**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE TRIAGEM
PARA ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO DO MILHO, POR
AFLATOXINAS, ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA
AMARELO-ESVERDEADA BRILHANTE
(BGYF - Bright Greenish Yellow Fluorescence)**

MARÍA ESTELA TOLEDO PALOMINO

Engenheira Química

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 Ciências, Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Julho - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - campus "Luiz de Queiroz"/USP

Toledo Palomino, Maria Estela

Avaliação da utilização do método de triagem para análise da contaminação do milho, por aflatoxinas, através da fluorescência amarelo-esverdeada brilhante (BGYF - Bright Greenish Yellow Fluorescence) / Maria Estela Toledo Palomino. - - Piracicaba, 1997.

52 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Aflatoxinas em milho 2. Análise físico - química 3. Fluorescência 4. Milho
(contaminação) 5. Título

CDD 633.15
615.95292

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE TRIAGEM PARA
ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO DO MILHO, POR AFLATOXINAS,
ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA AMARELO-ESVERDEADA
BRILHANTE (BGYF - Bright Greenish Yellow Fluorescence)**

MARÍA ESTELA TOLEDO PALOMINO

Aprovada em: 15. 08. 97

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Homero Fonseca

ESALQ/USP

Prof. Dr^a Marta Hiromi Taniwaki

ITAL

Prof. Dr. Murilo Graner

ESALQ/USP

Prof. Dr. HOMERO FONSECA
Orientador

Aos meus pais,

**Que sempre me incentivaram,
e em todas as horas me apoiaram**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Homero Fonseca, Professor do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ/USP, pela orientação, sugestões e oportunidade de desenvolver este estudo;

Aos Eng^{os} Agr^{os} Eduardo Micotti da Glória e Maria Antônia Calori Domingues pela contribuição na elaboração deste projeto, bem como na discussão dos resultados;

À Biomédica Ivani Valarini Zambello e à acadêmica Carolina Márques pela amizade e auxílio nas atividades deste projeto de pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro indispensável à realização desta pesquisa;

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudo do Convênio PERÚ - PEC/PG, para a realização do curso;

Às indústrias participantes, pela colaboração na coleta das amostras;

À professora Sônia de Stefano Piedade pelo apoio na análise estatística;

À bibliotecária Kátia Maria de Andrade Ferraz pela atenção dedicada à revisão da bibliografia;

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ/USP, pelos ensinamentos e amizade;

Aos meus pais, Raúl e Peregrina, que apesar da distância sempre me alentaram na continuação dos meus estudos;

Aos professores da Faculdade de Engenharia Química da Universidad Nacional del Callao, Perú, que me apoiaram na iniciação dos meus estudos de Mestrado;

E a todas as pessoas que me incentivaram ou de algum modo contribuíram para a execução deste projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Aflatoxinas e sua relação com a saúde.....	5
3.2. Ocorrência de aflatoxina no milho	8
3.3. A técnica da fluorescência BGY	12
3.3.1. Fundamentos da técnica.....	12
3.3.2. A fluorescência BGY no milho	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Material.....	19
4.2. Metodologia.....	19
4.2.1. Amostragem.....	21
4.2.1.1. Amostras provenientes da indústria	21
4.2.1.2. Amostras produzidas no laboratório.....	21
4.2.2. Técnica BGYF empregada pelas indústrias	22

4.2.3. Técnica BGYF padronizada.....	22
4.2.4. Técnica BGYF padronizada empregada em amostra triturada	23
4.2.5. Método da análise físico-química	23
4.2.6. Avaliação dos resultados.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Amostras falso positivas	25
5.2. Amostras falso negativas.....	36
6. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 Aparelho para inspeção de amostras de milho pelo teste da fluorescência BGY, para detecção de aflatoxina, desenvolvido por Barabolak et al.(1978).....15
- 2 Metodologia utilizada neste trabalho para avaliação da eficiência da técnica de fluorescência BGY empregada em algumas indústrias do Brasil e da técnica BGYF padronizada.....20

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Critérios recomendados e utilizados por várias companhias para seleção do milho pelo método da fluorescência BGY para detecção da contaminação da aflatoxina e % de erro em relação ao método Neogen.....	18
2 Parâmetros utilizados pelas indústrias na técnica BGYF para detectar presumível contaminação por aflatoxinas.....	22
3 Número de amostras falso-positivas apresentadas pelas diferentes técnicas BGYF empregadas.....	26
4 Número de pontos fluorescentes adotado como critério de rejeição pelas indústrias e a equivalência em 4,5kg de amostra.....	27
5 Distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes encontrados pela técnica BGYF padronizada (amostra sem triturar) e o nível de aflatoxinas determinado pela análise físico-química.....	29
6 Distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes encontrados na fração de grãos quebrados das amostras trituradas e o nível de aflatoxina determinado pela análise físico-química.....	31

7.. Número de amostras provenientes das indústrias e o nível de	32
aflatoxinas que apresentaram, em $\mu\text{g/kg}$	
8 Número de resultados falso-positivos apresentados pelas diferentes técnicas BGYF nas amostras produzidas no laboratório.....	32
9 Distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes encontrados pela técnica BGYF padronizada em amostra sem triturar e o nível de aflatoxinas determinado pela análise físico-química nas amostras produzidas no laboratório.....	34
10 Distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes encontrados na fração de grãos quebrados das amostras trituradas e o nível de aflatoxina nas amostras produzidas no laboratório.....	35
11. Número de amostras produzidas no laboratório e o nível de.....	36
aflatoxinas que apresentaram, em $\mu\text{g/kg}$	
12 Número de amostras falso-negativas apresentadas pelas diferentes técnicas BGYF empregadas.....	37
13 Número de amostras falso-negativas apresentadas pela técnica BGYF padronizada (amostra sem triturar e amostra triturada) nas amostras produzidas no laboratório.....	39
14 Contaminação apresentada pelas amostras falso-negativas nas amostras produzidas no laboratório.....	40

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE TRIAGEM PARA
ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO DO MILHO, POR AFLATOXINAS,
ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA AMARELO-ESVERDEADA BRILHANTE
(BGYF- Bright Greenish Yellow Fluorescence)**

Autora: MARIA ESTELA TOLEDO PALOMINO

Orientador: Prof. Dr. HOMERO FONSECA

RESUMO

Os resultados da técnica da fluorescência amarelo-esverdeada brilhante (BGYF) aplicada por algumas indústrias alimentícias e de rações como método de triagem na avaliação de lotes de milho provavelmente contaminados com aflatoxina, em 438 amostras de milho, foram comparados com os resultados da técnica BGYF padronizada aplicada em laboratório antes e após trituração dos grãos e, também, com os resultados da análise físico-química das mesmas. Também foram produzidas 41 amostras no laboratório, as quais foram visualizadas pelas diferentes técnicas BGYF e analisadas pela análise físico-química. Observou-se que o critério de rejeição foi muito importante na geração de amostras positivas e, portanto, influenciar na performance da técnica BGYF. O critério de rejeição de 1 ou mais pontos fluorescentes na técnica padronizada fez gerar um número de amostras positivas diferente da análise físico-química. Isto não aconteceu com os resultados da técnica das indústrias, onde o número de amostras positivas não foi diferente dos resultados físico-químicos. Por outro lado, duas indústrias apresentaram resultados falso-negativos em sua técnica BGYF, enquanto a

técnica BGYF padronizada que não apresentou. Nas amostras produzidas em laboratório, a visualização pela técnica BGYF padronizada em amostra sem triturar, gerou 4 resultados falso-negativos, uma vez que todas elas apresentaram contaminação acima de 20µg/kg pela análise físico-química. Estas 4 amostras que não apresentaram pontos fluorescentes antes da trituração, depois de serem trituradas apresentaram 24, 46, 57 e 224 pontos. Em função destes resultados, conclui-se que existe a necessidade de se triturar as amostras antes da visualização, pois irá influenciar no critério de rejeição na performance da técnica BGYF.

Palavras chave: Aflatoxina, milho, fluorescência BGY, triagem

**EVALUATION OF UTILIZATION OF A SCREENING METHOD OF
AFLATOXIN CONTAMINATION OF CORN BY THE BRIGHT
GREENISH YELLOW FLUORESCENCE (BGYF)**

Author: MARIA ESTELA TOLEDO PALOMINO

Adviser: Prof. Dr. HOMERO FONSECA

SUMMARY

The results of the bright greenish yellow fluorescence technique (BGYF) from some food and feed industries as a screening method in the evaluation of probably aflatoxin contaminated corn lots in four hundred and thirty eight samples, were evaluated against both laboratory results of BGYF standard technique, before and after cracking of grains and physico-chemical analysis results. Forty one samples produced in laboratory were visualized by the BGYF standard technique and analyzed by physico-chemical analysis. It was observed that the criterion of rejection was very important to yield positive samples and therefore to influence in the BGYF technique performance. The criterion of rejection of one or more fluorescent points in the standard technique makes to produce a number of positive samples different from the physico-chemical analysis. It did not happened with the industry results, in which the number of positive samples was not different from the physico-chemical results. Otherwise, only the industries showed false negative results and the BGYF standard technique did not. In the samples produced in laboratory, the BGYF standard technique visualization before cracking of grains, showed 4 false negative results, since these samples showed contamination over 20 μ g/kg by the physico-chemical analysis. These samples

that not showed fluorescent points before cracking, showed 24, 46, 57 and 224 points after cracking. The results allowed to conclude that it is necessary to crack samples before visualization and the influence of rejection criterion over the BGYF technique performance.

Key words: Aflatoxin, corn, BGYF, screening

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a nível mundial, o milho ocupa o terceiro lugar entre os cereais, em área plantada e em produção, perdendo apenas para o trigo e o arroz. O grande volume produzido mundialmente se deve ao seu valor energético e nutricional, sendo utilizado tanto direta como indiretamente na alimentação humana e de animais. Devido ao seu alto teor de carboidratos, principalmente amido, e de outros componentes, como proteínas, óleos e vitaminas, constitui-se em inestimável matéria-prima para expressiva série de produtos industrializados (Fancelli, 1983).

O grão de milho na pré e pós-colheita é susceptível à contaminação por diversos fungos como *Aspergillus flavus* Link ex Fries e *Aspergillus parasiticus* Speare, os quais são produtores de aflatoxinas (Heathcote, 1984), que são conhecidas por sua ação mutagênica, carcinogênica e teratogênica no ser humano e em vários animais (Bradburn et al., 1993).

Devido aos problemas que podem causar, torna-se de grande importância a detecção e controle de aflatoxinas, nas indústrias de alimentos e rações.

A detecção de aflatoxinas em alimentos e produtos agrícolas pode ser realizada por vários métodos (Shotwell, 1977a): (a) teste rápido presumível, pela inspeção do milho sob luz ultravioleta (365 nm), através da presença de fluorescência BGY para localizar lotes que possam estar contaminados com aflatoxinas; (b) métodos rápidos de triagem, para determinar

a presença ou ausência de toxina em um lote, mas não a sua concentração; (c) métodos quantitativos, que são um pouco mais demorados, para quantificar a aflatoxina no milho. Contudo, para as indústrias, os métodos devem possibilitar a rápida avaliação do material, uma vez que o resultado da análise é imprescindível para aceitação ou rejeição do lote de milho logo no momento da sua chegada à indústria.

Bollenbacher & Marsh (1954) observaram a formação de fluorescência amarelo esverdeada brilhante ("bright greenish yellow" - BGY) em fibras de algodão, incubadas com *Aspergillus flavus*, quando iluminadas com luz ultravioleta (365 nm). Esses autores concluíram que algum fator instável ao calor, existente na fibra, deveria ser necessário na formação da fluorescência, pois a mesma não ocorreu em fibras que foram autoclavadas e depois inoculadas com o fungo, embora o microrganismo tenha apresentado grande desenvolvimento nelas. Os pesquisadores sugeriram que a fluorescência da fibra poderia ser empregada como um teste promissor para localizar sementes de algodão contendo altos níveis de aflatoxina.

Após a associação da fluorescência BGY com a contaminação com aflatoxina em fibras de algodão, Shotwell et al. (1972) observaram que, no milho, tal fluorescência também estava associada à aflatoxina. Grãos danificados, apresentando a fluorescência amarelo esverdeada brilhante ("bright greenish yellow"- BGY) característica, continham altos níveis de aflatoxina B₁ (85.000 a 101.000 µg/kg). Grãos de milho que apresentaram fluorescência branca ou azul não possuíam aflatoxina B₁. A fluorescência BGY desaparecia quando a aflatoxina B₁ era extraída dos grãos.

O método de detecção de aflatoxinas em milho, através da fluorescência amarelo esverdeada brilhante sob luz ultravioleta, é um dos métodos de triagem de cargas de milho mais utilizados pelas indústrias de alimentos e rações no Brasil. Entretanto, modificações arbitrárias realizadas nos procedimentos da técnica BGYF, tais como tamanho da amostra a ser

visualizada, trituração ou não do milho e número de pontos fluorescentes a serem considerados como critério de rejeição, podem afetar a sua confiabilidade.

2. OBJETIVO

Este trabalho visou avaliar a confiabilidade da técnica de detecção de aflatoxina através da visualização de pontos fluorescentes BGY no milho, do modo como é utilizada por algumas indústrias alimentícias e de rações no Brasil, através de comparações desta técnica com a técnica BGYF padronizada e com a análise físico-química.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aflatoxinas e sua relação com a saúde

O problema das aflatoxinas surgiu em 1960 na Inglaterra, quando farelo de amendoim brasileiro (componente das rações), contaminado com *Aspergillus flavus* L., provocou a morte de mais de 100 mil peruzinhos em curto espaço de tempo (Lancaster et al., 1961). Este acontecimento despertou a atenção dos pesquisadores para o problema das micotoxinas (Diener et al., 1987), transformando as aflatoxinas em uma preocupação nas áreas da saúde e comercial, porque elas são contaminantes inevitáveis numa grande variedade de alimentos para consumo humano. No mundo todo, há uma crescente conscientização das sérias conseqüências que a ingestão de níveis elevados de aflatoxinas pode causar à saúde humana e dos animais (FAO, 1993) e mesmo de níveis baixos, continuamente.

Segundo Heathcote (1984), as aflatoxinas são um grupo de componentes tóxicos, relacionados estruturalmente e produzido por algumas linhagens de *Aspergillus flavus* Link ex Fries e *A. parasiticus* Speare, além de outras espécies como *A. nomius* (Frisvad & Thrane, 1996). Sob condições favoráveis de temperatura e umidade, estes fungos podem crescer em certos alimentos, resultando na produção de aflatoxina (Pohland & Wood, 1987).

As principais aflatoxinas produzidas pelos fungos produtores são B₁, B₂, G₁ e G₂. Estas substâncias distinguem-se por sua cor fluorescente sob luz ultravioleta (365 nm): a letra B corresponde a azul (Blue) e G ao verde (Green). Esta propriedade de fluorescência é a base do método físico-químico

para identificação e quantificação das aflatoxinas. Os índices 1 e 2 referem-se à sua mobilidade cromatográfica em camada delgada (World Health Organization, 1979). Cerca de 17 aflatoxinas já foram isoladas. Quando animais são alimentados com rações contendo aflatoxina B₁ e B₂ e excretam, pelo leite, metabólitos denominados de aflatoxinas M (Allcroft et al., 1966).

As aflatoxinas são moléculas heterocíclicas, com átomos de oxigênio e com anéis de bisfurano, que diferem entre si apenas por pequenas variações em sua composição e estrutura molecular. A aflatoxina G₁ é idêntica à B₁, exceto que o anel 5-valero lactona é substituído pelo anel ciclopentanona e a aflatoxina B₂ e G₂ são produtos de adição dihidro ao anel dihidrofurano de B₁ e G₁ respectivamente (Organización Panamericana de la Salud, 1983).

O *Aspergillus parasiticus* parece estar mais adaptado ao solo, sendo predominante em vagens de amendoim, enquanto o *A. flavus* parece estar mais adaptado ao ambiente aéreo e foliar, sendo dominante em milho, caroço de algodão e nozes (Diener et al., 1987). Hesseltine et al. (1976), verificaram que as linhagens de *A. flavus* produzem as aflatoxinas B₁ e B₂, enquanto que *A. parasiticus* pode sintetizar as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Frisvad & Thrane (1996) verificaram que o *A. nomius* também produzem as 4 aflatoxinas.

Os fatores que afetam a produção de aflatoxinas, em um substrato natural, podem ser divididos em 3 categorias: físicos, químicos e biológicos. Os fatores físicos incluem: conteúdo de umidade, temperatura, pH, umidade relativa durante o armazenamento, luz, aeração, danos mecânicos e nível de gases atmosféricos. Os fatores químicos são: fatores nutricionais, incluindo íons inorgânicos, uso de fungicidas. Os fatores biológicos são: linhagem do microrganismo, crescimento do microrganismo em competição e destoxificação microbiana (Gourama & Bullerman, 1995).

Os fungos toxigênicos podem infectar os cultivos em crescimento, em consequência de danos causados por insetos e outros agentes e produzir toxina antes da colheita, ou durante esta, e durante o seu armazenamento (Fonseca, H.¹).

Os produtos que têm apresentado maiores contaminações com aflatoxinas têm sido amendoim, milho e algodão, entretanto, qualquer outro produto pode apresentar contaminação, principalmente se não for adequadamente seco, após a colheita. A quantidade de aflatoxinas está na ordem de $\mu\text{g/kg}$ até mg/kg (Diener et al., 1987).

Com relação aos efeitos tóxicos das aflatoxinas verificou-se que as quatro principais aflatoxinas apresentam o seguinte grau de toxicidade: $B_1 > G_1 > B_2 > G_2$. Destas, a mais tóxica e cancerígena é a B_1 . A forte habilidade de ligação da aflatoxina B_1 com o ácido desoxiribonucléico (DNA) é o principal aspecto de suas propriedades tóxicas e cancerígenas (Fonseca, 1984).

A aflatoxina pode causar dano ao fígado da maioria dos animais domésticos e experimentais (Stark, 1986) e tem sido relacionada com muitas doenças em homens, incluindo hepatocarcinoma. Embora o fígado seja o alvo primário, em muitos casos, lesões cancerígenas foram observadas nos rins, cólon, pulmão e glândulas lacrimais de vários animais alimentados com rações contaminadas com aflatoxina (Stoloff, 1977).

As espécies animais variam em sua susceptibilidade aos efeitos agudos e crônicos das aflatoxinas, sendo os efeitos tóxicos influenciados por fatores como estado nutricional, saúde, idade e sexo do animal, dentro de cada espécie, além da dose e período de exposição do organismo à toxina (Hsieh et al., 1977). Dentre os animais já estudados, a truta

¹ Fonseca, H. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Piracicaba), comunicação pessoal, 1997.

arco-íris é um animal altamente sensível, enquanto que a ovelha é o mais resistente (Moreau, 1979).

Há ampla evidência de que a espécie humana não é imune à aflatoxicose aguda. Os primeiros estudos epidemiológicos foram feitos na Índia, onde houve um surto de hepatite, afetando 397 pessoas em 200 vilas, resultando 106 mortos. O alimento principal desta população, por indeterminado número de dias foi milho contaminado com aflatoxina B₁ no nível de 55µg/kg (Park & Stoloff, 1989).

Em Uganda, um menino de 15 anos morreu 2 dias depois de ser hospitalizado. Entre os alimentos consumidos pelo paciente e sua família foi encontrada mandioca contaminada com 1700µg/kg de aflatoxina B₁ (Park & Liang, 1993).

A legislação permite, em muitos países, níveis de aflatoxinas em produtos alimentícios entre 5 a 50 µg/kg (FAO, 1993). No Brasil, a presença das aflatoxinas nos alimentos é regulada pela Resolução No. 34/76 do Ministério da Saúde (Brasil, 1977), que estabeleceu 30 µg/kg para a soma das aflatoxinas B₁ e G₁, e pela Portaria No. 183 do 21 de Março de 1996, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, que estabelece o limite máximo de 20 µg/kg, para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, internalizando as normas do Mercosul (Brasil, 1996).

3.2. Ocorrência de aflatoxina no milho

O grão de milho é um substrato apropriado para o crescimento de fungos aflatoxigênicos (Trenk & Hartman, 1970; Martin & Gilman, 1976).

A contaminação de milho e seus derivados é mais comum nas regiões tropicais do mundo, sendo menor nas regiões temperadas (FAO, 1993).

Trenk & Hartman (1970) demonstraram que as aflatoxinas são produzidas em milho com níveis de umidade acima de 17,5%, quando a

temperatura é de 24°C ou mais. Eles também verificaram que o reumedecimento do milho originou uma deterioração mais rápida e conseqüente formação de aflatoxina, do que para o milho recém colhido.

Alguns estudos efetuados têm demonstrado que o *A. flavus* tem capacidade limitada para invadir os grãos de milho em desenvolvimento. Hoje, sabe-se que o problema das aflatoxinas no milho ocorre tanto antes da colheita como no armazenamento (Fonseca, 1997).

Juszkiewicz & Piskorsk (1992), estudaram a ocorrência da aflatoxina B₁ em 1120 amostras de milho, coletado desde 1975 a 1979 e destinado às indústrias de ração da Polônia. Além disso, 625 amostras de rações comerciais e concentrados protéicos foram coletados durante 1976. Para a análise de micotoxinas, foram escolhidas aleatoriamente 751 amostras e foi detectada aflatoxina B₁ em cerca de 4% das amostras de milho (13% das amostras comerciais). Das 31 amostras de concentrados protéicos, 19 estiveram contaminadas de 5 a 500µg/kg.

Resnik et al. (1996) fizeram um levantamento para determinar a ocorrência de aflatoxina B₁, no período de 1983 a 1994, em amostras de milho das províncias de Buenos Aires e Santa Fé, na Argentina. Foram analisadas 2271 amostras e 445 estavam contaminadas com aflatoxina B₁ e 92 com aflatoxina B₂, sendo baixos os níveis de contaminação.

Dalcero et al. (1996) pesquisaram a ocorrência de micotoxinas em alimentos. O estudo foi feito em 15 indústrias de Córdoba (Argentina) e os resultados mostraram que a maior incidência de aflatoxina B₁ foi no milho, em níveis de 50 a 1200µg/kg.

Carvajal & Arroyo (1996) analisaram milho contaminado do estado de Tamaulipas, México, de 1989 a 1995. A média de aflatoxina B₁ encontrada foi 66µg/kg em 42 amostras de milho.

No Brasil há vários trabalhos mostrando a contaminação do milho e seus sub-produtos por aflatoxina.

Fonseca et al. (1982) e Fonseca et al. (1983), estudando a ocorrência de aflatoxinas no milho proveniente de várias cidades do Estado de São Paulo, verificaram que 6 (4,7%) das 128 amostras estavam contaminadas em níveis que variaram de 41 a 2000 μ g/kg, mas não foi citada a provável utilização para o milho contaminado.

Prado (1983) analisou 177 amostras, sendo 32 amostras de farinha de milho e outros produtos de milho, adquiridas em supermercados e mercearias de Belo Horizonte, MG. Não foi constatada presença de aflatoxina B₁ em nenhuma das amostras.

Scussel et al. (1984) verificaram a possível ocorrência de aflatoxinas em 83 amostras de milho verde e produtos de milho, como fubá, farinha de milho branco, farinha de milho amarelo, flocos de milho pré-cozido e sêmola de diversas marcas, coletadas em diversos supermercados localizados na região de Campinas, SP. Os resultados mostraram que não houve contaminação por aflatoxinas.

Gloria (1995) analisou 292 amostras de grãos de milho destinados à indústria alimentícia do Estado de São Paulo. Os resultados das análises mostraram contaminação em 98 amostras, em níveis que variaram de 11 a 107 μ g/kg, na soma das aflatoxinas B₁+G₁, sendo que 7 amostras excederam o limite tolerado pela legislação brasileira do Ministério de Saúde (Brasil, 1977).

Santurio et al. (1996) analisaram 1263 amostras de grãos de milho e 1006 amostras de rações compostas a base de milho, provenientes de diversos estados brasileiros, no período de abril de 1986 a março de 1996. Desse total, 645 amostras de grãos e 468 amostras de rações foram positivas para aflatoxinas. O nível máximo detectado foi de 14,4mg/kg no milho e 5,1mg/kg para ração.

Mennegazzo & Lazzari (1996) avaliaram o nível de aflatoxina presente nos grãos de milho utilizado em rações de aves e suínos nos três

estados da região sul do Brasil, no período de janeiro de 1992 a dezembro de 1995. Os níveis médios encontrados foram 5,3; 0,6; 13,8; 23,8µg/kg para os anos de 1992 a 1995, respectivamente.

Sylos et al. (1996) verificaram a incidência de aflatoxina no milho brasileiro. Das 48 amostras de milho do Sul do Brasil (estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), 28 amostras apresentaram aflatoxina B₁ na faixa de traços a 2152µg/kg e as 32 amostras de milho do estado de São Paulo não estavam contaminadas. Eles ressaltaram a variação que pode haver de uma região para outra dentro de um mesmo país.

Como as aflatoxinas são prejudiciais à saúde e sua ocorrência é comum no milho, é muito importante a existência de métodos rápidos e confiáveis para determinar sua presença e níveis de contaminação. Isto é muito importante para a decisão rápida de aceitar ou rejeitar a carga de milho que está sendo oferecida à indústria de processamento.

Os métodos para análise de aflatoxina em milho podem ser divididos em três categorias (Shotwell, 1977a): (a) teste rápido presumível, pela inspeção do milho sob luz ultravioleta (365 nm), através da presença de fluorescência BGY para localizar lotes que possam estar contaminados com aflatoxinas, (b) métodos rápidos de triagem para determinar a presença ou ausência de toxina em um lote, mas não a sua concentração; (c) métodos quantitativos, que são um pouco mais demorados, para quantificar a aflatoxina no milho.

Entre os testes rápidos de triagem, muitos tipos de minicolunas e de imunoensaios, incluindo o método ELISA, têm sido desenvolvidos para análise de micotoxinas. Muitos destes métodos são sensíveis, específicos e simples de operar e incluem as seguintes etapas: extração, purificação do extrato, concentração e desenvolvimento em minicoluna. O kits estão disponíveis comercialmente (Chu, 1992) mas, o principal problema destes

testes é o custo muito alto (Pestka et al., 1995), pois o preço para a análise de uma amostra é de, aproximadamente, US\$ 16,00 (Al-Tech²).

Devido ao grande volume de milho comercializado, as indústrias exigem técnicas rápidas de triagem para rejeitar lotes de milho contaminado e o teste da fluorescência BGY é rápido, minimizando o trabalho e o custo.

3.3. A técnica da fluorescência BGY

3.3.1. Fundamentos da técnica

Bollenbacher & Marsh (1954) observaram a formação de fluorescência amarelo esverdeada brilhante ("bright greenish yellow" - BGY) em fibras de algodão, incubadas com *Aspergillus flavus*, quando iluminadas com luz ultravioleta (365 nm). Marsh et al. (1955) concluíram que algum fator instável ao calor, existente na fibra, deveria ser necessário na formação da fluorescência, pois a mesma não ocorreu em fibras que foram autoclavadas e depois inoculadas com o fungo, embora o microrganismo tenha apresentado grande desenvolvimento nelas. As fibras fluorescentes apresentavam excessivo encolhimento em meio alcalino e redução na resistência.

Marsh et al. (1969a) analisaram 50 isolados de *A. flavus*, provenientes de vários locais, e verificaram que todos eles produziram a fluorescência amarelo esverdeada brilhante em fibras de algodão, enquanto que outros fungos não o fizeram. Desse modo, os autores sugeriram que a fluorescência da fibra poderia ser empregada como um teste promissor para localizar sementes de algodão contendo altos níveis de aflatoxina.

Marsh et al. (1969b) produziram experimentalmente a fluorescência BGY em tecidos vivos de diversas plantas, além de fibras de

² AL-TECH, São Paulo, correspondência pessoal, 1996.

algodão e sementes de milho, nas quais fora inoculado *A. flavus*. Evidências indicaram que o fator instável ao calor existente na planta é necessário à formação da fluorescência BGY era a peroxidase, a qual transformava o ácido cójico, produzido pelo fungo, na substância fluorescente. De acordo com Prescott & Dunn (1959), este ácido é um metabólito de *A. flavus*, produzido a partir de um grande número de substâncias que contêm carbono, como o amido, dextrinas, dissacarídeos, hexoses, pentoses e outras. Contudo, segundo Basappa et al. (1970), o ácido cójico não se constitui em uma etapa intermediária da síntese de aflatoxina, sendo que a síntese destas duas substâncias seguem diferentes caminhos. Foi demonstrado que, em certas ocasiões, *A. flavus* poderia produzir ácido cójico sem a formação detectável de aflatoxina.

3.3.2. A fluorescência BGY no milho

Após a associação da fluorescência BGY com aflatoxina em fibras de algodão e a obtenção da mesma fluorescência em grãos de milho por Marsh et al. (1969a), Shotwell et al. (1972) observaram que, no milho, tal fluorescência também estava associada à aflatoxina. Grãos danificados, apresentando a fluorescência amarelo esverdeada brilhante característica, continham altos níveis de aflatoxina B₁ (85.000 a 101.000 µg/kg). Grãos de milho que apresentaram fluorescência branca ou azul não possuíam aflatoxina B₁. A fluorescência BGY desaparecia quando a aflatoxina B₁ era extraída dos grãos.

Fennell et al. (1973) encontraram grãos danificados e fragmentos de milho que apresentavam *A. flavus* e aflatoxina, mas não a fluorescência BGY. Porém, deve-se lembrar que a fluorescência BGY não é emitida pela aflatoxina e sim por uma substância desconhecida, resultante da interação entre metabólitos do fungo (ácido cójico) e enzimas da planta

(peroxidase) (Marsh et al., 1969b). Assim, a desnaturação das enzimas, causadas pelo calor durante a secagem ou armazenamento do milho, poderia bloquear a produção de substâncias fluorescentes sem eliminar *A. flavus*. Condições de armazenamento subseqüentes poderiam permitir o crescimento de microrganismos e produção da aflatoxina, sem o aparecimento da fluorescência BGY.

Shotwell et al. (1974) estudaram a distribuição da aflatoxina em grãos de milho contaminado e sua relação com a fluorescência BGY e verificaram que esta poderia ocorrer em três formas gerais: a) totalmente visível no exterior dos grãos, sejam eles quebrados ou inteiros, e em material estranho; b) fluorescência BGY sub-superficial, a qual era detectada como uma cor dourada desbotada sob o tegumento da semente, geralmente na região do germe, tornando-se plenamente visível quando o grão era partido; c) fluorescência interna totalmente oculta, a qual só era detectada quando se quebrava o grão. O reconhecimento da fluorescência de sub-superfície (forma b) freqüentemente é difícil, por causa da baixa intensidade do seu brilho. Neste caso, tornam-se críticas a experiência e a acuidade visual do observador. Pelo exposto, os autores consideraram altamente recomendável quebrar ou moer grosseiramente as amostras antes do exame sob a luz ultravioleta.

Barabolak et al. (1978) desenvolveram um aparelho para inspeção de amostras de 4,5 kg de grãos inteiros de milho em menos de 10 minutos. De acordo com estes autores, para que resultados representativos fossem obtidos, seriam necessárias amostras de pelo menos 4,5 kg. Neste aparelho (Figura 1), o milho é colocado em um funil alimentador, caindo a seguir em uma bandeja vibratória. O funil é ajustado de modo que uma única camada de milho se movimente através da bandeja, sobre a qual incide luz ultravioleta; a velocidade da bandeja também é ajustável. Tanto a bandeja quanto a luz ultravioleta são isolados da luz ambiente por uma cabine, sendo

que o inspetor examina o milho através de um visor, contando o número de grãos e partículas que exibem a fluorescência BGY.

Figura 1. Aparelho para inspeção de amostras de milho pelo teste da fluorescência BGY, para detecção de aflatoxina, desenvolvido por Barabolak et al. (1978).

Porém, Shotwell & Hesseltine (1981) compararam a eficiência do teste de fluorescência BGY feito com grãos inteiros e com grãos quebrados e chegaram à conclusão que, se a amostra fosse examinada sob luz ultravioleta, em camada única de grãos no interior da cabine desenvolvida por Barabolak et al. (1978), não seria necessário quebrar o milho.

Quanto à coloração da fluorescência, é necessário muita prática para distinguir a fluorescência BGY dos outros tipos e cores de fluorescência que ocorrem no milho (Shotwell et al., 1975). Rambo et al. (1974), por exemplo, observaram uma fluorescência amarelo-esverdeada brilhante em milho e espigas livres de *A. flavus* e aflatoxina, a qual era semelhante à fluorescência BGY aqui discutida. Por isso, Shotwell & Hesseltine (1981) sugeriram o composto Tinopal BHS (Ciba-Geigy), estável ao ar, como uma cor de referência no teste de fluorescência BGY. Sob luz ultravioleta (365 nm), a cor de sua fluorescência foi a mesma daquela observada em milho contendo *A. flavus* e *A. parasiticus* e, possivelmente, a aflatoxina produzida por estes fungos.

A contagem não mede o nível de aflatoxina na amostra, porém, Barabolak et al. (1978) observaram uma relação entre estes dois parâmetros. Quando a contagem era menor ou igual a 18 partículas com fluorescência BGY por amostra de 4,5 kg, apenas 2% das amostras continham mais de 20 µg/kg de aflatoxina; quando a contagem era maior do que 18 partículas fluorescentes, um terço das amostras continha mais de 20 µg/kg de aflatoxina. Entretanto, Shotwell et al. (1975) já alertavam que o teste de fluorescência BGY não deveria ser usado para determinar níveis de aflatoxina, pois, em experimentos realizados no Estado do Missouri (E.U.A), com milho branco, o coeficiente de correlação entre o número de partículas ou grãos fluorescentes e o nível de aflatoxina não foi significativo. Deste modo, se a fluorescência BGY fosse o único critério usado para se saber se a aflatoxina estava presente nos grãos de milho, existiriam muitos testes falso-positivos e bem poucos testes falso-

negativos. Por isso, segundo Shotwell et al. (1975) e Shotwell (1977b), a utilização ideal para o método da fluorescência BGY seria a identificação rápida de lotes de milho que deveriam sofrer análise posterior em laboratório, minimizando a carga de trabalho analítico.

Kwolek & Shotwell (1979) empregaram a porcentagem, em peso, de material fluorescente na amostra, ao invés do número de partículas fluorescentes, para estimar o nível de aflatoxina em lotes de milho branco, no Missouri. O coeficiente de correlação, contudo, permaneceu insatisfatório, havendo grandes variações nas equações de predição nos diferentes lotes.

Por outro lado, Dickens & Whitaker (1981), em experimentos com milho amarelo, na Carolina do Norte (E.U.A.), observaram um coeficiente de correlação significativo (0,90) entre a porcentagem, em peso, de grãos fluorescentes na amostra e a concentração de aflatoxina no lote. Os autores ressaltaram que esta correlação poderia ser afetada pelo tipo de milho, condições de crescimento da cultura, erro na determinação da porcentagem de material fluorescente, etc., sendo necessárias mais pesquisas para comprovar a eficiência do método.

De acordo com Schimitt & Hurburg, Jr. (1989) e Wyatt (1988), o teste da fluorescência BGY freqüentemente é empregado inadequadamente. Wyatt (1988), ao avaliar diversos laboratórios nos Estados Unidos, verificou que as modificações arbitrárias mais comuns eram: tamanho muito pequeno da amostra, grãos não quebrados antes da visualização e diferentes números de pontos fluorescentes requeridos para aceitação do lote ou para teste subsequente. Os erros decorrentes destas alterações foram demonstrados pelo autor, quando este comparou as análises de seis laboratórios, que utilizaram o teste de fluorescência BGY, com o teste tipo ELISA (Neogen) (Tabela 1). Os resultados de falso-positivos e falsos-negativos foram semelhantes entre si nos testes BGY.

O exame rotineiro de ingredientes que chegam à indústria é a melhor maneira de determinar a presença da aflatoxina (Wyatt, 1988). Modificações arbitrárias, na metodologia recomendada, podem diminuir a precisão do teste, comprometendo seu objetivo e podendo trazer sérios problemas, decorrentes da aceitação de material contaminado, ou prejuízo para o produtor, quando a carga é injustamente rejeitada.

TABELA 1: Critérios recomendados e utilizados por várias companhias para seleção do milho pelo método da fluorescência BGY para detecção da contaminação da aflatoxina e % de erro em relação ao método Neogen.

Laboratório nº	Local	Tamanho da amostra (g)	Quebra dos grãos (+ ou -)	Nºs de pontos fluorescentes para teste posterior	% de erros
1	Virgínia	250	-	5 ou mais	26
2	Georgia	2270	-	1 ou mais	5
3	Carolina do Norte	200	+	1 ou mais	23
4	Texas	250	-	5 ou mais	21
5	Indiana	2270	+	1 ou mais	0
6	Ohio	2270	+	1 ou mais	0

FONTE: Wyatt (1988)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Neste trabalho foram utilizadas amostras de milho retiradas de cargas que chegaram a sete indústrias alimentícias e de ração. Cada uma destas empregou a técnica BGYF de modo diferente.

As indústrias estavam localizadas no Estado de São Paulo (3), em Minas Gerais (1) e Paraná (3).

4.2. Metodologia

A metodologia utilizada neste trabalho, para avaliação da confiabilidade da técnica de fluorescência BGY empregada por algumas indústrias no Brasil e da técnica BGYF padronizada, é mostrado na Figura 2.

Figura 2. Metodologia utilizada neste trabalho para avaliação da confiabilidade da técnica de fluorescência BGY empregada em algumas indústrias do Brasil e da técnica BGYF padronizada

4.2.1. Amostragem

4.2.1.1. Amostras provenientes das Indústrias

Foram realizadas três amostragens em cada indústria, sendo que, em cada uma delas foram retiradas, aproximadamente, 20 amostras por indústria.

Cada amostra foi obtida pela retirada de várias subamostras de diferentes pontos da carga, as quais foram reunidas e homogeneizadas para formar uma única amostra de, aproximadamente, 5kg, que foi então considerada representativa de cada carga de milho amostrada.

A mesma amostra, já analisada pelas indústrias segundo sua própria técnica BGYF, seguiu para o Laboratório de Micotoxinas da ESALQ/USP, para determinação da presença de aflatoxinas pela técnica BGYF padronizada e por análise físico-química.

4.2.1.2. Amostras produzidas no laboratório

Com o objetivo de observar amostras com maior probabilidade de estarem contaminadas, 41 amostras de milho de 4,5kg foram reumedecidas e deixadas no laboratório até que algum crescimento fúngico fosse observado. Após ser verificado crescimento fúngico, as amostras foram visualizadas pela técnica BGYF padronizada, aplicada nas amostras antes e após a trituração, e analisadas por método físico-químico.

4.2.2. Técnica BGYF empregada pelas indústrias

A Tabela 2 mostra os parâmetros utilizados pelas indústrias para a visualização, sob luz ultravioleta, das amostras de milho, para determinar a presumível contaminação com aflatoxinas. Normalmente as indústrias adotam tamanho da amostra, número de pontos fluorescentes como critério de rejeição e trituração ou não das amostras de modo diferente. Somente uma indústria visualiza as amostras utilizando a cabine de Barabolak; as que não utilizam esta cabine, geralmente colocam as amostras em uma bandeja sob uma lâmpada de luz ultravioleta sem proteção, mexendo os grãos manualmente.

TABELA 2. Parâmetros utilizados pelas indústrias na técnica BGYF para detectar presumível contaminação por aflatoxinas.

Indústria	Local	Tamanho da amostra (g)	Trituração da amostra	Utilização da Cabine de Barabolak	Nº de pontos fluorescentes como critério de rejeição
1	MG	60	Não	Não	7 - 10
2	SP	4500	Não	Sim	7
3	SP	1000	Não	Não	1
4	SP	2500	Não	Não	1
5	PR	250	Não	Não	1
6	PR	1500 - 2000	Não	Não	8
7	PR	1000	Sim	Não	1

4.2.3. Técnica BGYF Padronizada

A técnica BGYF padronizada consistiu em se tomar uma amostra de 4,5kg de grãos de milho e observá-la na cabine desenvolvida por

Barabolak et al. (1978) (Figura 1), sem proceder a quebra dos grãos, segundo Shotwell e Hesseltine (1981).

De acordo com Wyatt (1988), amostras com 1 ou mais pontos fluorescentes têm alta probabilidade de conter aflatoxina B₁, em nível superior a 20µg/kg e, por isto, devem ser analisadas posteriormente por outra metodologia analítica para confirmação da presença da toxina. Assim, as amostras que apresentaram um ou mais pontos fluorescentes neste estudo, foram consideradas positivas pela técnica BGYF padronizada.

4.2.4. Técnica BGYF padronizada empregada em amostra triturada

Vários trabalhos anteriores ao de Shotwell & Hesseltine (1981), como, por exemplo, Shotwell et al. (1974), recomendavam trituração das amostras antes do exame sob a luz ultravioleta, devido à possibilidade da fluorescência estar presente sob o pericarpo do grão. Assim, com o objetivo de se testar a influência da trituração dos grãos antes da visualização, uma segunda visualização da amostra foi feita após a trituração das mesmas. Para isto as amostras foram trituradas em um moinho de disco, e passadas através de uma peneira de 9 “mesh” (abertura, 2mm.), obtendo-se duas frações: uma, dos grãos quebrados, constituída pelo material retido na peneira, e outra, do farelo, que foi o material peneirado. Em seguida as duas frações foram visualizadas sob luz ultravioleta, para detecção dos pontos fluorescentes.

4.2.5. Método da Análise Físico-Química

Com o objetivo de se confirmar se as amostras estavam contaminadas ou não com aflatoxinas, o material já visualizado pelas técnicas BGYF, foi totalmente moído, até passar a granulação de 20 “mesh” (abertura,

0,84mm.). A seguir, foi realizada a análise físico-química pelo método de Soares & Rodrigues Amaya (1989).

A detecção e quantificação das aflatoxinas foi feita através da comparação visual da intensidade da fluorescência da amostra e do padrão quantitativo, por cromatografia de camada delgada bidirecional.

4.2.6. Avaliação dos resultados

Os resultados da técnica BGYF, aplicada pelas indústrias, e os resultados da técnica BGYF padronizada, testada em laboratório, foram comparados com a análise físico-química.

Com a finalidade de se avaliar os resultados considerou-se que as amostras com resultados do método físico-químico menores que 20µg/kg foram amostras “não contaminadas”, e as que apresentaram contaminação acima desse valor foram consideradas amostras “contaminadas”.

As amostras que foram positivas para as técnicas BGYF e que apresentaram contaminação menor do que 20µg/kg foram consideradas amostras falso-positivas e as amostras que foram negativas para as técnicas BGYF e que apresentaram contaminação maior do que 20µg/kg foram consideradas amostras falso-negativas.

O número de amostras positivas geradas pela técnica BGYF das indústrias, pela técnica BGYF padronizada, aplicada em amostras de grãos sem e com trituração (frações: grãos quebrados e farelo), foram comparadas com os resultados da metodologia físico-química, através do teste não paramétrico de χ^2 de Friedman (comparações múltiplas) (Campos, 1983).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Amostras falso-positivas

A ocorrência de um alto número de amostras falso-positivas pela técnica BGYF é indesejável para a indústria, uma vez que amostras não contaminadas são dirigidas para uma análise físico-química posterior, gerando dispêndio de tempo e recursos econômicos desnecessários.

A técnica BGYF, tal como utilizada pelas indústrias, apresentou uma grande variação (0 - 53%) quanto à percentagem de amostras falso-positivas. Isto demonstra uma grande diferença entre as indústrias quanto ao potencial de geração de resultados falso-positivos (Tabela 3).

A possível explicação para tal fato seria o critério do número de pontos fluorescentes utilizado pelas indústrias seria menos ou mais rigoroso, portanto, geraria menor ou maior número de amostras falso-positivas entre elas.

TABELA 3. Número de amostras falso-positivas apresentadas pelas diferentes técnicas BGYF empregadas

Indústria	Nº total de amostras	Técnica BGYF da indústria	Técnica BGYF padronizada Amostra sem triturar	Técnica BGYF padronizada Amostra triturada	
				Grãos quebrados	Farelo
1	63	0(0%)	19(30%)	28(45%)	15(24%)
2	61	1(2%)	22(36%)	25(41%)	5(8%)
3	66	21(32%)	19(29%)	24(36%)	7(11%)
4	68	4(6%)	25(37%)	28(41%)	13(19%)
5	60	2(3%)	24(40%)	28(47%)	8(13%)
6	60	0(0%)	35(58%)	41(68%)	18(30%)
7	60	32(53%)	32(53%)	39(65%)	22(37%)
TOTAL	438	60(14%)	176(40%)	213(49%)	88(20%)

Como pode ser observado na Tabela 4, as indústrias 3 e 7, que adotaram um baixo número de pontos fluorescentes como critério de rejeição, foram justamente as que geraram mais resultados falso-positivos, ao contrário das indústrias 1, 5 e 6, que adotaram um alto número de pontos como critério de rejeição. Por exemplo, a indústria 1, requer de 7 a 10 pontos em uma amostra de 60g, o que seria equivalente a 525 a 750 pontos em 4,5kg de amostra (amostra padrão). Em razão do critério de adotar um alto número de pontos fluorescentes, esta indústria tem pouca possibilidade de apresentar uma amostra falso-positiva, mas é provável que possa aprovar lotes altamente contaminados. Nas indústrias 5 e 6, provavelmente, aconteceu o mesmo.

Como exceção, a empresa 4 adotou o critério de número de pontos mais baixo, mas não apresentava um número de amostra falso-positivas alto. Entretanto, baseado na visita prévia realizada a cada indústria para checagem no local e das condições de realização da técnica BGYF, acredita-

se que possa ter ocorrido uma falha do operador na visualização das amostras nesta indústria e que portanto, não foram detectados pontos fluorescentes existentes nas amostras, o que gerou poucas amostras falso-positivas.

Em comparação com os resultados da técnica BGYF padronizada aplicada no laboratório, os resultados gerados pelas indústrias apresentaram um menor número de amostras falso-positivas. Isto pode ter ocorrido devido a dois fatores: o primeiro seria que a visualização, realizada em laboratório, pode ter sido executada com maior exatidão, uma vez que ela foi realizada com mais atenção e com maior tempo, permitindo uma melhor detecção dos pontos fluorescentes, ao contrário da visualização na indústria que, normalmente, é realizada em um tempo muito menor, diminuindo a possibilidade de visualização correta dos pontos fluorescentes existentes nas amostras; o segundo fator, e que acredita-se que seja o mais importante, seria o critério de rejeição adotado, que considerou amostras com um ou mais pontos fluorescentes como positivas.

TABELA 4. Número de pontos fluorescentes adotado como critério de rejeição pelas indústrias e a equivalência em 4,5kg de amostra.

Indústria	Tamanho da amostra (g)	Nº de pontos fluorescentes como critério de rejeição	Nº de pontos fluorescentes equivalentes em 4,5kg
1	60	7 - 10	525 - 750
2	4500	7	7
3	1000	1	5
4	2500	1	2
5	250	1	18
6	1500 - 2000	8	18 - 24
7	1000	1	5

A análise estatística mostrou ao nível de 1% de significância que os resultados das indústrias não diferiram dos resultados da análise físico-química quanto ao número de amostras positivas em cada amostragem e no período total deste estudo.

Na técnica padronizada a adoção do critério de 1 ou mais pontos fluorescentes considerou amostras com um número pequeno de pontos fluorescente, de 1 a 4, como positivas quando, na verdade, estes poucos pontos podem estar apenas indicando uma baixa contaminação, provavelmente menor que 20µg/kg, ou um nível não detectável pela metodologia físico-química adotada, que neste estudo foi de 2µg/kg. Tal fato também foi observado por Shotwell et al. (1975) em um estudo com a técnica BGYF em 1275 amostras.

A inadequação do critério dos pontos fluorescentes necessários para rejeição das amostras é bem clara quando se observa a distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes visualizados antes e depois da trituração e o nível de aflatoxina detectado pela análise físico-química (Tabelas 5 e 6).

Estatisticamente os resultados da técnica BGYF nas amostras antes e após a trituração foram diferentes dos resultados da análise físico-química. Em geral, os resultados da visualização das amostras, antes e após a trituração, na fração de grãos quebrados, foram diferentes ao nível de 5% e 1%, respectivamente dos resultados da análise físico-química.

Das 438 amostras visualizadas sem trituração (Tabela 5), 183 (42%) apresentaram 1 ou mais pontos fluorescentes, entretanto, dentre estas, somente 7 estavam contaminadas com aflatoxinas, com níveis variando de 20 a 114µg/kg, detectadas pela análise físico-química. Portanto, o número de amostras falso-positivas pela técnica BGYF foi de 176, representando 40% das amostras.

TABELA 5. Distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes encontrados pela técnica BGYF padronizada (amostra sem triturar) e o nível de aflatoxinas determinado pela análise físico-química.

Nível de Aflatoxina ($\mu\text{g/kg}$)	Número de pontos fluorescentes		
	0	1 - 4	≥ 5
ND	229	134	1
<10	25	30	4
10 - 19	1	4	2
≥ 20	0	1	7
Total de amostras	255	169	14

ND= Não detectada

Se fosse adotado o critério de rejeição de 5 ou mais pontos fluorescentes, teríamos 14 (3%) amostras rejeitadas, sendo que 7 (50%) destas estariam contaminadas e 7 (50%) seriam falso-positivas, ao contrário do critério de 1 ponto, que gerou 176 resultados falso-positivos. Desta maneira os resultados da visualização pela técnica BGYF padronizada nas amostras sem trituração não seriam mais estatisticamente diferentes do resultado da análise físico-química ao nível de 1% de significância.

A visualização da fração de grãos quebrados das amostras trituradas geraram um número maior de amostras falso-positivas, quando comparadas com amostras sem triturar, como pode ser observado na Tabela 3. Entretanto, estatisticamente, essa diferença não foi significativa ao nível de 1% de significância.

Das 438 amostras visualizadas após trituração (Tabela 6), 218 (50%) não apresentaram pontos fluorescentes nem contaminação com aflatoxinas, 192 apresentaram de 1 a 4 pontos fluorescentes, porém a

contaminação, quando ocorria, não era superior a 20µg/kg, sendo portanto, amostras falso-positivas. Vinte e oito amostras apresentaram 6 ou mais pontos fluorescentes, sendo que 21 não apresentavam contaminação e, portanto, eram também falso-positivas. Sete amostras estavam realmente contaminadas.

A ocorrência de amostras falso-positivas, com mais de 5 pontos fluorescentes, pode ser devido à possibilidade de que linhagens de *A. flavus* produtoras de ácido cójico, e não de aflatoxinas, estejam presentes e serem responsáveis pelo aparecimento da fluorescência BGY. Parrish et al. (1966) demonstraram que, de 93 linhagens de *A. flavus*, 92 produziram ácido cójico e somente 26 produziram aflatoxinas.

Todas as amostras com contaminação acima ou igual a 20µg/kg apresentaram 6 ou mais pontos fluorescentes. Assim, concluiu-se que a adoção de 6 ou mais pontos fluorescentes, para este tipo de teste (visualização na fração de grãos quebrados de amostras trituradas), seria o mais adequado no sentido de gerar menor quantidade de amostras falso-positivas, um total de 21 amostras, ao contrário do critério de 1 ponto, que gerou 213. Desta forma, os resultados da visualização pela técnica BGYF padronizada na fração grãos quebrados nas amostras após a trituração não seriam mais estatisticamente diferentes do resultado da análise físico-química ao nível de 1% de significância.

TABELA 6. Distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes encontrados na fração de grãos quebrados das amostras trituradas e o nível de aflatoxina determinado pela análise físico-química.

Nível de Aflatoxina ($\mu\text{g/kg}$)	Número de pontos fluorescente		
	0	1 - 4	≥ 5
ND	197	157	10
<10	21	32	8
10 - 19	0	3	3
≥ 20	0	0	7
Total de amostras	218	192	28

ND= Não detectada

A técnica de visualização da fração farelo, obtida após trituração das amostras, gerou um número relativamente menor de falso-positivos quando comparada com as outras técnicas testadas em laboratório, de tal forma que a análise estatística mostrou que os resultados no farelo não diferiam dos resultados da análise físico-química, ao nível de 1% de significância; entretanto isto deve ter acontecido em função da dificuldade de visualização de pontos fluorescentes no farelo.

Devido à pequena granulometria das partículas dessa fração, a visualização dos pontos na massa de farelo gerada foi prejudicada, ao contrário da fração de grãos quebrados, onde as partículas eram maiores. A Tabela 7 mostra o número de amostras provenientes das indústrias e o nível de aflatoxinas que apresentaram em $\mu\text{g/kg}$.

TABELA 7. Número de amostras provenientes das indústrias e o nível de aflatoxinas que apresentaram, em $\mu\text{g/kg}$

Número de amostras	Nível de Aflatoxinas
	($\mu\text{g/kg}$)
354	ND
68	<10
8	10 - 19
3	20 - 29
2	30 - 39
2	40 - 89
1	>100

ND: Não detectada

A aplicação da técnica BGYF padronizada nas amostras produzidas em laboratório, antes da trituração, mostrou uma percentagem de amostras falso-positivas (37%) concordante com a percentagem encontrada durante a aplicação da técnica BGYF, antes da trituração, nas amostras provenientes das indústrias (40%), como mostra a Tabela 8.

TABELA 8. Número de amostras falso-positivas apresentadas pelas diferentes técnicas BGYF nas amostras produzidas no laboratório.

	Técnica BGYF padronizada	Técnica BGYF padronizada Amostra triturada	
	Amostra sem triturar	Grãos quebrados	Farelo
Falso-positivos	15(37%)	20(50%)	13(32%)

Nas 41 amostras produzidas no laboratório e visualizadas pela técnica BGYF sem triturar, 31 (76%) apresentaram 1 ou mais pontos

fluorescentes (1-148), como mostra a Tabela 9, entretanto, dentre estas, 16 (52%) estavam contaminadas (contaminação de 20 a 770 μ g/kg), conforme mostrou a análise físico-química. Portanto, ocorreram 15 (37%) resultados falso-positivos.

Com a adoção do critério de 5 ou mais pontos fluorescentes, para a técnica padronizada aplicada nestas amostras, teríamos 22 amostras falso-positivas (54%), sendo que, dentre estas, 8 (36% das 22 amostras) seriam falso-positivas, conforme a análise físico-química. Isto demonstra, novamente, a inadequação do critério de 1 ponto fluorescente para rejeição dos lotes.

Estes resultados foram diferentes das amostras da indústria, onde a adoção do critério de 5 pontos geraria 3% de amostras provavelmente contaminadas, com 50% destas sendo falso-positivas.

A diferença de percentagem de amostras com mais de 5 pontos na visualização antes e após trituração, entre as amostras provenientes das indústrias e as produzidas no laboratório, eram esperadas, e foram devidas ao fato de trabalhar-se com um universo de amostras nas quais houve uma indução do crescimento fúngico e, portanto, com características diferentes das amostras provenientes das indústrias.

Já a diferença da percentagem de resultados falso-positivos entre as amostras com 5 ou mais pontos fluorescentes, de 50% para 37%, foi pequena e acredita-se ter ocorrido em função da variação do potencial de produção de aflatoxina pelas linhagens *A. flavus*, conforme Parrish et al. (1966), demonstraram ser possível.

TABELA 9. Distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes encontrados pela técnica BGYF padronizada em amostra sem triturar e o nível de aflatoxinas determinado pela análise físico-química nas amostras produzidas no laboratório.

Nível de Aflatoxina ($\mu\text{g/kg}$)	Número de pontos fluorescentes		
	0	1 - 4	≥ 5
ND	3	4	1
<10	2	2	2
10 - 19	1	1	5
≥ 20	4	2	14
Total de amostras	10	9	22

ND= Não detectada

A Tabela 10 mostra os dados obtidos pela técnica BGYF padronizada na fração dos grãos quebrados das amostras trituradas. Das 41 amostras visualizadas, uma não tinha pontos fluorescentes nem contaminação, 8 apresentaram de 1 a 4 pontos fluorescentes e contaminação menor do que $20\mu\text{g/kg}$, sendo portanto, falso-positivas. Trinta e duas amostras apresentaram 6 ou mais pontos fluorescentes, sendo que 12 não apresentavam contaminação e, portanto, eram também falso-positivas. Vinte amostras estavam contaminadas.

Observou-se, também, que todas as amostras com contaminação igual ou acima de $20\mu\text{g/kg}$, apresentaram 24 ou mais pontos fluorescentes, ao contrário dos resultados das amostras provenientes das indústrias, onde todas as amostras contaminadas apresentaram 6 ou mais pontos fluorescentes.

TABELA 10. Distribuição das amostras em função do número de pontos fluorescentes encontrados na fração de grãos quebrados das amostras trituradas e o nível de aflatoxina nas amostras produzidas no laboratório.

Nível de Aflatoxina ($\mu\text{g/kg}$)	Número de pontos fluorescentes		
	0	1 - 4	≥ 5
ND	0	6	2
<10	1	1	4
10 - 19	0	1	6
≥ 20	0	0	20
Total de amostras	1	8	32

ND= Não detectada

A técnica de visualização da fração farelo, nas amostras produzidas no laboratório, também gerou um número relativamente menor de falso-positivos quando comparada com as outras técnicas testadas em laboratório. Do mesmo modo que nas amostras provenientes da indústria, isto pode ter acontecido pela dificuldade de visualização desta fração, devido à pequena granulometria das partículas.

A diminuição do número de falso-positivos, deve ser um dos objetivos da técnica BGYF, afim de que ela se torne mais acurada e, portanto, provoque menor dispêndio de tempo e de dinheiro com a análise de amostras rejeitadas desnecessariamente. O estabelecimento de um critério de rejeição adequado parece ser o principal instrumento para atingir-se este objetivo. A Tabela 11 mostra o número de amostras produzidas no laboratório e o nível de aflatoxinas que apresentaram, em $\mu\text{g/kg}$.

TABELA 11. Número de amostras produzidas no laboratório e o nível de aflatoxinas que apresentaram, em $\mu\text{g/kg}$

Número de amostras	Nível de Aflatoxinas
	($\mu\text{g/kg}$)
8	ND
6	<10
7	10 - 19
5	20 - 49
4	50 - 99
6	100 - 399
3	400 - 799
1	800 - 1000
1	>1000

ND: Não detectada

5.2. Amostras falso-negativas

A ocorrência de amostras falso-negativas é preocupante, porque permite que amostras contaminadas acima de $20\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina, sejam aceitas pela indústria. Gloria et al. (1996), investigando 286 amostras de milho aprovadas pela técnica BGYF de uma indústria, observaram, pela análise físico-química destas, a ocorrência de 14 amostras falso-negativas.

O número de falso-negativos apresentados pelas técnicas BGYF nas amostras provenientes das indústrias, é mostrada na Tabela 12.

TABELA 12. Número de amostras falso-negativas apresentadas pelas diferentes técnicas BGYF empregadas.

Ind.	No total de amostras	Técnica BGYF da indústria	Técnica BGYF padronizada Amostra sem triturar	Técnica BGYF padronizada Amostra triturada	
				Grãos quebrados	Farelo
1	63	0	0	0	0
2	61	2(3%)	0	0	0
3	66	0	0	0	0
4	68	0	0	0	0
5	60	0	0	0	0
6	60	1(2%)	0	0	0
7	69	0	0	0	0
TOTAL	438	3(1%)	0	0	0

Segundo a técnica BGYF empregada pelas indústrias, somente as indústrias 2 e 6 apresentaram falso-negativos.

As amostras falso-negativas das indústrias, podem ter ocorrido devido a uma falha de visualização, uma inadequação do número de pontos adotado como critério de rejeição ou porque a fluorescência estava oculta sob o pericarpo, como foi demonstrado por Shotwell et al. (1974).

Como nas duas amostras da indústria 2, onde ocorreu resultado falso-negativo, foram detectados 1 e 5 pontos na técnica BGYF de laboratório ao contrário de nenhum ponto na técnica BGYF da indústria, acredita-se que possa ter ocorrido falha de visualização na indústria 2. Já para a única amostra falso-negativa da indústria 6, o que provavelmente ocorreu foi que o número de pontos detectados estava abaixo do critério de rejeição

utilizado, uma vez que, essa mesma amostra apresentou 6 pontos fluorescentes na indústria e 5 pontos em laboratório.

A aplicação da técnica BGYF em laboratório, tanto nas amostras não trituradas quanto trituradas, não gerou amostras falso-negativas. A aplicação da técnica BGYF padronizada, em laboratório, por ser efetuada com mais atenção e adotar um critério de rejeição rigoroso (≥ 1 ponto), diminui a possibilidade de ocorrência de falso-negativos.

A pouca ocorrência de amostras contaminadas, nas várias amostragens, não permitiu a conclusão sobre a ocorrência dos resultados falso-negativos gerados pela aplicação da técnica BGYF nas indústrias. Entretanto, é importante ressaltar que o peso da amostra para visualização adotado por 6 das indústrias (Tabela 2) participantes neste estudo, estavam abaixo do peso recomendado pela FAO (1993) para ter-se uma amostra significativa dos lotes de milho. Isto pode aumentar a chance de que tais indústrias tenham resultados falso-negativos para os lotes.

Ao contrário das amostras provenientes das indústrias, as produzidas em laboratório, e visualizadas pela técnica BGYF padronizada em amostra sem triturar, apresentaram 4 resultados falso-negativos (Tabela 13).

As quatro amostras falso-negativas, não apresentaram pontos fluorescentes nas amostras sem triturar, e depois de trituradas, apresentaram 24, 46, 57 e 224 pontos na fração grãos quebrados (Tabela 14), e estavam contaminadas ao nível de 49, 414, 800 e 1.095 μ g/kg de aflatoxina, como mostrou a análise físico-química.

TABELA 13. Número de amostras falso-negativas apresentadas pela técnica BGYF padronizada (amostra sem triturar e amostra triturada) nas amostras produzidas no laboratório.

	Técnica BGYF padronizada Amostra sem triturar	Técnica BGYF padronizada Amostra triturada	
		Grãos quebrados	Farelo
Falso-negativos	4(10%)	0(0%)	0(0%)

Segundo a Tabela 13, na visualização pela técnica BGYF padronizada em amostra triturada, não se detectou amostras sem pontos fluorescentes e que apresentaram contaminação ou seja, falso-negativos.

Shotwell e Hesseltine (1981), observaram que a trituração dos grãos gerava um aumento insignificante de número de pontos fluorescentes e por isto concluíram que tanto a visualização de amostras sem trituração na cabine de Barabolak quanto a visualização com trituração podiam dar os mesmos resultados.

Neste estudo, a trituração das amostras mostrou ser eficiente no sentido de evitar-se a ocorrência de amostras falso-negativas e não aumentar significativamente o número de amostras falso-positivas. Assim, acreditamos que a trituração deva ser realizada antes da visualização.

Considerando-se que, na utilização da técnica BGYF, deve-se procurar atingir o máximo de exatidão possível na detecção de pontos fluorescentes e adotar um critério de rejeição adequado, a fim de evitar a ocorrência de resultados falso-negativos e um mínimo de resultados falso-positivos. Nas condições deste trabalho, com o número de amostras investigadas, julgamos que o número de 5 pontos fluorescentes, como critério de rejeição para a técnica BGYF em amostra sem triturar, e 6 pontos para a técnica BGYF em amostra triturada, seriam os mais adequados para atingir

estes objetivos. Contudo, para uma avaliação mais exata deve-se considerar um maior número de amostras e com maior contaminação com aflatoxinas.

TABELA 14. Contaminação apresentada pelas amostras falso-negativas nas amostras produzidas no laboratório.

Número de Amostra	PF Técnica BGYF padronizada Amostra sem triturar	PF Técnica BGYF padronizada Amostra triturada		Aflatoxina Total (µg/kg)
		Grãos quebrados	Farelo	
1	0	24	60	49
2	0	46	168	414
3	0	224	438	1095
4	0	57	190	800

PF= Pontos fluorescentes

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições deste estudo permitiram concluir que:

- a) Estatisticamente os resultados gerados pela aplicação da técnica BGYF pelas indústrias não foram diferentes dos resultados gerados pela análise físico-química, quanto ao número de amostras positivas. Já os resultados gerados pela técnica BGYF padronizada, aplicada em laboratório, foram diferentes tanto antes como após a trituração (fração grãos quebrados).
- b) O critério de rejeição adotado na técnica BGYF padronizada utilizada em laboratório foi o responsável pelo alto número de amostras falso-positivas e, portanto, pela diferença estatística entre os resultados da técnica padronizada aplicada nas amostras sem e com trituração (fração grãos quebrados) e a análise físico-química.
- c) A modificação do critério de rejeição da técnica BGYF padronizada, para 5 ou mais pontos na amostra sem trituração e para 6 ou mais pontos na visualização da fração grãos quebrados da amostra triturada, produziu resultados, quanto ao número de amostras positivas, estatisticamente semelhantes aos resultados da análise físico-química.
- d) A visualização no laboratório geralmente detectou mais pontos fluorescentes que a visualização nas indústrias.

e) Nas amostras provenientes das indústrias, a técnicas das indústrias foram os únicos que apresentaram a ocorrência de amostras falso-negativas, ao contrário da técnica BGYF padronizada, que não apresentou.

f) Os critérios do tamanho de amostra, triturar ou não a amostra antes da visualização e número de pontos fluorescentes como critério de rejeição adotados, foram muito diversificados entre as indústrias, mostrando que não existe uma padronização da técnica.

g) O tamanho da amostra, adotado por algumas indústrias, não é representativo das cargas e pode gerar resultados não confiáveis. Assim, é necessário que as indústrias adotem um tamanho de amostra mais representativo para as cargas.

h) A trituração das amostras não aumenta significativamente a ocorrência de amostras falso-positivas e evita a ocorrência de amostras falsos-negativas, assim é recomendado para as indústrias triturar as amostras antes da visualização.

i) É recomendável para as indústrias utilizar a técnica BGYF, empregando uma amostra triturada de 4,5kg e adotar como critério de rejeição 6 ou mais pontos fluorescentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLCROFT, R.; ROGERS, H.; LEWIS, G.; NABNEY, J.; BEST, P.E. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". **Natura**, v.209, n.5019, p.154-155, 1966.

BARABOLAK, R.; COLBURN, C.R.; JUST, D.E.; KURTZ, F.A.; SCHLEICHERT, E.A. Apparatus for rapid inspection of corn for aflatoxin contamination. **Cereal Chemistry**, v.55, n.6, p. 1065-1067, Nov./ Dec. 1978.

BASAPPA, S.C.; SREENIVASAMURTHY, V.; PAYSIA, H.A.B. Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of *A. flavus* Link. **Journal of General Microbiology**, v.61, n.81. 1970.

BOLLENBACHER, K. ; MARSH, P.B. A preliminary note on a fluorescent fiber condition in raw cotton. **Plant Disease Reporter**, v.38, n.6, p. 375-379, June. 1954.

BRADBURN, N.; BLUNDEN, G.; COKER, R.D. Aflatoxin contamination in maize. **Tropical Science**. v.33, n.44, p. 418-428, 1993.

BRASIL. Ministério de Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução No. 34/76 publicada no Diário Oficial da União de, 19 de janeiro de 1977. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE

ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo, 1991b. v.1/A, p. 7.20 (76).

BRASIL. Leis, decretos, etc. Ministério de Agricultura. Portaria n.183, de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de março de 1996. Art. 1. Adotar Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, Amendoim e Milho, aprovado pela Resolução do Grupo Mercado Comum do Sul n.56/94, de 01 de janeiro de 1996.

CAMPOS, H. Teste χ^2 de Friedman. In: CAMPOS, H. **Estatística experimental não paramétrica**. Piracicaba, 1983. p. 233-252.

CARVAJAL, M.; ARROYO, G. Aflatoxin quantification and identification of *Aspergillus flavus* in the contaminated corn of the warehouse "Las Yescas", state of Tamaulipas, México. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXIN AND PHYCOTOXINS, 9., Rome, 1996. **Abstract book**. Rome: Istitute Superiore di Sanità, 1996. p.141.

CHU, F. Recent progress on analytical techniques for mycotoxins in feedstuffs. **Journal of Animal Science**, n.70, p.3950-3963, 1992.

DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MAGNOLI, C.E. Incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in feedstuff. Detoxification by means of sorbentes. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXIN AND PHYCOTOXINS, 9., Rome, 1996. **Abstract book**. Rome: Istitute Superiore di Sanità, 1996. p.136.

- DICKENS, J.W. ; WHITAKER, T.B. Bright greenish - yellow fluorescence and aflatoxin in recently harvested yellow corn marketed in North Carolina. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, n.2, p. 973-975, Dec. 1981.
- DIENER, U.L.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; PAYNE, G.A.; LEE, L.S.; KLICH, M.A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annual Review Phytopathology**, n.54, p. 249-270, 1987.
- FANCELLI, A.L. Produção. In: FANCELLI, A.L.; LIMA, U. A., (Ed.) **Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. 112p. (Extensão Agroindustrial, 5).
- FAO. **Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn**. Roma, 1993. 75p.
- FENNELL, D.I.; BOTHAST, R.J.; LILLEHOJ, E.B.; PETERSON, R.E. Bright greenish-yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxin. **Cereal Chemistry**, v.50, n.4, p. 404-414, July/Aug. 1973.
- FONSECA, H.; NOGUEIRA, J.N.; GRANER, M.; et al. Natural occurrence of mycotoxins in some Brazilian foods. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXIN AND PHYCOTOXINS, 5., Viena, 1982. **Proceedings**. Viena, World Health Organisation, 1982. p.76-79.
- FONSECA, H.; NOGUEIRA, J.N.; GRANER, M.; et al. Natural occurrence of mycotoxins in some Brazilian foods. Part II. In: WORLD CONGRESS OF

FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 6., Dublin, 1983. **Proceedings.** Dublin, Boole Press, 1983. p. 53-54.

FONSECA, H. Envenenamento alimentar-micotoxinas e micotoxicoses. In: CAMARGO, R.; FONSECA, H.; GRANER, M.; PRADO, L.G.F.; CARUSO, J.G.B.; ANDRADE, M.O.; NOGUEIRA, J.N.; CANTARELLI, P.R.; LIMA, U.A.; OLIVEIRA, A.J.; MOREIRA, L.S. **Tecnologia dos produtos agropecuários: Alimentos. São Paulo:Nobel, 1984.** cap.4., p.51-71

FONSECA, H. Micotoxinas em milho. In: SIMPOSIO DA TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE MILHO, Piracicaba, 1997. **Resumos.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1997, p. 10.

FRISVAD, J.C. & THRANE, U. Mycotoxin production by food-borne fungi. In: SAMSOM, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi. Netherlands: CBS, 1996.** cap.4, p.251-260.

GLORIA, E.M. Ocorrência de aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A, no milho, a ser utilizado como matéria-prima em indústria alimentícia do Estado de São Paulo. São Paulo, 1995. 71p. (Dissertação de Mestrado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GLÓRIA, E.M.; FONSECA, H.; CALORI-DOMINGUES, M.; SOUZA, I.M. Avaliação do teste da luz ultravioleta como método de triagem do milho contaminado com aflatoxinas, em uma indústria alimentícia. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21., Londrina, 1996. **Resumos.** Londrina: ABMS, 1996, p. 338

- GOURAMA, H; BULLERMAN, L. *Aspergillus flavus* and *aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of concern in foods and feeds: A review. **Journal of Food Protection**, v.5, n.12, p. 1395-1404, 1995.
- HEATHCOTE, J.G. Aflatoxins and related toxins. In: BETINA, V. (Ed) **Mycotoxins, production, isolation, separation and purification**. Amsterdam: Elsevier, 1984. p.89-130.
- HESSELTINE, C.W.; SHOTWELL, O.L.; KWOLEK, W.F.; LILLEHOJ, E.B.; JACKSON, W.K.; BOTHAST, R.J. Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest. II. Mycological studies. **Mycologia**, v.58, p.41-53, 1976.
- HSIEH, D.P.H.; WONG, Z.A.; WONG, J.M.; HICHAS, C.; RUEBNER, B.H. Comparative Metabolism of Aflatoxin. In: RODRIGIS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A., (Ed). **Micotoxins in human and animal health**. Park Forest: South, Pathotox Publ., 1977. p. 37-50.
- JUSZKIEWICZ, T.; PISKORSK, J. Occurrence of mycotoxins in animal feeds. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.11, n.4, p. 211-215, 1992.
- KWOLEK, W.F.; SHOTWELL, O.L. Aflatoxin in white corn under loan. V. aflatoxin prediction from weight percent of bright greenish-yellow fluorescent particles. **Cereal Chemistry**, v.56, n.4, p. 342-345, 1979.
- LANCASTER, M.C.; JENKINS, F.P.; PHILP, J.M. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, n.192, p. 1095-1096, 1961.

MARSH, P. B.; BOLLENBACHER, K.; SAN ANTONIO, J.P.; MEROLA, G.V.
Observations on certain fluorescent spots in raw cotton associated with the growth of microorganisms. **Textile Research Journal**, v.25, p.1007-1010, 1955.

MARSH, P.B.; SIMPSON, M.E.; FERRETTI, R.J.; CAMPBELL, T.C.; DONOSO, J.
Relation of aflatoxin in cotton seeds at harvest to fluorescence in the fiber. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.17, n.3, p. 462-467, May/June. 1969a.

MARSH, P.B.; SIMPSON, M.E.; FERRETTI, R.J.; MEROLA, G.V.; DONOSO, J.; CRAIG, G.O.; TRUCKSESS, M.W.; WORK, P.S. Mechanism of formation of a fluorescence in cotton fiber associated with aflatoxins in the seeds at harvest. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.17, n.3, p. 468-472. May/June. 1969b.

MARTIN, P.M.D.; GILMAN, G.A. **A consideration of the mycotoxin hypothesis with special reference to the mycoflora of maize, sorghum, wheat and groundnuts**. London: Tropical Products Institute, 1976. 111p. (Report G 105).

MENEGAZZO, R.; LAZZARI, F.A. Micotoxinas em milho para rações, na região sul de Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21., Londrina, 1996. **Resumos**. Londrina: ABMS, 1996, p. 341.

MOREAU, C. Aflatoxicosis. In: John Willey (Ed.) **Moulds, toxins and food**. Chichester:, 1979. cap. 3, p. 63-76:

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Micotoxinas**. México, 1983. 1313p. (Publicación Científica, 453).

PARK, D.L.; LIANG, B. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. **Trends in Food Science and Technology**, v.4, p.334-342, 1993.

PARK, D.L.; STOLOFF, L. Aflatoxin control how a regulatory agency managed risk from an unavoidable natural toxicant in food e feed. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.9, p. 109-130, 1989.

PARRISH, F.W.; WILEY, B.J.; SIMMONS, E.G.; LONG, L. Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Applied Microbiology**, v.14, n.1, p.139, 1966.

PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N.; SUTIKNO. Immunological assay for mycotoxin detection. **Food Technology**, p.120-128, Feb. 1995.

POHLAND, A.E.; WOOD, G.E. Occurrence of mycotoxins in food. In: KROGH, P. (Ed). **Mycotoxins in food**. London: Academic Press, 1987. p. 35-64.

PRADO, G. Incidência de aflatoxinas B₁ em alimentos. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, v. 5, n. 2, p.147-157, 1983.

PRESCOTT, S.C.; DUNN, C.G. **Industrial microbiology**. 3. ed. New York: McGraw-Hill,. 1959.

- RAMBO, G.W.; TUIITE, J.; CALDWELL, R.W. *Aspergillus flavus* and aflatoxin in preharvest corn from Indiana in 1971 and 1972. **Cereal Chemistry**, n.51, p. 848-853, Nov./Dec. 1974.
- RESNIK, S.; NEIRA, S.; PACIN, A.; MARTINEZ, E.; APRO, N.; LATREITE, S. A Survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1988-1994. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.1, p. 115-120, 1996.
- SANTURIO, J.M.; MALLMANN, C.A.; BALDISSERA, M.A.; ALMEIDA, C.A.A.; POZZOBON, M.C.; SCHNEIDER, L.G. Qualidade micotoxicológica do milho, sorgo e rações produzidos no Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DEL MILHO E SORGO; 21., Londrina, 1996. **Resumos**. Londrina: ABMS, 1996, p. 340.
- SCHIMITT, S.G.; HURBURG JR., C.R. Distribution and measurement of aflatoxin in 1983 Iowa corn. **Cereal Chemistry**, v.66, n.3, p. 165-168. 1989.
- SCUSSEL, V.M.; RODRIGUES AMAYA, D.B.; SILVA, W.J. Incidência de aflatoxina em milho (*Zea mays* L) e em produtos derivados, comercializados na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 6, n. 1, p. 75-85, 1986.
- SHOTWELL, O.L. Aflatoxin in corn. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, n.54, p. 216 - 224, Mar.1977a.
- SHOTWELL, O.L. Mycotoxins - corn - related problems. **Cereal Foods World**, v.22, n.10, p. 524-527, Oct.1977b.

SHOTWELL, O.L.; HESSELTINE, C.W. Use of bright greenish yellow fluorescence as a presumptive test for aflatoxin in corn. **Cereal Chemistry**, v.58, n.2, p. 124-127, 1981.

SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; HESSELTINE, C.W. Aflatoxin contamination: association with foreign material and characteristic fluorescence in damaged corn kernels. **Cereal Chemistry**, v.49, n.4, p. 458-465, July/ Aug. 1972.

SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; HESSELTINE, C.W. Aflatoxin: distribution in contaminated corn. **Cereal Chemistry**, v.51, n.4, p. 492-499, July./ Aug. 1974.

SHOTWELL, O.L.; GOULDEN, M.L.; JEPSON, A.M.; KWOLEK, W.F.; HESSELTINE, C.W. Aflatoxin occurrence in some white corn under loan, 1971. III. Association with bright greenish - yellow fluorescence in corn. **Cereal Chemistry**, v.52, p. 670-677, Sept./ Oct. 1975.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian food by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, p. 22-26, 1989.

STARK, a. Molecular aspects of aflatoxin B1 mutagenesis and carcinogenesis. In: STEYN, P. S.; VLEGGAAR, R. **Mycotoxins and phycotoxins**. Amsterdam: Elsevier Science Pub., 1986. V. 1, p. 435-445.

- STOLOFF, L. Aflatoxin: an overview. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W. and Mehlman, M.A. **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Pathotox Pub., 1977. cap.1, p.7-28.
- SYLOS, C.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SANTURIO, J.M.; BALDISSERA, M.A. Occurrence of aflatoxins and cyclopiazonic acid in Brazilian peanut and corn. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXIN AND PHYCOTOXINS, 9., Rome, 1996. **Abstract book**. Rome: Istitute Superiore, 1996, p. 132.
- TRENK, H.L.; HARTMAN, P.A. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. **Applied Microbiology**, v.19, n.5, p. 78-84, 1970.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mycotoxins**. Geneva, 1979. 127p. (Environmental Health Criteria, 11).
- WYATT, R.D. How reliable is the black light test in the detection of aflatoxin contamination? **Feedstuffs**, p. 12-14, Aug. 1988.