, antes da colheita, sejam os principais responsáveis pela infecção de origem fúngica no algodão (LEE et

alii, 1986), qualquer dano provocado em um capulho sadio, durante a colheita e a operação de secagem, poderá se transformar em uma via de acesso ao fungo (FONSECA, 1984). Não menos importante do que as lesões provocadas nos capulhos é a perfeita secagem que deve seguir-se à colheita. Para uma maior segurança contra a infecção fúngica, a secagem deve ser rápida e eficiente, pois se isto não ocorrer o risco de contaminação será muito grande.

O teor de umidade da semente de algodão em equilíbrio com a umidade relativa do ambiente é, fundamentalmente, um fator limitante para que aconteça ou não a contaminação. Caroços de algodão com 15, 18 e 22% de umidade, colocados sob temperaturas de 27 a 29°C, têm grandes possibilidades de serem infectados. A variação do conteúdo de umidade de sementes estocadas de 15,1 para 21,8% de umidade, é suficiente para aumentar em 10 vezes o teor de aflatoxinas. A presença de apenas alguns caroços úmidos no meio da massa armazenada pode fomentar focos de infecção (WHITTEN & SMITH, 1972).

A umidade ideal para estocar o caroço de algodão está entre 9 e 10%. Com esses teores de umidade, a semente de algodão, mesmo contaminada, pode ser armazenada por vários meses sem aumento do teor de toxinas nas sementes (ASHWORTH JUNIOR et alii, 1971a; WHITTEN & SMITH, 1972). Caroços armazenados com um teor de umidade inferior a 11%, com certeza terão assegurado a manutenção da sua qualidade durante o armazenamento. O valor crítico de umidade situa-se ao redor de 13%, acima do qual a deterioração é muito rápida (ABRAHÃO et alii, s.d.).

Para CHRISTENSEN (1957), em sementes com cerca de 15% de umidade já há limitação do crescimento do *Aspergillus flavus*.

MATTIL et alii (1964), em suas pesquisas, demonstraram que na semente de algodão o aumento do teor de umidade de 14 para 15% propicia a atividade enzimática do grão, enquanto teores mais elevados favorecem o desenvolvimento de microrganismos. Esses altos teores de umidade da semente decorrem de uma elevada taxa de umidade relativa do ar, em geral superior a 75%, e nestas condições algumas linhagens do *Aspergillus flavus* já começam a se desenvolver sobre as sementes.

No farelo de algodão, o nível crítico de umidade está em torno de 10%. Acima desse valor, os fungos podem se desenvolver e produzir suas toxinas (FONSECA, s.d.). Para que o farelo de algodão possa conservar-se bem, deve ser acondicionado e armazenado sob condições de baixa umidade a fim de não permitir o desenvolvimento de fungos e a produção de toxinas que possam vir a comprometer a qualidade do produto.

WESSELL & STOLOFF (1973) e RUSSELL et alii (1976), estudando o problema de elevada umidade em torno do capulho, verificaram que o efeito da umidade combinado com os danos internos causados pelas lagartas, dificultam a soltura das fibras e a secagem. Nestas condições, a abertura do capulho é lenta e tardia, as sementes demoram para secar, e neste ambiente o fungo encontra condições ideais para seu desenvolvimento e produção de aflatoxinas.

A temperatura é também um fator importante para o fungo penetrar no capulho. O *Aspergillus flavus* requer altas temperaturas, na faixa de 28 a 37°C, para se desenvolver no caroço de algodão (HAMSA & AYRES, 1977). A faixa ótima de temperatura para produção de aflatoxinas fica em torno de 20 a 25°C (SCHINDLER et alii, 1966; ASHWORTH JUNIOR et alii, 1969a; WHITTEN & SMITH, 1972; RUSSELL et alii, 1976).

A invasão da semente de algodão pelo *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxinas são também influenciadas por uma enorme gama de microrganismos habitantes das sementes antes da colheita e durante o armazenamento. Outros fungos e bactérias podem ser antagônicos ao *Aspergillus flavus* ou podem competir com ele na invasão da semente (HAMSA & AYRES, 1977; NORTHOLT & BULLERMAN, 1982). Além disso, as sementes de algodão não são consideradas como um substrato inerte à penetração do fungo. As sementes podem ter mecanismos de defesa para impedir que os microrganismos penetrem através de suas aberturas naturais, estratégias estas que podem ser responsáveis pela resistência de espécies ou variedades. A semente de algodão pode excretar certas substâncias antimicrobianas cuja produção é induzida pelas fitoalexinas (hormônio vegetal) e que apresentam efeitos negativos sobre o fungo invasor (HAMSA & AYRES, 1977).

FRANK (1978), determinando a ocorrência de aflatoxinas em torta e farelo de algodão, verificou que pode haver um índice de contaminação de até 56%, cujo valor é variável em função das condições climáticas.

Nos Estados Unidos, a ocorrência de aflatoxinas em sementes e farelos de algodão é bastante elevada (MYCOTOXINS and food safety, 1986). Na Califórnia, por exemplo, altas concentrações de aflatoxinas, de 1735 µg/kg a 2578 µg/kg, já foram encontradas em semente de algodão (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983). Entretanto, a ocorrência ou não de infecção parece estar intimamente relacionada com as condições climáticas da região e/ou do ano agrícola (RUSSELL et alii, 1976). No Sudeste, onde ocorrem altas temperaturas, baixa precipitação e lavouras irrigadas, a contaminação do algodão com as aflatoxinas provoca um grande prejuízo (MARSH et alii, 1973; WESSELL & STOLOFF, 1973; VELASCO et alii, 1975; RUSSELL et alii, 1976; HAMSA &

AYRES, 1977; RUSSELL & LEE, 1985; LEE et alii, 1986). Por outro lado, na Região Leste ocorre alta precipitação e umidade, mas a temperatura é baixa, e isto diminui a incidência de aflatoxinas na cultura do algodão (HAMSA & AYRES, 1977; RUSSELL & LEE, 1985; LEE et alii, 1986).

Historicamente, chove muito na maioria das regiões brasileiras nos meses de janeiro e fevereiro, quando as temperaturas são altas e a umidade do ar elevada. A partir de março, há um decréscimo na temperatura e na precipitação pluviométrica, mas eventualmente chove. Se a colheita do algodão coincidir com o período chuvoso, a abertura do capulho será lenta e as sementes irão demorar mais tempo para secar no campo. Nestas condições, a umidade do ambiente e do capulho é elevada ficando propício ao desenvolvimento do fungo e à produção de aflatoxinas (ABRAHÃO*).

McMEANS & ASHWORTH JUNIOR (1966) e ASHWORTH JUNIOR et alii (1971a) verificaram que as infecções fúngicas e as contaminações com aflatoxinas acontecem, essencialmente, no terço inferior da planta do algodão, onde se localiza cerca de 40% do produto da safra.

Os prejuízos que fungos como o *Aspergillus flavus* e suas toxinas podem ocasionar à cultura do algodão são imensos. Dentre eles, destacam-se a descoloração e o apodrecimento de capulhos no campo, diminuindo a sua produtividade (BOLLENBACHER & MARSH, 1954; CHRISTENSEN, 1957; MARSH & TAYLOR, 1958; ASHWORTH JUNIOR et alii, 1969a), a queda de preços dos caroços contaminados causada pela redução da qualidade e aceitabilidade das sementes (CHRISTENSEN,

*ABRAHÃO, J. T. M. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP) Comunicação pessoal, 1987.

1957 e ASHWORTH JUNIOR et alii, 1968), e a infecção em si que pode passar para a torta ou farelo, causando graves problemas para a saúde humana e animal.

Outro prejuízo importante ocasionado pelas aflatoxinas aparece sobre a viabilidade da semente de algodão. KLICH & LEE (1982), estudando a germinação de sementes contaminadas com aflatoxinas, verificaram que apenas 38% das sementes germinaram normalmente. A taxa de germinação para sementes não infectadas, sob as mesmas condições das sementes contaminadas, é estimada em 90%.

O farelo de algodão é utilizado principalmente na composição de rações animais. Dependendo do teor de aflatoxina presente, há restrições na percentagem em que ele pode entrar na mistura. De acordo com estudos realizados foi elaborada uma tabela de uso, de materias-primas contaminadas, na composição de rações destinadas a várias espécies animais (Tabela 1) (FAO, 1979).

TABELA 1 - Conteúdo de aflatoxinas em alimentos animais e percentagens máximas permissíveis de mistura destes componentes em rações, conforme a espécie e a idade do animal.

Conteúdo de aflatoxina no alimento	Tipo de ração	Máximo permissível de mistura	Conteúdo máximo total de aflato- xina por kg de ração pronta
Ligeiramente positivo (até 0,1 mg/kg, ou seja, 100 ppb)	patos e marrecos	zero	zero
	peruzinhos	zero	zero
	pintinhos	zero	zero
	franguinhos	zero	zero
	porcos em crescimento	zero	zero
	carneiros em crescimento	zero	zero
	novilhos	zero	zero

TABELA 1 - Conteúdo de aflatoxinas em alimentos animais e porcentagens máximas permissíveis de mistura destes componentes em rações, conforme a espécie e a idade do animal.

Conteúdo de aflatoxina no alimento	Tipo de ração	Máximo permissível de mistura	Conteúdo máximo total de aflato- xina por kg de ração pronta
	perus (acabamento)	5%	0,005 mg
	frangos (acabamento)	5%	0,005 mg
	porcos	7,5%	0,0075 mg
	galinhas poedeiras	7,5%	0,0075 mg
	bois (engorda)	7,5%	0,0075 mg
	vacas em lactação	15%	0,015 mg
	carneiros	15%	0,015 mg
De moderado a fortemente po- sitivo (0,1 a 1,0 mg/kg ou 100 a 1000 ppb)	perus (acabamento)	2,5%	0,025 mg
	frangos (acabamento)	2,5%	0,025 mg
	porcos	3,75%	0,038 mg
	galinhas poedeiras	3,75%	0,038 mg
	bois (engorda)	3,75%	0,038 mg
	vacas em lactação	7,5%	0,075 mg
	carneiros	7,5%	0,075 mg
Muito fortemente positivo (1,0 a 2,0 mg/kg ou 1000 a 2000 ppb)	vacas em lactação	2,5%	0,05 mg
	carneiros	2,5%	0,05 mg
Acima de 2000 ppb ou mais de 2,0mg/ kg)	Inservível como ingrediente de rações	-	-

Fonte: FAO (1979)

O farelo de algodão, a ser empregado na alimentação humana, deve ser produzido por meio de processos tecnológicos especiais para que a remoção e/ou inativação do gossipol ocorra com eficiência (FONSECA, s.d.). Esta substância é um alcalóide, e como tal é tóxico para o homem e para certas espécies de animais. Em geral, o boi e o carneiro não são afetados, porém coelhos e porcos morrem se forem freqüentemente alimentados com tortas ou farelos contendo altas taxas de gossipol (FONSECA, s.d.; TANGO, 1973; BRESSANI et alii, 1975).

Antes de ser empregado para complementar a alimentação animal ou humana, o farelo de algodão, deve ser analisado não só para verificar a presença do gossipol, como também, se há contaminação com aflatoxinas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para este trabalho foram utilizadas 169 amostras de farelo de algodão, do ano agrícola de 1986, fornecidas por 5 empresas que possuem indústrias de óleo situadas em algumas regiões dos Estados de São Paulo e do Paraná, conforme indicadas a seguir:

Empresa "A" - com indústrias localizadas em Araraquara (SP), Paraguaçu Paulista (SP) e Londrina (PR);

Empresa "B" - com indústria localizada em Maringá (PR);

Empresa "C" - com indústrias localizadas em Bauru (SP) e Maringá (PR);

Empresa "D" - com indústria localizada em Campinas (SP);

Empresa "E" - com indústria localizada em Guararapes (SP).

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta das amostras

As coletas foram realizadas semanalmente, de abril a novembro e de cada indústria era retirada uma amostra de aproximadamente 1,5 kg, em porções diárias de 200 a 300 g, para se ter um material representativo de todos os dias. Após a coleta, as amostras eram identificadas com letras A, B, C, D e E e numeradas em ordem cronológica de acordo com a semana e a procedência.

3.2.2. Preparo das amostras

As amostras de farelo de algodão foram trituradas 3 vezes em moinho de discos (Disc Mill, modelo 4E, The Straub Co, Philadelphia, EUA). Após serem misturadas em homogeneizador, as amostras foram guardadas em sacos plásticos e lacradas até serem executadas as análises.

3.2.3. Determinação das aflatoxinas

A extração das aflatoxinas do farelo de algodão foi efetuada pelo método de PONS JUNIOR et alii (1966) modificado, seguido de determinação quantitativa por cromatografia em camada delgada em placas de silicagel-G sob luz ultravioleta de 365 nm, pelo método de COOMES & FEUELL (1965), conforme descrito a seguir.

3.2.3.1. Extração e purificação do extrato

De cada amostra moída e homogeneizada foram tomados 20 g e extraídos com 100 ml de acetona a 80% em liquidificador por 5 min, sendo a seguir filtrado a vácuo, em funil de Büchner, com papel Whatman nº 1. Do filtrado obtido foi tomada uma alíquota de 50 ml em bēquer de 250 ml e adicionados 10 ml de acetato de chumbo a 20% mais 30 ml de água destilada. Em seguida, a mistura foi agitada gentilmente em movimentos circulares e deixada em repouso por 5 min. Após descanso, foi feita uma segunda filtração diretamente para um funil de separação de 250 ml, lavando-se o filtro com 10 ml de acetona a 20% e depois com 10 ml de água destilada.

Para extrair as aflatoxinas do filtrado foram utilizadas 2 porções de 25 ml de clorofórmio. Após agitação ocorreu a separação das fases e a camada de clorofórmio (inferior) foi passada para um bēquer de 250 ml, onde foram adicionados aproximadamente 10 g de sulfato de sódio anidro para retirada de água. A seguir, o extrato foi transferido para um balão de destilação de 125 ml, lavando-se o sulfato de sódio anidro por 3 vezes com 5 ml de clorofórmio.

O extrato contido no balão de destilação foi concentrado em evaporador a vácuo, tipo Rotavapor, até o volume de, aproximadamente, 2 ml. Após a concentração do extrato, transferiu-se o mesmo para balão volumétrico de 5 ml, lavando-se o balão de destilação com clorofórmio até completar o volume de 5 ml.

3.2.3.2. Cromatografia em camada delgada

a) Preparo das placas

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

b) Aplicação das amostras e padrão nas placas

A 2 cm da base das placas foram aplicadas, com auxílio de micropipetas (Drummond Microcaps), alíquotas de 40, 30, 20, 10 e 5 μ l do extrato de cada amostra e 5 μ l de padrão qualitativo das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 para comparação. A seguir, as placas foram colocadas em cubas de vidro fechadas contendo os solventes tolueno, acetato de etila, ácido fórmico (5:4:1, v/v/v). Após o sistema de solventes atingir a altura de 10 cm acima do local das alíquotas, as placas foram retiradas e secas com secador.

d) Quantificação das amostras

Cada placa desenvolvida e seca foi examinada em sala escura, sob lâmpada ultravioleta Philips tipo HPW, de 125 W, com emissão máxima de 365 nm, a uma distância de 30 cm. Nestas condições, foi observada a presença ou a ausência de manchas fluorescentes azul-violeta das aflatoxinas B_1 e B_2 , e esverdeadas das aflatoxinas G_1 e G_2 em $R_f=0,45$, 0,40, 0,35 e 0,30, respectivamente. A quantificação das amostras foi feita visualmente através da técnica de diluição para extinção em que se determinou a menor alíquota onde

a fluorescência das aflatoxinas foi apenas observada no limite de sua visibilidade na placa. Nas condições estabelecidas pelo método, o menor valor observado das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , no limite de visibilidade, é de 0,40, 0,10, 0,30 e 0,17 ng, respectivamente (COOMES & FEUELL, 1965).

e) Cálculo da concentração das aflatoxinas

As concentrações das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , presentes na amostra em ppb ($\mu\text{g/kg}$) foram calculadas pelo uso das seguintes fórmulas:

$$B_1 \text{ (ppb)} = \frac{400 \times D}{P \times V}$$

$$B_2 \text{ (ppb)} = \frac{100 \times D}{P \times V}$$

$$G_1 \text{ (ppb)} = \frac{300 \times D}{P \times V}$$

$$G_2 \text{ (ppb)} = \frac{170 \times D}{P \times V}$$

onde: D = volume total, em ml, necessário para diluir ou concentrar o extrato de modo que a fluorescência seja apenas visível no volume V;

V = volume, em μl , da menor alíquota onde a fluorescência das aflatoxinas foi observada;

P = peso, em g, da amostra.

3.2.4. Análise estatística

Para interpretação dos resultados das análises foi utilizada a estatística não-paramétrica, classificando-se a ocorrência de aflatoxina B_1 , em ppb, considerando: ND como zero, < 10 como empate e > 10 o valor direto.

Determinou-se a estatística (H_1) do teste de Kruskal-Wallis para grandes amostras e onde ocorreu empates entre observações (CAMPOS, 1983), como se segue:

$$H_1 = \frac{\frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)}{1 - \frac{\sum T_i}{N^3 - N}}$$

onde: N = número total de amostras;

R_i = soma das ordens atribuídas à i-ésima indústria;

n_i = número de amostras da i-ésima indústria;

$T_i = t_i^3 - t_i$ para t_i = número de amostras empatadas no i-ésimo grupo.

Para aplicação desse teste procedeu-se à classificação conjunta das $N = \sum_{i=1}^k n_i$ amostras, dando ordem 1 à menor delas e N à maior. Como ocorreram empates entre as observações, procedeu-se ao desempate, considerando para cada observação no grupo empatado a média das ordens que seriam atribuídas a elas se não houvesse o empate.

Os tratamentos (indústrias) foram confrontados 2 a 2 pelo método das comparações múltiplas a uma taxa de erro experimental $\alpha = 0,05$, para o caso de grandes amostras e de tratamentos não igualmente repetidos, segundo

CAMPOS (1983):

$$d.m.s. = z_{\alpha/[k(k-1)]} \sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

onde: $z_{\alpha/[k(k-1)]}$ = limite superior da distribuição normal;

N = número total de amostras;

n_i, n_j = número de amostras da i -ésima e j -ésima indústria, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de aflatoxina B_1 são apresentados nas tabelas 2 a 7 e os resultados das análises estatísticas encontram-se nas tabelas 8 e 9.

Conforme pode-se verificar nas tabelas de 2 a 7 a B_1 foi a única aflatoxina encontrada e o número de amostras contaminadas atingiu a 114, representando 67,45% do total. Observa-se também, nestas tabelas, que os níveis da referida toxina encontrados nas amostras contaminadas variaram de menos de 10 a 40 ppb. Estes mesmos resultados mostram que houve variação na ocorrência e no nível de contaminação do material estudado entre as fábricas ou regiões.

Os procedimentos não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Comparações Múltiplas foram aplicados para verificar a existência de diferença significativa entre a ocorrência e os teores de aflatoxina B_1 conforme as regiões. Foi encontrado o valor $H_1 = 52,03$, evidenciando-se nas tabelas 8 e 9 que as regiões diferem entre si quanto ao teor de aflatoxina B_1 ao nível de 0,01 de probabilidade.

Confrontando-se as tabelas 2, 3 e 9 constata-se que a menor ocorrência e os mais baixos teores de aflatoxina B_1 foram encontrados em Araraquara, diferindo significativamente ($\alpha = 0,05$) de outras regiões como Paraguaçu Paulista, Londrina e Maringá. Por outro lado, observa-se que Maringá foi a região que apresentou a maior ocorrência e os

teores mais elevados de aflatoxina B_1 , diferindo significativamente ($\alpha=0,05$) de Bauru, Campinas e Guararapes (Tabelas 4, 5, 6 e 9). Observa-se ainda, nas tabelas 2, 5, 6 e 9 que na região de Londrina a ocorrência e os teores de aflatoxina B_1 foram significativamente ($\alpha=0,05$) maiores do que nas regiões de Campinas e Guararapes.

Pode-se também constatar, nas tabelas 4 e 9, que entre as regiões de Bauru e Maringá não houve diferença significativa quanto ao teor de aflatoxina B_1 . Este mesmo resultado foi também verificado entre as indústrias localizadas em Maringá (Tabelas 3 e 4).

Analisando-se os resultados da tabela 7 verifica-se que não houve predominância da ocorrência de aflatoxina B_1 em qualquer época durante toda a safra.

TABELA 2 - Ocorrência de aflatoxina B_1 (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "A", Araraquara (SP), Paraguaçu Paulista (SP) e Londrina (PR), no ano de 1986 (média semanal).

Épocas de coleta	EMPRESA "A"		
	Araraquara	Paraguaçu Paulista	Londrina
28.04 a 04.05	ND	10	-
05.05 a 11.05	ND	10	-
12.05 a 18.05	13	40	-
19.05 a 25.05	13	40	-
26.05 a 01.06	ND	20	-
02.06 a 08.06	13	10	-
09.06 a 15.06	< 10	10	-
16.06 a 22.06	< 10	20	10
23.06 a 29.06	< 10	16	10
30.06 a 06.07	ND	20	27

TABELA 2 - Ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "A", Araraquara (SP), Paraguaçu Paulista (SP) e Londrina (PR), no ano de 1986 (média semanal).

Épocas de coleta	EMPRESA "A"		
	Araraquara	Paraguaçu Paulista	Londrina
07.07 a 13.07	20	27	27
14.07 a 20.07	ND	40	27
21.07 a 26.07	ND	< 10	10
27.07 a 03.08	ND	ND	10
04.08 a 10.08	ND	ND	ND
11.08 a 17.08	< 10	< 10	40
18.08 a 24.08	ND	< 10	20
25.08 a 31.08	ND	13	20
01.09 a 06.09	ND	< 10	13
07.09 a 13.09	ND	10	ND
14.09 a 20.09	< 10	10	10
22.09 a 28.09	< 10	< 10	20
29.09 a 05.10	ND	< 10	10
06.10 a 11.10	ND	10	10
12.10 a 18.10	ND	< 10	20
19.10 a 23.10	ND	-	-
24.10 a 01.11	ND	-	-
02.11 a 09.11	10	-	-
10.11 a 16.11	10	-	-
17.11 a 24.11	ND	-	-
25.11 a 01.12	< 10	-	-
Total de amostras contaminadas	13	23	16

ND = Não detectada

(-)= Amostras não enviadas pelas indústrias.

TABELA 3 - Ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "B", Maringá (PR), no ano de 1986 (média semanal).

Épocas de coleta	EMPRESA "B"
	Maringá
07.04 a 13.04	40
14.04 a 18.04	40
21.04 a 27.04	40
28.04 a 04.05	20
05.05 a 09.05	20
12.05 a 18.05	20
19.05 a 24.05	20
27.05 a 31.05	40
02.06 a 07.06	20
09.06 a 14.06	10
17.06 a 22.06	10
23.06 a 28.06	20
29.06 a 02.07	40
Total de amostras contaminadas	13

TABELA 4 - Ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "C", Bauru (SP) e Maringá (PR), no ano de 1986 (média semanal).

Épocas de coleta	EMPRESA "C"	
	Bauru	Maringá
15.04 a 19.04	-	40
20.04 a 26.04	40	40
27.04 a 05.05	20	27
06.05 a 12.05	-	20
13.05 a 18.05	20	40
19.05 a 26.05	10	20
27.05 a 01.06	10	< 10
02.06 a 08.06	10	< 10
09.06 a 15.06	< 10	< 10
16.06 a 22.06	ND	10
23.06 a 29.06	11	27
30.06 a 06.07	16	20
07.07 a 13.07	20	27
14.07 a 20.07	13	10
21.07 a 27.07	< 10	ND
28.07 a 04.08	ND	ND
05.08 a 11.08	ND	40
12.08 a 17.08	13	< 10
18.08 a 24.08	ND	ND
25.08 a 01.09	ND	< 10

TABELA 4 - Ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "C", Bauru (SP) e Maringá (PR), no ano de 1986 (média semanal).

Épocas de coleta	EMPRESA "C"	
	Bauru	Maringá
02.09 a 07.09	ND	ND
08.09 a 14.09	ND	ND
15.09 a 21.09	ND	10
22.09 a 28.09	ND	10
29.09 a 05.10	ND	-
06.10 a 12.10	ND	-
12.10 a 19.10	ND	-
Total de amostras contaminadas	13	19

ND = Não detectada

(-)= Amostras não enviadas pelas indústrias.

TABELA 5 - Ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "D", Campinas (SP), no ano de 1986 (média semanal).

Épocas de coleta	EMPRESA "D"
	Campinas
21.04 a 27.04	13
28.04 a 07.05	ND
08.05 a 19.05	20
20.05 a 04.06	ND
05.06 a 24.06	ND
25.06 a 24.07	< 10
25.07 a 25.08	ND
26.08 a 21.09	ND
22.09 a 30.09	ND
01.10 a 14.10	10
Total de amostras contaminadas	04

ND = Não detectada

TABELA 6 - Ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, em diversas épocas, proveniente da empresa "E", Guararapes (SP), no ano de 1986 (média semanal).

Épocas de coleta	EMPRESA "E"
	Guararapes
12.05 a 18.05	10
19.05 a 25.05	10
26.05 a 01.06	10
02.06 a 08.06	10
09.06 a 15.06	ND
16.06 a 22.06	<10
23.06 a 29.06	10
30.06 a 06.07	ND
07.07 a 13.07	13
14.07 a 20.07	ND
21.07 a 27.07	ND
11.08 a 17.08	<10
18.08 a 24.08	ND
25.08 a 31.08	<10
01.09 a 07.09	ND
08.09 a 14.09	ND
15.09 a 21.09	ND
22.09 a 29.09	ND
30.09 a 05.10	ND
06.10 a 12.10	10
13.10 a 19.10	10
20.10 a 26.10	<10
27.10 a 01.11	<10
Total de amostras contaminadas	13

ND = Não detectada

TABELA 7 - Variação na incidência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, proveniente de diversas regiões, em função do tempo, no ano de 1986.

M e s	R E G I Õ E S															
	Arara- quara		Paraguau Paulista		Londrina		Maringá ¹		Bauru		Maringá ²		Campinas		Guararapes	
	N	n	N	n	N	n	N	n	N	n	N	n	N	n	N	n
Abril	01	00	01	01	-	-	04	04	02	02	03	03	02	01	03	03
Mai	04	02	04	04	-	-	04	04	03	03	04	04	02	01	05	03
Junho	05	04	05	05	03	03	05	05	05	04	05	05	02	01	03	01
Julho	04	01	04	03	04	04	-	-	04	03	04	02	01	00	03	02
Agosto	04	01	04	03	04	03	-	-	04	01	04	03	01	00	05	00
Setem- bro	05	02	05	05	05	04	-	-	05	00	04	02	01	00	04	04
Outu- bro	04	00	02	02	02	02	-	-	02	00	-	-	01	01	-	-
Novem- bro	04	03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	31	13	25	23	18	16	13	13	25	13	24	19	10	04	23	13

N = Nº de amostras analisadas

n = Nº de amostras contaminadas

1 = Região pertencente à empresa "B"

2 = Região pertencente à empresa "C"

(-) = Amostras não enviadas pelas indústrias

TABELA 8 - Ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, proveniente de 5 empresas com 8 indústrias localizadas em 7 regiões e os dados (ordens) apropriados à aplicação do teste de Kruskal-Wallis, no ano de 1986.

E M P R E S A S									
"A"		"B"		"C"		"D"		"E"	
Araraquara	Paraguape Paulista	Londrina	Maringá	Bauru	Maringá	Campinas	Guararapes		
ND (28)	10 (99)	10 (99)	40 (162,5)	40 (162,5)	40 (162,5)	13 (121)	10 (99)		
ND (28)	10 (99)	10 (99)	40 (162,5)	20 (138)	40 (162,5)	ND (28)	10 (99)		
13 (121)	40 (162,5)	27 (152)	40 (162,5)	20 (138)	27 (152)	20 (138)	10 (99)		
13 (121)	40 (162,5)	27 (152)	20 (138)	10 (99)	20 (138)	ND (28)	10 (99)		
ND (28)	20 (138)	27 (152)	20 (138)	10 (99)	40 (162,5)	ND (28)	ND (28)		
13 (121)	10 (99)	10 (99)	20 (138)	10 (99)	20 (138)	< 10 (69)	< 10 (69)		
< 10 (69)	10 (99)	10 (99)	20 (138)	< 10 (69)	< 10 (69)	ND (28)	10 (99)		
< 10 (69)	20 (138)	ND (28)	40 (162,5)	ND (28)	< 10 (69)	ND (28)	ND (28)		
< 10 (69)	16 (126,5)	40 (162,5)	20 (138)	11 (116)	< 10 (69)	ND (28)	13 (121)		
ND (28)	20 (138)	20 (138)	10 (99)	16 (126,5)	10 (99)	10 (99)	ND (28)		
20 (138)	27 (152)	20 (138)	10 (99)	20 (138)	27 (152)		ND (28)		
ND (28)	40 (162,5)	13 (121)	20 (138)	13 (121)	20 (138)		< 10 (69)		
ND (28)	< 10 (69)	ND (28)	40 (162,5)	< 10 (69)	27 (152)		ND (28)		
ND (28)	ND (28)	10 (99)		ND (28)	10 (99)		< 10 (69)		
ND (28)	ND (28)	20 (138)		ND (28)	ND (28)		ND (28)		
< 10 (69)	< 10 (69)	10 (99)		13 (121)	ND (28)		ND (28)		

TABELA 8 - Ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, proveniente de 5 empresas com 8 indústrias localizadas em 7 regiões e os dados (ordens) apropriados à aplicação do teste de Kruskal-Wallis, no ano de 1986.

E M P R E S A S						
"A"		"B"		"C"		"E"
Araraquara	Paraguari	Londrina	Maringá	Bauru	Maringá	Campinas
	Paulista					Guararapes
ND (28)	< 10 (69)	10 (99)		ND (28)	40 (162,5)	ND (28)
ND (28)	13 (121)	20 (138)		ND (28)	< 10 (69)	ND (28)
ND (28)	< 10 (69)			ND (28)	ND (28)	ND (28)
ND (28)	10 (99)			ND (28)	< 10 (69)	10 (99)
< 10 (69)	10 (99)			ND (28)	ND (28)	10 (99)
< 10 (69)	< 10 (69)			ND (28)	ND (28)	< 10 (69)
ND (28)	< 10 (69)			ND (28)	10 (99)	< 10 (69)
ND (28)	10 (99)			ND (28)	10 (99)	
ND (28)	< 10 (69)			ND (28)		
ND (28)						
ND (28)						
10 (99)						
10 (99)						
ND (28)						
< 10 (69)						
R ₁ = 1686	R ₂ = 2533	R ₃ = 2040,5	R ₄ = 1838,5	R ₅ = 1832	R ₆ = 2401	R ₇ = 595 R ₈ = 1439

Obs: Os números entre parenteses representam as ordens na classificação conjunta.

R₁, ..., R₈ = soma das ordens de cada indústria. ND = Não detectada

TABELA 9 - Diferenças $|\bar{R}_i - \bar{R}_j|$ em valores absolutos entre pares de médias das somas das ordens atribuídas às indústrias na classificação conjunta das 169 amostras de ocorrência de aflatoxina B₁ (ppb) em farelo de algodão, no ano de 1986.

Indústrias	$ \bar{R}_i - \bar{R}_j $	d.m.s. (*)
(Araraquara, Paraguaçu Paulista)	46,93	41,17
(Araraquara, Londrina)	58,97	45,38
(Araraquara, Maringá ¹)	87,03	50,60
(Araraquara, Bauru)	18,89	41,64
(Araraquara, Maringá ²)	45,65	41,64
(Araraquara, Campinas)	5,11	55,70
(Araraquara, Guararapes)	8,17	42,15
(Paraguaçu Paulista, Londrina)	12,04	47,34
(Paraguaçu Paulista, Maringá ¹)	40,10	52,37
(Paraguaçu Paulista, Bauru)	28,04	43,32
(Paraguaçu Paulista, Maringá ²)	1,28	43,77
(Paraguaçu Paulista, Campinas)	41,82	57,30
(Paraguaçu Paulista, Guararapes)	38,76	44,25
(Londrina, Maringá ¹)	28,06	55,74
(Londrina, Bauru)	40,08	47,34
(Londrina, Maringá ²)	13,32	47,75
(Londrina, Campinas)	53,86	50,40
(Londrina, Guararapes)	50,80	48,20
(Maringá ¹ , Bauru)	68,14	52,37
(Maringá ¹ , Maringá ²)	41,38	52,74

TABELA 9 - Diferenças $|\bar{R}_i - \bar{R}_j|$ em valores absolutos entre pares de médias das somas das ordens atribuídas às indústrias na classificação conjunta das 169 amostras de ocorrência de aflatoxina B_1 (ppb), em farelo de algodão, no ano de 1986.

Indústrias	$ \bar{R}_i - \bar{R}_j $	d.m.s. (*)
(Maringã ¹ , Campinas)	81,92	64,42
(Maringã ¹ , Guararapes)	78,86	53,14
(Bauru, Maringã ²)	26,76	43,77
(Bauru, Campinas)	13,78	57,30
(Bauru, Guararapes)	10,72	44,25
(Maringã ² , Campinas)	40,54	57,64
(Maringã ² , Guararapes)	37,48	44,69
(Campinas, Guararapes)	3,06	58,01

(*) d.m.s. = Diferença mínima significativa a uma "taxa de erro experimental" $\alpha = 0,05$, pelo teste de Comparações Múltiplas.

1 = Região pertencente à empresa "B".

2 = Região pertencente à empresa "C".

Dentre os fatores que podem ter contribuído para a diferença de contaminação do farelo de algodão entre as regiões, o climático deve ter sido o preponderante. O teor de umidade da matéria-prima ao chegar nas fábricas, provavelmente deve ter sido diferente de uma região para outra. A temperatura e o teor de umidade relativa do ar, as condições e o tempo de armazenamento, também devem ter influenciado na incidência de contaminação assim como o ataque de

insetos tanto no campo como no armazém, como resultado da diferença de controle de pragas pelos agricultores.

Segundo ABRAHÃO*, se a colheita do algodão for realizada em época de muita chuva a possibilidade de contaminação é muito grande. O pico máximo de colheita do algodão ocorre entre os meses de março e abril, época em que a temperatura e as chuvas tendem a diminuir, porém, isso é muito variável de um ano para outro e de uma região para outra, podendo ocorrer chuvas ocasionais.

Os mais altos níveis de contaminação do algodão com aflatoxina ocorrem no Sudeste dos Estados Unidos, onde as condições climáticas, como temperatura e umidade, são favoráveis ao fungo para produção de aflatoxinas (MARSH et alii, 1973; WESSELL & STOLOFF, 1973; VELASCO et alii, 1975; RUSSELL et alii, 1976; HAMSA & AYRES, 1977; RUSSELL & LEE, 1985; LEE et alii, 1986; MYCOTOXINS and food safety, 1986). Naquela região, ocorre altas temperaturas e, por causa da aplicação de práticas de irrigação, a umidade do ar é elevada. Estas características são muito semelhantes e algumas das condições observadas no Brasil em determinadas épocas do ano.

Entretanto, mesmo sabendo-se que todos esses fatores possam ter influenciado as variações que ocorreram no teor de aflatoxina B₁ entre as regiões, é difícil indicar com precisão qual a causa específica da maior incidência da aflatoxina em Maringá. Mesmo assim, acredita-se que o teor de umidade da matéria-prima recebida pela fábrica localizada na região de Maringá deve ter sido elevado, podendo este fator ser indicado como o principal responsável pela diferença encontrada na ocorrência da aflatoxina entre as regiões.

*ABRAHÃO, J.T.M. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ/USP) Comunicação pessoal, 1987.

Sabe-se, com base nos trabalhos de ASHWORTH JUNIOR & McMEANS (1966), WIDSTROM (1979) e KLICH & LEE (1982), que o campo é o principal local de contaminação da cultura algodoeira. Além disso, o teor de umidade da semente de algodão em equilíbrio com a umidade relativa do ambiente é, também, uma variável bastante efetiva no controle da infecção.

WHITTEN & SMITH (1972), estudando o conteúdo de umidade de sementes estocadas, verificaram que a variação de 15,1% para 21,8% é suficiente para aumentar em 10 vezes o teor de aflatoxina.

Segundo FONSECA (s.d.) o nível de umidade ideal para que o farelo possa ser armazenado com segurança, está em torno de 10%. Com este valor de umidade, o desenvolvimento de fungos e a produção de toxinas, com certeza será limitado.

De acordo com estudos realizados, tortas ou farelos contendo teores de até 100 ppb de aflatoxina podem ser utilizados, em proporções que variam de 5 a 15%, nas rações destinadas a determinadas espécies de animais (FAO, 1979). Dentro desta categoria, considerada como ligeiramente positiva, estão enquadradas as amostras de farelo de algodão do presente trabalho contaminadas com aflatoxina B_1 . Assim, pode-se dizer que, embora a toxina B_1 , tenha sido encontrada na maioria dos farelos analisados (67,45%), estes podem ser usados em proporções normais na composição de rações, porque o nível de contaminação do material foi baixo nesta safra.

Segundo as normas brasileiras (FONSECA, 1983), o limite de 30 ppb é o máximo permitido para as aflatoxinas $B_1 + G_1$, em alimentos para consumo humana. Isto significa que, dentro desta categoria, as amostras com 40 ppb de

aflatoxina B_1 , o que representa 12,30% do total contaminado, não devem ser utilizadas. O restante, 87,70% contém teores de aflatoxina B_1 variando de menos de 10 a 27 ppb e pode ser aproveitado com esta finalidade.

A determinação da ocorrência de aflatoxinas em trabalhos semelhantes já foi efetuada por LOOSMORE et alii (1964), que constatarem a presença de aflatoxina B_1 em elevados níveis de toxidez.

Os resultados da análise do tipo de aflatoxina presente em farelo de algodão revelaram, como já foi dito anteriormente, que a B_1 foi a única do grupo encontrada em todas as amostras. Estes resultados diferem dos obtidos por MAYNE et alii (1966). Os autores, ao estudarem a ocorrência de aflatoxinas em sementes e farelo de algodão encontraram com maior frequência as aflatoxinas B_1 e B_2 .

Em trabalho mais recente PONS JUNIOR et alii (1980), encontraram também os metabólitos B_1 e B_2 em farelo de algodão. Em contrapartida, ENGEBRECHT et alii (1965), em suas pesquisas, constatarem apenas a B_1 em 4 das 8 amostras examinadas, em quantidades variando de 19 a 186 ppb.

SCHNEIDER et alii (1972), trabalhando em pesquisas semelhantes na Guatemala, na Nicaragua e em El Salvador, demonstraram que em todas as regiões pesquisadas a aflatoxina B_1 foi a única encontrada em todas as amostras contaminadas.

Sabe-se, porém, segundo os trabalhos de MAYNE et alii (1966), GOLDBLATT (1971) e ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (1983), que as aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 podem ocorrer concomitantemente ou não. O tipo e o teor de toxina no alimento ou na ração podem ser influenciados por vários fatores, como o ambiente, o substrato e a linhagem do fungo. Em adição a estas causas, o trabalho realizado por

MAYNE (1966), também considera o gossipol como um agente que pode modificar a produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus flavus*.

Pelos relatos de HARTLEY et alii (1963) e CUCULLU et alii (1966), as aflatoxinas B₁ e B₂ são normalmente produzidas na proporção de 40:1. Com base neste dado, pode-se também justificar que a presença de apenas uma toxina, nos farelos analisados, seja devido ao baixo índice de contaminação do material.

6. CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos, concluiu-se que:

- 1) das 169 amostras de farelo de algodão da safra de 1986, 67,45% estavam contaminadas;
- 2) o nível de contaminação foi pequeno, pois o teor máximo encontrado foi de 40 ppb e as amostras que apresentaram este valor representaram apenas 12,30% de todo o material contaminado;
- 3) há evidências, pela análise estatística de que houve diferença entre as regiões estudadas, tendo Araraquara (SP), Campinas (SP) e Bauru (SP) apresentado a menor ocorrência e os teores mais baixos de aflatoxina B_1 , enquanto Maringá (PR) apresentou a maior ocorrência e os mais elevados teores de aflatoxina B_1 ;
- 4) não houve predominância da incidência de aflatoxina B_1 em qualquer época durante toda a safra;
- 5) a única aflatoxina encontrada foi a B_1 .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. T. M.; D'ARCE, M. A. B. R.; FONSECA, H. Algodão-produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, s.d. 96 p. (Série extensão agroindustrial, 2)
- ALBERT, M. E. & DAVIDSON, C. S. Mycotoxins: a possible cause of primary carcinoma of the liver. The American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, 46 (3): 325-9, 1969.
- ALLCROFT, R. & LEWIS, G. Groundnut toxicity in cattle: experimental poisoning of calves and a report on clinical effects in older cattle. The Veterinary Record, London, 75 (19): 487-94, 1963.
- ALLCROFT, R.; ROGERS, H.; LEWIS, G.; NABNEY, J.; BEST, P. E. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". Nature, London, 209 (5019): 154-5, 1966.
- ASHWORTH JUNIOR, L. J. & McMEANS, J. L. Association of *Aspergillus flavus* and aflatoxins with a greenish yellow fluorescence of cotton seed. Phytopathology, St. Paul, 56 (9): 1104-5, 1966.

ASHWORTH JUNIOR, L. J.; McMEANS, J. L.; BROWN, C. M. Infection of cotton by *Aspergillus flavus*: the influence of temperature and aeration. Phytopathology, St. Paul, 59 (5): 669-73, 1969a.

ASHWORTH JUNIOR, L. J.; McMEANS, J. L.; BROWN, C. M. Infection of cotton by *Aspergillus flavus*: time of infection and the influence of fiber moisture. Phytopathology, St. Paul, 59 (5): 383-5, 1969b.

ASHWORTH JUNIOR, L. J.; McMEANS, J. L.; HOUSTON, B. R.; WHITTEN, M. E.; BROWN, C. M. Mycoflora, aflatoxins and free fatty acids in California cottonseed during 1967-1968. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 48 (3): 129-33, 1971a.

ASHWORTH JUNIOR, L. J.; McMEANS, J. L.; PYLE, J. L.; BROWN, C. M.; OSGOOD, J. W.; PONTON, R. E. Aflatoxins in cotton seeds: influence of weathering on toxin content of seed and on a method for mechanically sorting seed lots. Phytopathology, St. Paul, 58 (1): 102-7, 1968.

ASHWORTH JUNIOR, L. J.; RICE, R. E.; McMEANS, J. L.; BROWN, C. M. The relationship of insects to infection of cotton bolls by *Aspergillus flavus*. Phytopathology, St. Paul, 61: 488-93, 1971b.

ASPLIN, F. D. & CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. The Veterinary Record, London, 73 (46): 1215-9, 1961.

BANKS JUNIOR, W. L.; ALLISON, J. B.; WANNEMACHER JUNIOR, R. W. Supplementation of wheat gluten protein. Journal of Nutrition, Bethesda, 82: 61-6, 1964.

BLOUNT, W. P. "Disease" of turkey poults. The Veterinary Record, London, 72 (38): 786, 1960.

BOLLENBACHER, K. & MARSH, P. B. A preliminary note on a fluorescent fiber condition in raw cotton. The Plant Disease Reporter, Washington, 38 (6): 375-9, 1954.

BRAZZEL, J. R. The pink bollworm as a factor in cotton boll rots. The Plant Disease Reporter, Washington, 39 (7): 583-4, 1955.

BRESSANI, R.; ABURTO, A.; GÓMEZ-BRENES, R.; BRAHAM, E. Efecto del gosispol libre de diferentes harinas de algodón sobre el crecimiento de ratas y niveles de lisina libre y gosispol libre en órganos, músculo y suero de animales. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, Caracas, 25 (1): 47-66, 1975.

BUCKLE, T. S. de. & SILVA, G. S. Aislado de proteínas a partir de tortas de algodão colombianas. Revista del Instituto de Investigaciones Tecnológicas, Bogotá, 95: 17-31, 1975.

CAMARGO, C. R. de. O. Efeito da interação das condições de extrusão e da amônia e/ou metilamina na degradação de aflatoxina em farinhas de arroz. Campinas, 1986. 133 p. [Doutoramento - UNICAMP].

CAMPBELL, T. C. & STOLOFF, L. Implication of mycotoxins for human health. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 22 (6): 1006-15, 1974.

CAMPOS, H. Estatística experimental não-paramétrica. 4. ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1983. 349 p.

CARNAGHAN, R. B. A. & SARGEANT, K. The toxicity of certain groundnut meals to poultry. The Veterinary Record, London, 73 (29): 726-7, 1961.

CARVALHO, V. D. de. & CHALFOUN, S. M. Aflatoxinas em amendoim: como evitar contaminações. Belo Horizonte, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 1984. 4 p. (Pesquisando, 127)

CHRISTENSEN, C. M. Deterioration of stored grain by fungi. Botanical Review, New York, 23: 108-34, 1957.

CLEGG, F. G. & BRYSON, H. An outbreak of poisoning in store cattle attributed to Brazilian groundnut meal. The Veterinary Record, London, 74 (37): 992-4, 1962.

CLIFFORD, J. I. & REES, K. R. The action of aflatoxin B₁ on the rat liver. The Biochemical Journal, London, 102 (1): 65-75, 1965.

COOMES, T. J. & FEUELL, A. J. Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnut materials. London, Tropical Products Institute, 1965. 24 p. (TPI Report, G 13)

COSTA, S. I. da. Aflatoxina. Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 12: 27-36, 1967.

CUCULLU, A. F.; LEE, L. S.; MAYNE, R. Y.; GOLDBLATT, L. A. Determination of aflatoxins in individual peanuts and peanut sections. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 43 (2): 89-92, 1966.

- CUCULLU, A. F.; PONS JUNIOR, W. A.; GOLDBLATT, L. A. Fast screening method for detection of aflatoxin contamination in cottonseed products. Journal of the Association of Official Analytical Chemistry, Washington, 55 (5): 1114-9, 1972.
- DAVIDSON, C. S. Nutrition, geography, and liver diseases. The American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, 23 (4): 427-36, 1970.
- DE IONGH, H.; VLES, R. O.; VAN PELT, J. G. Milk of mammals fed on aflatoxin-containing diet. Nature, London, 202 (4931): 466-7, 1964.
- DUTTON, M. F. & HEATHCOTE, J. G. Two new hydroxy aflatoxins. The Biochemical Journal, London, 101 (2): 21P-2P, 1966.
- EDDS, G. T. Acute aflatoxicosis: a review. Journal of American Veterinary Medical Association, Schaumburg, 162 (4): 304-9, 1973.
- ELIAS, L. G. & BRESSANI, R. Estudio comparativo de diferentes métodos para evaluación del valor proteico de harinas de semilla de algodón. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, Caracas, 3 (19): 279-307, 1969.
- ENGEBRECHT, R. H.; AYRES, J. L.; SINNHUBER, R. O. Isolation and determination of aflatoxin B₁ in cottonseed meals. Journal of the Association of Official Analytical Chemistry, Washington, 48 (4): 815-7, 1965.
- FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Recommended practices for the prevention of mycotoxins in food, feed and their products. Roma, 1979. 71 p. (Food and nutrition paper, 10)

- FARAG, R. S.; EL-LEITHY, M. A.; BASYONY, A. E.; DAN, Z. Y.
Effects of varied substrates on aflatoxin production by
A. parasiticus. Journal of the American Oil Chemists'
Society, Chicago, 63 (8): 1024-6, 1986.
- FONSECA, H. Aflatoxina em amendoim. São Paulo, Secretaria
de Agricultura e Abastecimento/Coordenadoria de Assistên-
cia Técnica Integral, 1983. 12 p. (Documento técnico,
46)
- FONSECA, H. Contribuição ao estudo da aflatoxina no amendoim
(*Arachis hypogaea* L.) da colheita à industrialização. Pi-
racicaba, 1969. 81 p. [Livre Docência - ESALQ].
- FONSECA, H. Levantamento do teor de aflatoxina em tortas e
farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São
Paulo. Piracicaba, 1968. 64 p. [Doutoramento - ESALQ].
- FONSECA, H. Ocorrência de aflatoxina em alimentos. In:
SEMINÁRIO LATINO AMERICANO SOBRE TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS,
Campinas, 1983. Anais. Campinas, Universidade Estadual
de Campinas, 1984. p. 170-80.
- FONSECA, H. Tecnologia de transformação. In: ABRAHÃO, J. T.
M.; D'ARCE, M. A. B. R.; FONSECA, H. Algodão-produção,
pré-processamento e transformação agroindustrial. São
Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecno-
logia, s.d. p. 57-96. (Série extensão agroindustrial, 2)
- FRANK, H. K. Importância das micotoxinas no preparo dos
alimentos nos países tropicais. Boletim do Instituto de
Tecnologia de Alimentos, Campinas, 56: 79-91, 1978.

FRAYSSINET, C. & LAFARGE, C. Action de l'aflatoxine sur la cellule hépatique du rat. Cahiers de Nutrition et de Dietétique, Paris, 5 (2): 67-9, 1970.

GIBSON, W. W. C. Groundnut toxicity: *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. The Veterinary Record, London, 74 (32): 884, 1962.

GOLDBLATT, L. A. Control and removal of aflatoxin. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 48 (10): 605-10, 1971.

GRAY, W. V. Groundnut toxicity. The Veterinary Record, London, 73 (35): 865, 1961.

HAMSA, T. A. P. & AYRES, J. C. Factors affecting aflatoxin contamination of cottonseed. I. Contamination of cottonseed with *Aspergillus flavus* at harvest and during storage. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 54 (6): 219-24, 1977.

HARTLEY, R. D.; NESBITT, B. F.; O'KELLY, J. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature, London, 198 (4885): 1056-8, 1963.

HENDRICKSE, R. G.; COULTER, J. B. S.; LAMPLUGH, S. M.; MACFARLANE, S. B. J.; WILLIAMS, T. E.; OMER, M. I. A.; SULIMAN, G. I. Aflatoxins and kwashiorkor: a study in Sudanese children. British Medical Journal, London, 285: 843-5, 1982.

HESELDTINE, C. W.; SHOTWELL, O. L.; ELLIS, J. J.; STUBBLEFIELD, R. D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Bacteriology Reviews, 30 (4): 795-805, 1966.

KIYOMOTO, R. K. & ASHWORTH JUNIOR, L. J. States of cotton boll rot in the San Joaquin Valley of California following simulated pink bollworm injury. Phytopathology, St. Paul, 64 (11): 259-60, 1974.

KLICH, M. A. & LEE, L. S. Seed viability and aflatoxin production in individual cottonseed naturally contaminated with *Aspergillus flavus*. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 59 (12): 545, 1982.

KOLTUN, S. P.; GARDNER JUNIOR, H. K.; DOLLEA, F. G.; RAYNER, E. T. Physical properties and aflatoxin content of individual cateye fluorescent cottonseeds. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 51 (4): 178-80, 1974.

LAFONT, P. Mycotoxins et alimentation. Cahiers de Nutrition et de Dittique, Paris, 5 (2): 45, 1970.

LANCASTER, M. C.; JENKINS, F. P.; PHILIP, M. J. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, London, 192 (16): 1095-6, 1961.

LAPA, M. A. G. Influncia da aflatoxina B₁ sobre a resposta metablica desnutrio proteica. So Paulo, 1983, 75 p. [Doutoramento - Faculdade de Cincias Farmacuticas da USP].

LEE, L. S. & CUCULLU, A. F. Aflatoxin-negative cottonseeds in bright, greenish yellow fluorescent seed locks. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 55 (7): 591, 1978.

- LEE, L. S.; LEE JUNIOR, L. V.; RUSSELL, T. E. Aflatoxin in Arizona cottonseed: field inoculation of bolls by *Aspergillus flavus* spores in wind-driven soil. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 63 (4): 530-2, 1986.
- LEE, L. S. & RUSSELL, T. E. Distribution of aflatoxin-containing cottonseed within intact locks. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 58 (1): 27-9, 1981.
- LEE, L. S.; YATSU, L. Y.; GOLDBLATT, L. A. Stable basic lead soaps of alpha-disubstituted carboxylic acids. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 44 (5): 331-2, 1967.
- LOOSMORE, R. M.; ALLCROFT, R.; TUTTON, E. A.; CARNAGHAN, R. B. A. The presence of aflatoxin in a sample of cottonseed cake. The Veterinary Record, London, 76 (2): 64-5, 1964.
- LOOSMORE, R. M. & HARDING, J. D. J. A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. The Veterinary Record, London, 73 (49): 1362-4, 1961.
- LUKEFAHR, M. J. & MARTIN, D. F. Evaluation of damage to lint and seed of cotton caused by the pink bollworm. Journal of Economic Entomology, Baltimore, 56 (5): 710-3, 1963.
- MALLOZZI, M. A. B. Detecção de aflatoxina em rações animais. Síntese, Rio de Janeiro, 6: 20-30, 1984.
- MANN, T. B. "Disease" of turkey poults. The Veterinary Record, London, 72 (35): 715, 1960.

MARSH, P. B.; SIMPSON, M. E.; CRAIG, G. O.; DONOSO, J.;

RAMEY JUNIOR, H. H. Occurrence of aflatoxin in cottonseeds at harvest in relation to location of growth and field temperatures. Journal of Environmental Quality, Madison, 2: 276-81, 1973.

MARSH, P. B. & TAYLOR, E. E. The geographical distribution of fiber containing fluorescent spots associated with *Aspergillus flavus* in the United States cotton crop of 1957. The Plant Disease Reporter, Washington, 42: 1368-71, 1958.

MATTIL, K. F.; NORRIS, F. A.; STIRTON, A. J.; SWERN, D.

Bailey's industrial oil and fat products. 3. ed. New York, Wiley, 1964. 1103 p.

MAYNE, R. Y.; PONS JUNIOR, W. A.; FRANZ JUNIOR, A. O.;

GOLDBLATT, L. A. Elaboration of aflatoxin on cottonseed products by *Aspergillus flavus*. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 43 (4): 251-3, 1966.

McMEANS, J. L. & ASHWORTH JUNIOR, L. J. Preharvest occurrence of *Aspergillus flvus* and aflatoxins in California cottonseed. Phytopathology, St. Paul, 56 (8): 889, 1966.

McMEANS, J. L.; ASHWORTH JUNIOR, L. J.; PONS JUNIOR, W. A.

Aflatoxins in hull and meats of cottonseeds. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 45 (8): 575-6, 1968.

McMEANS, J. L. & BROWN, C. M. Aflatoxins in cottonseed as affected by the pink bollworm. Crop Science, Madison, 15: 865-6, 1975.

MONCADA, F. R. & GUTIÉRREZ, C. L. Harina de torta de algodão em formulaciones de algunos alimentos populares. Revista del Instituto de Investigaciones Tecnológicas, Bogotá, 118: 33-50, 1979.

MUSTAKAS, G. C.; GRIFFIN, E. L.; ALLEN, L. E.; SMITH, O. B. Production and nutritional avaliation. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 41 (9): 607-14, 1964.

MYCOTOXINS and food safety. Food Technology, Chicago, 40 (5): 59-66, 1986.

NAKAMURA, H. Aflatoxina. Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 15: 17-27, 1968.

NEWBERNE, P. M. Chronic aflatoxicosis. Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, 163 (11): 1262-7, 1973.

NORTHOLT, M. D. & BULLERMAN, L. B. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. Journal of Food Protection, Ames, 45 (6): 519-26, 1982.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Criterios de salud ambiental 11 - micotoxinas. México, 1983. 131 p. (Publicación científica, 453).

PIER, A. C. An overview of the mycotoxicoses of domestic animals. Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, 163 (11): 1259-61, 1973.

PLATONOW, N. Effect of prolonged feeding of toxic groundnut meal in mice. The Veterinary Record, London, 76 (21): 589-90, 1964.

PONS JUNIOR, W. A.; CUCULLU, A. F.; FRANZ JUNIOR, A. O.; GOLDBLATT, L. A. Improved objective fluorodensitometric determination of aflatoxins in cottonseed products. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 45 (10): 694-9, 1968.

PONS JUNIOR, W. A.; CUCULLU, A. F.; LEE, L. S.; ROBERTSON, J. A.; FRANZ, A. O.; GOLDBLATT, L. A. Aflatoxins - determination of aflatoxins in agricultural products: use of aqueous acetone for extraction. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 49 (3): 554-62, 1966.

PONS JUNIOR, W. A.; LEE, L. S. & SOTOLOFF, L. Revised method for aflatoxins in cottonseed products, and comparison of thin layer and high performance liquid chromatography determinative steps: collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemistry, Washington, 63 (4): 889-906, 1980.

RICHMOND, J. W.; SUTCLIFFE, N. H.; DANIELS, N. W. R.; RUSSELL-EGGITT, P. W.; COPPOCK, J. B. M. Factors other than groundnut in the production of aflatoxin. The Veterinary Record, London, 74 (35): 962, 1962a.

RICHMOND, J. W.; SUTCLIFFE, N. H.; DANIELS, N. W. R.; RUSSELL-EGGITT, P. W.; COPPOCK, J. B. M. Factors other than groundnut relating to "turkey X disease". The Veterinary Record, London, 74 (18): 544-5, 1962b.

ROHR, R. Óleos e gorduras vegetais - seus subprodutos protéicos. 4. ed. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1978. 190 p.

RUSSELL, T. E. & LEE, L. S. Effect of modular storage of Arizona seed cotton on levels of aflatoxins in seed. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 62 (3): 515-7, 1985.

RUSSELL, T. E.; WATSON, T. F.; RYAN, G. F. Field accumulation of aflatoxin in cottonseed as influenced by irrigation termination dates and pink bollworm infestation. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 31 (5): 711-3, 1976.

SALUNKHE, D. K.; WU, M. T.; DO, J. Y.; MAAS, M. R. Mycotoxins in foods and feeds. In: GRAHAM, H. D. The safety of foods. 4. ed. Westport, AVI, 1982. p. 198-264.

SANDERS, T. H.; DAVIS, N. D.; DIENER, U. L. Effects of carbon dioxide, temperature, and relative humidity on production of aflatoxin in peanuts. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 45: 683-5, 1968.

SARGEANT, K.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R. B. A.; ALLCROFT, R. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. The Veterinary Record, London, 73 (46): 1219-23, 1961.

SCHINDLER, A. F.; PALMER, J. G.; EISENBERG, W. V. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. Applied Microbiology, Washington, 15 (5): 1006-9, 1967.

- SCHINDLER, A. F.; PALMER, J. G.; EISENBERG, W. V. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* at various temperatures. Phytopathology, St. Paul, 56 (8): 899, 1966.
- SCHNEIDER, S.; LEON, R. de.; GARCIA-PRENDES, M.; ROLZ, C. Determination of aflatoxin and aflatoxin-producing cultures in recently ginned cottonseed in Central America. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 49 (28): 700-1, 1972.
- SCHROEDER, H. W. & HEIN JUNIOR, H. Effect of diurnal temperature cycles on the production of aflatoxin. Applied Microbiology, Washington, 16 (7): 988-90, 1968.
- SGARBIERI, V. C. Aflatoxinas - importância em tecnologia de alimentos e nutrição. Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 18: 23-82, 1969.
- SMITH, K. M. "Disease" of turkey poults. The Veterinary Record, London, 72 (32): 652, 1960.
- SPORN, M. B.; DINGMAN, C. W.; PHELPS, H. L.; WOGAN, G. N. Aflatoxin "B₁": binding to DNA in vitro and alteration of RNA metabolism in vivo. Science, Washington, 151 (3717): 1539-41, 1966.
- STEVENS, A. J.; SAUNDERS, C. N.; SPENCE, J. B.; NEWNHAM, A. G. Investigations into "disease" of turkey poults. The Veterinary Record, London, 72 (31): 627-8, 1960.
- STOLOFF, L. Aflatoxin control; past and present. Journal of the Association of Official Analytical Chemistry, Washington, 63 (5): 1067, 73, 1980.

- SWARBRICK, O. Disease of turkey poults. The Veterinary Record, London, 72 (33): 671, 1960.
- TAFURI, M. L. & RODRIGUES, M. T. Subprodutos das indústrias de óleos na alimentação animal. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 10 (119): 43-8, 1984.
- TANGO, J. S. Aflatoxina. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 37: 37-95, 1974.
- TANGO, J. S. Industrialização do caroço de algodão e dos seus produtos. Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 4: 1-19, 1965; Tecnologia de Alimentos e Bebidas, São Paulo, 2 (1): 23-33, 1966.
- TANGO, J. S. Gossipol. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 34: 1-31, 1973.
- TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE. A method for the detection of aflatoxin in groundnuts and groundnut products. London, TPI, 1962. 01 p. (TPI Report, 30)
- VELASCO, J.; WHITAKER, T. B.; WHITTEN, M. E. Sampling cottonseed lots for aflatoxin contamination. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 52 (6): 191-5, 1975.
- WANNOP, C. C. Disease of turkey poults. The Veterinary Record, London, 72 (33): 671-2, 1960.
- WESSEL, J. R. & STOLOFF, B. S. Regulatory surveillance for aflatoxin and other mycotoxins in feeds, meat, and milk. Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, 163 (11): 1284-7, 1973.

WHITTEN, M. E. & SMITH, L. L. Effect of storage conditions on increase in aflatoxins in cottonseed: a small lot study. Journal of the American Oil Chemists' Society, Chicago, 49 (10): 596-7, 1972.

WIDSTROM, N. W. The role of insects and other plant pests in aflatoxin contamination of corn, cotton and peanuts - a review. Journal of Environmental Quality, Madison, 8 (1): 5-11, 1979.

WOGAN, G. N. Aflatoxin risks and control measures. Federation Proceedings, Bethesda, 27 (8): 932-8, 1968.

WOGAN, G. N. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bacteriological Reviews, Washington, 30 (2): 460-70, 1966.