

HATUE NAKAMURA DE OLIVEIRA

*Farmacêutica-bioquímica*

Prof. Ass. de Microbiologia de Alimentos da  
Faculdade de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

RESISTENTES À AFLATOXINA

Tese apresentada à  
Faculdade de Tecnologia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas  
para a obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos

Dezembro de 1971

3

O. E. A.
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS 80/20558
- CURSO REGULAR -
N.º 570.14 - 041.º 706
Data

*Orientador:*

DR. FUMIO YOKOYA

Prof. de Microbiologia de  
Alimentos

FTA - UNICAMP

*A autora  
dedica este trabalho a  
seus pais, espôso e irmão.*

## AGRADECIMENTOS

A autora deseja expressar os mais sinceros agradecimentos ao Dr. Fumio Yokoya pela dedicação absoluta na orientação dêste trabalho.

Também agradece ao seu irmão Dr. Kazuio Nakamura pela assistência recebida durante a sua formação profissional e ao seu esposo Dr. José Sãtiro de Oliveira pela compreensão, paciência e estímulo.

Agradecimentos especiais são dedicados aos doutores André Tosello, diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, pelo estímulo e facilidades proporcionadas, e Leopold Hartman, pelas valiosas sugestões.

Finalmente, a autora estende os reconhecimentos ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, Organização dos Estados Americanos, Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos e a todos que contribuíram na execução dêste trabalho.

## ÍNDICE

	página
RESUMO . . . . .	1
SUMMARY . . . . .	2
INTRODUÇÃO . . . . .	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA . . . . .	5
I. Generalidades . . . . .	5
1. <i>A Descoberta</i> . . . . .	5
2. <i>Desenvolvimento dos Métodos Analíticos</i> . . . . .	8
3. <i>A Aflatoxina no Organismo</i> . . . . .	10
4. <i>Microrganismos Produtores</i> . . . . .	12
II. <i>Contrôle da Toxidez</i> . . . . .	13
1. <i>Prevenção</i> . . . . .	15
2. <i>Remoção</i> . . . . .	15
3. <i>Inativação</i> . . . . .	17
a. <i>Métodos Físicos</i> . . . . .	17
b. <i>Métodos Químicos</i> . . . . .	18
c. <i>Método Microbiológico</i> . . . . .	22
MATERIAIS E MÉTODOS . . . . .	28
I. <i>Materiais</i> . . . . .	28
II. <i>Métodos</i> . . . . .	29
1. <i>Produção da Aflatoxina</i> . . . . .	29
2. <i>Extração e Dosagem da Aflatoxina</i> . . . . .	29
3. <i>Isolamento de Microrganismos Resistentes a Aflatoxina</i> . . . . .	31
a. <i>Preparo do Meio</i> . . . . .	31
b. <i>Isolamento</i> . . . . .	32
c. <i>Teste de Destoxicação da Aflatoxina</i> . . . . .	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	36
CONCLUSÕES . . . . .	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	49
APÊNDICE . . . . .	63

## RESUMO

Por ser extremamente difícil de evitar a formação de aflatoxina em certos produtos, vários processos têm sido estudados visando extraí-la ou inativá-la. Dentre os sistemas de destoxicação conhecidos, um deles é através de microrganismos que, ao se desenvolverem em presença da aflatoxina, são capazes de inativá-la ou degradá-la. Na tentativa de isolar tais microrganismos, vários solos do Estado de São Paulo e uma torta de amendoim foram inoculados em meio de "enriquecimento" contendo 20 µg/ml de aflatoxina. A técnica mais adequada para o preparo desse meio foi adicionando a glucose e a triptona ao meio YES onde previamente havia sido produzida a aflatoxina. Após 5 dias de incubação, foi feito o isolamento dos microrganismos em placas de Petri. Desta forma, conseguiu-se isolar 93 microrganismos resistentes a essa concentração da toxina.

No teste de destoxicação realizado com a finalidade de verificar a habilidade dos microrganismos isolados reduzir a aflatoxina, quando incubados durante 24 horas em meio contendo 16 µg/ml desta toxina, observou-se que, dentre as bactérias, os bolões e as leveduras testados, encontrou-se redução de até 60% da aflatoxina presente. Os bolões foram, em geral, os mais eficientes microrganismos em comparação com as bactérias e leveduras enquanto que dentre as bactérias, as Gram positivas foram as mais eficientes.

## SUMMARY

Due to the wide spread and frequent occurrence of fungus in soil and plants, it is extremely difficult to prevent the formation of aflatoxin in some of the agricultural products. Many techniques have been developed in an attempt to reduce the toxin content by inactivation or extraction, but most of them are not sufficiently effective and inexpensive to justify their use in industrial practice. One of these techniques is the application of microbes for inactivation or degradation of the toxin, since some bacteria, fungi and protozoa can reduce the toxin content of the media. This thesis describes a technique of the isolation of the microbes capable of withstanding high concentration of aflatoxin and an easy test for evaluating their ability to attack the toxin. A total of 93 strains (bacteria, molds and yeasts) have been isolated, from soil and peanut meal. Fully grown cultures of the microorganisms were treated with the aflatoxin  $B_1$  at a concentration of 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of medium. On the whole, molds were the most active in reducing the toxin, followed by bacteria and yeasts although at least one strain of each kind reduced 60% of the toxin content within 24 hours.

## INTRODUÇÃO

A aflatoxina foi descoberta na Inglaterra em 1961, quando um grande número de aves e outros animais morreram inexplicavelmente. Trata-se de uma mistura de metabólitos produzidos por alguns fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em determinadas condições. Esta toxina atua como agente cancerígeno afetando, principalmente, o fígado e os rins. O câncer se manifesta nos casos em que os animais sensíveis consomem pequenas quantidades da toxina, porém, em casos de doses elevadas, leva à morte em alguns dias. A importância do seu estudo baseia-se no fato de sua alta ocorrência em vários produtos agrícolas, representando um sério problema não só econômico como de saúde pública. Atualmente, conhece-se 9 formas de aflatoxina, as quais são:  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $B_{2\alpha}$ ,  $G_{2\alpha}$ ,  $M_1$ ,  $M_2$  e  $P_1$ , donde  $B_1$  e  $M_1$  são os mais tóxicos, seguido de  $M_2$  e  $G_1$ ; os demais são de toxidez relativamente baixa.

Os esporos dos fungos estão amplamente distribuídos na natureza, tornando-se praticamente impossível evitar a contaminação de um produto alimentício desde a colheita até o consumidor. No Brasil, as condições climáticas favorecem grandemente o desenvolvimento do fungo produtor de aflatoxina e de sua produção. Elevada incidência em altas concentrações foi constatada em amendoim, bem como em seus derivados. Foi verificado que tanto o amendoim produzido na seca como nas águas era tóxico (45, 98). Foram também encontradas no comércio pastas de amendoim com elevados teores de aflatoxina (46).

Vários estudos foram feitos, na tentativa de destoxicar aflatoxina por diferentes métodos físicos e químicos.

Dentre êsses, alguns mostraram ser eficientes. A existência de amendoim atóxico apesar de estar altamente contaminado por fungos produtores de aflatoxina, além de outros microrganismos e a queda brusca da quantidade de aflatoxina após a produção máxima fizeram com que pensassem na existência de microrganismos resistentes à toxina e, possivelmente, aptos a inibir a sua produção ou degradá-la.

Após incessantes pesquisas, conseguiram isolar microrganismos capazes de inativar aflatoxina, embora alguns dêles sejam sensíveis à concentrações elevadas. *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184, *Nocardia asteroides*, *Tetraymena pyriformis* e *Dactylum dendroides* NRRL 2574 e 2575 são alguns exemplos de microrganismos capazes de destoxicar a aflatoxina.

Com a finalidade de melhor apresentar o assunto dêste trabalho, que além de ser de grande importância é bastante complexo, foi feita uma revisão bibliográfica extensa, dedicando uma boa parte sobre a generalidade da aflatoxina.

#### ERRATA

Após o primeiro parágrafo da página 4, deve-se inserir o seguinte trecho:

*O presente trabalho foi realizado com a finalidade de isolar microrganismos resistentes à aflatoxina e possivelmente, aptos a destoxicá-la. Como os mais elevados níveis de aflatoxina foram encontrados dentre os produtos nacionais, era de se esperar que também existissem microrganismos mais resistentes e com maior capacidade destoxicante.*



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### I. Generalidades

#### 1. A Descoberta

Aflatoxina é um grupo de metabólitos produzido por certas linhagens de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em determinadas condições. É encontrada tanto no micélio e esporos como no meio onde se desenvolve (54,70).

Esta micotoxina é considerada como uma das mais potentes substâncias cancerígenas naturais (91). Stevens e colab. (96) descreveram uma doença de etiologia desconhecida em perus, com índice de mortalidade bastante elevado ocorrendo dentro de uma semana após o aparecimento de certos sintomas típicos como: perda de apetite, fraqueza das asas e pernas, redução da mobilidade etc. A necrópsia revelava lesões no fígado e frequentemente nos rins. Suspeitaram da razão, pois a doença geralmente desaparecia com a mudança da mesma (93).

Mais tarde, ocorreu na Inglaterra a morte de 100.000 perus de 3 a 6 semanas de idade, com sintomas semelhantes aos descritos acima. Esta epidemia, por ser de etiologia desconhecida, recebeu o nome de "Turkey X Disease" (17). Na mesma época, ocorreu no Kênia, dentro de 4 semanas, a morte de 14.000 patos e pintos de poucas semanas de idade, cujas necrópsias mostraram lesões hepáticas e renais semelhantes a dos perus (12).

O exame das rações na tentativa de isolar alcalóide, chumbo, mercúrio e resíduos de inseticida foi sem êxito (16). Verificaram que as tortas de amendoim procedentes do Brasil faziam parte das rações tóxicas descobertas na Inglaterra (17). Mais tarde, constataram que outros lotes de tortas procedentes da Índia (21), Nigéria, África Ocidental Francesa e Gâmbia também eram tóxicas (84).

Allcroft e colab. (5) conseguiram extrair a substância tóxica da torta com clorofórmio e reproduzir a doença em patos. A suspeita de ser o fungo responsável pela toxicidade, em virtude da presença de grande número de hifas na torta de amendoim ao exame microscópico foi confirmada pelo seu isolamento, produção da toxina e reprodução da doença em animais mais susceptíveis. O fungo isolado foi identificado como *Aspergillus flavus*, Link e Fries, donde veio o nome *aflatoxina*. Extraíndo-se com o clorofórmio e fazendo-se a cromatografia em papel, usando o solvente butanol-ácido acético 5%, constatou-se, à luz ultravioleta, uma mancha no papel com fluorescência azul ( $R_f = 0,7$ ). Esta substância obtida desta mancha era tóxica a patos de um dia. A mesma substância foi também produzida quando o fungo era cultivado em amendoim esterilizado atóxico (85).

Além da cromatografia em papel, usou-se também, coluna de óxido de alumínio (101), obtendo, neste caso, a separação da aflatoxina em dois pontos fluorescentes: um de fluorescência azul, daí o nome *B* ("Blue") e outro verde, *G* ("Green"). Com sílica gel G (33) conseguiram separar 4 manchas fluorescentes denominadas  $FB_1$ ,  $FB_2$ ,  $FB_3$ ,  $FB_4$ . Mais tarde, verificaram que aflatoxinas *B* e *G* correspondiam a duas frações de cada  $B_1$ ,  $B_2$  e  $G_1$ ,  $G_2$ , cujas proporções quando produzidas em amendoim esterilizado foram 40:1 e 50:1 res

pectivamente. Verificaram, ainda, que aflatoxinas  $B_1$  e  $G_1$  apresentavam anel dihidrofurano, que hidrogenados transformam-se em  $B_2$  e  $G_2$  e que todos possuíam grupo metoxila (51). Fórmulas estruturais da aflatoxina foram determinadas (10) (ver figura 1), bem como as suas propriedades físico-químicas (33, 71, 102).

Carnaghan e colab. (20), comparando a toxidez das 4 aflatoxinas em patos de um dia, pesando em média 50g, verificaram que  $DL_{50}^*$  em 7 dias foram: 18,2  $\mu\text{g}$  de aflatoxina  $B_1$ , 84,8  $\mu\text{g}$  de  $B_2$ , 39,2  $\mu\text{g}$  de  $G_1$  e 172,5  $\mu\text{g}$  de  $G_2$ . Allcroft e colab. (3) verificaram que as vacas leiteiras, ao ingerirem ração com alto teor de aflatoxina, eliminavam uma substância tóxica no leite, que foi denominada aflatoxina  $M$  ("Milk"). Hoje, sabe-se que ela é excretada tanto na urina como no leite (3, 6). A aflatoxina  $M$  pode também ser produzida por algumas linhagens de *Aspergillus* (57).

Aflatoxina  $M$  é um hidróxi-derivado da aflatoxina  $B$  apresentando  $OH$  no carbono  $C_4$  do anel furano terminal, existindo, portanto, aflatoxinas  $M_1$  e  $M_2$  correspondendo a  $B_1$  e  $B_2$  respectivamente (ver figura 1). A aflatoxina  $M$  apresenta fluorescência azul muito mais intensa do que a  $B$  (57). Sua toxidez foi determinada por Purchase (80), sendo  $DL_{50}$  de 16  $\mu\text{g}$  para  $M_1$  e 61,4  $\mu\text{g}$  para  $M_2$ , portanto, são tão tóxicos quanto as aflatoxinas  $B_1$  e  $B_2$ , respectivamente.

Mais duas aflatoxinas foram isoladas das culturas de *A. flavus*, que também são hidróxi-derivados da aflatoxina  $B$ , cujo grupamento  $OH$  está na posição 2 do anel furano ter-

---

\*  $DL_{50}$  - ou dose letal mediana, é a dose do toxina necessária para matar 50% dos animais utilizados no teste.

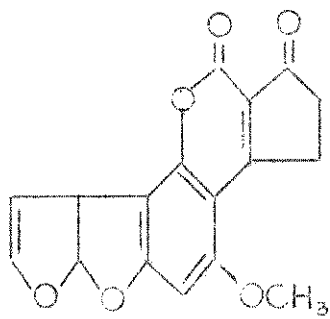
minal (ver figura 1). São elas as aflatoxinas  $B_{2\alpha}$  e  $G_{2\alpha}$  (40). Aflatoxina  $B_{2\alpha}$  é 200 vezes menos tóxica que a toxina  $B_1$ , portanto, praticamente atóxica (62).

Recentemente, foi isolada da urina de macaco *Rhesus* mais uma aflatoxina denominada  $P_1$  (30), que é um derivado fênolico de  $B_1$  (ver figura 1).

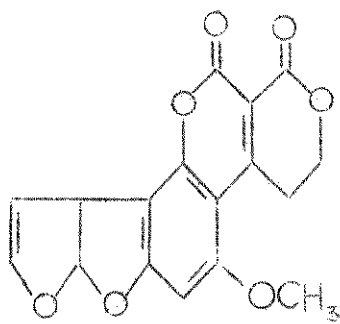
## 2. Desenvolvimento dos Métodos Analíticos

A presença e a quantidade da aflatoxina podem ser determinadas com base na intensidade da fluorescência (método físico-químico) quando exposta à luz ultravioleta, verificado primeiramente por Sargent e colab. (85). O método envolve extração, purificação, cromatografia e leitura sob luz ultravioleta, cuja quantidade pode ser determinada pela diluição sucessiva até extinção da fluorescência ou a sua comparação com a de uma solução padrão (28).

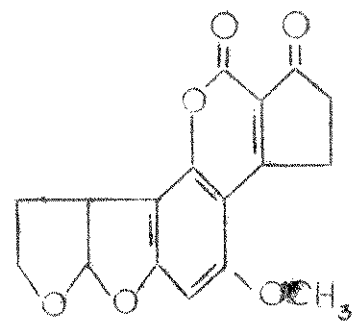
O metanol e a acetona são os mais usados para extração, sendo seguido pela partição em clorofórmio. A purificação é feita pela precipitação em hexano, éter de petróleo ou pelo emprego de colunas de ácido silícico ou sílica gel. Na separação para a determinação da concentração emprega-se mais frequentemente a cromatografia em camada delgada de sílica gel (0,58 mm de espessura). Como sistema de solvente são usados, comumente, metanol-clorofórmio (3 a 5% de metanol), acetona-clorofórmio (85:15) ou clorofórmio-acetona 2 propanol (850:125:25) (10, 28, 75, 77, 92, 97).



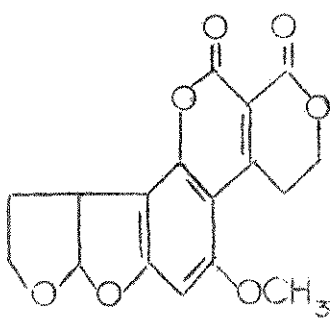
Aflatoxina B<sub>1</sub>



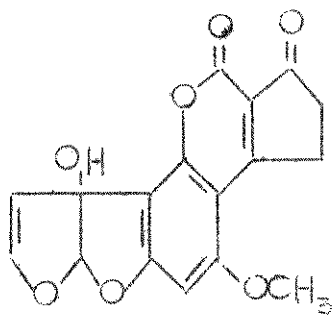
Aflatoxina G<sub>1</sub>



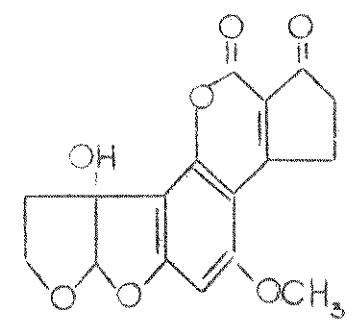
Aflatoxina B<sub>2</sub>



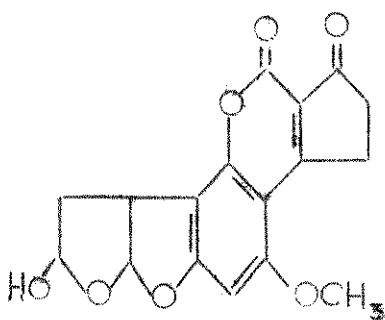
Aflatoxina G<sub>2</sub>



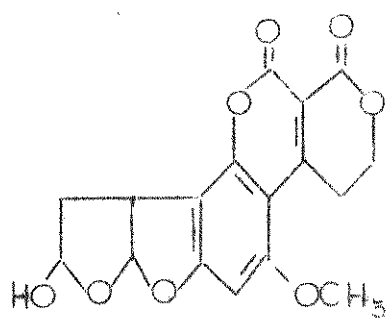
Aflatoxina M<sub>1</sub>



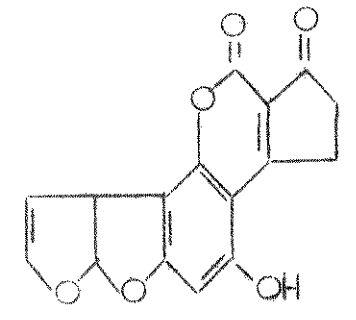
Aflatoxina M<sub>2</sub>



Aflatoxina B<sub>2a</sub>



Aflatoxina G<sub>2a</sub>



Aflatoxina P<sub>1</sub>

Figura 1: Fórmulas estruturais das aflatoxinas conhecidas atualmente.

A leitura da aflatoxina pode ser feita pelo método visual, espectrofotometria ultravioleta ou fluorodensitometria (13, 28, 69, 78). No primeiro e no terceiro método, mede-se a fluorescência diretamente na placa cromatográfica, onde a aflatoxina já se encontra separada e no segundo método, faz-se a leitura da solução eluída da placa cromatográfica em espectrofotômetro.

Segundo Pons (74), há uma boa correlação entre os resultados obtidos pela leitura visual e densitométrica. No entanto, dependendo do operador, o método visual pode apresentar uma variação de até 30%. O método densitométrico é mais preciso, apresentando uma variação de 2 a 4%, porém, a sua precisão é bastante afetada por fatores, tais como: pureza da aflatoxina e irregularidades na camada de sílica gel e na placa cromatográfica (13, 78).

A existência de muitas substâncias fluorescentes com *Rf* semelhantes ao da aflatoxina frente a alguns solventes pode levar a falsos resultados nas determinações da aflatoxina. Assim sendo, recomenda-se usar mais de um sistema de solventes (105) ou empregar testes confirmativos mediante formação de derivados (8).

Um outro método de determinar a aflatoxina é o teste biológico, que se baseia no grau do efeito tóxico em patos de um dia (20). Alguns sugerem, também, a medida da toxicidade no embrião de galinha ou microrganismos (58).

### 3. A Aflatoxina no Organismo

O efeito biológico varia muito com a espécie ani-

mal e, dentro da mesma espécie, a sensibilidade decresce com a idade (104). O carneiro e o camundongo são exemplos de espécies resistentes conhecidas (4, 73). O grau de toxidez nos animais sensíveis depende da dose. De um modo geral, uma dose letal provoca morte com necrose hemorrágica no fígado e trato intestinal, uma dose subletal provoca lesões no fígado e no rim, como: tumor maligno, carcinoma ou hepatoma no fígado e proliferação do ducto biliar (10).

Arai e colab. (9) verificaram que aflatoxina em concentrações menores que 100 µg/ml, foi tóxica apenas a algumas linhagens do gênero *Nocardia* e *Streptomyces*, não afetando bactérias comuns tanto Gram negativas como positivas. Porém, conforme Burmeister e Hesseltine (18), concentração de aflatoxina de apenas 30 µg/ml possui atividade antibiótica, inibindo o crescimento de *Clostridium sporogenes* e várias espécies dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*. *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184 apresentou células com formas de aberração com concentrações de aflatoxina de 20 a 100 µg/ml (22).

Toxidez da aflatoxina parece ser devida à afinidade ao ácido desoxiribonucleico (ADN) do núcleo, cuja ligação inibe a mitose e a síntese de ácido ribonucleico (ARN) e proteínas, aparecendo, como consequência, as células gigantes (61).

Os estudos de Campbell e colab. (19), realizados nas Filipinas, mostraram que a espécie humana parece ser relativamente resistente. A determinação direta do nível seguro da aflatoxina ao homem não é realizável, porém, a atividade tóxica pode ser evidenciada pelo efeito cito-tóxico, que mostrou ser semelhante à nos embriões de patos e galinhas

(47). Em agosto de 1966, "Protein Advisory Group" (PAG) especificou a concentração máxima de aflatoxina permitida em alimentos para 0,03 µg/g (79).

#### 4. *Microorganismos Produtores*

Atualmente, sabe-se que a aflatoxina pode ser produzida por várias linhagens de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como por exemplo: *A. ostianus*, Wehmer (90); *A. wentii*, Wehmer (89); *A. parasiticus*, Spear (26); *P. puberulum*, Bainer (55); *P. citrinum*, Thom. (59) etc.

Fatores, tais como: a linhagem (70, 86), o substrato (24, 31, 86), a temperatura (83, 88), a umidade (35, 38, 83), a presença de organismos competidores e degradadores (11, 87), influem na quantidade e proporção de aflatoxina produzida e acumulada. Segundo Hesseltine (53), o milho, o trigo, o amendoim, a soja, e o arroz são bons meios para produção de aflatoxina em laboratório. A aflatoxina pode ser naturalmente encontrada em vários produtos agrícolas, sobretudo oleaginosas e principalmente no amendoim (14) e no algodão (42).

Com relação a biossíntese de aflatoxina, a via correta ainda permanece desconhecida, existindo relativamente poucos trabalhos formulando hipóteses.

Adye e Mateles (1) verificaram que o acetato e alguns aminoácidos, tais como: metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano, eram incorporados na estrutura da aflatoxina. Fenilalanina e tirosina parecem ser precursores da par-



te cumarínica da molécula e a metionina parece ter função exclusiva de fornecer o grupamento metoxila. Holker e Underwood (56) sugeriram que a aflatoxina tem como precursor a esterigmatocistina que pode derivar da averufina (pigmento antraquinônico).

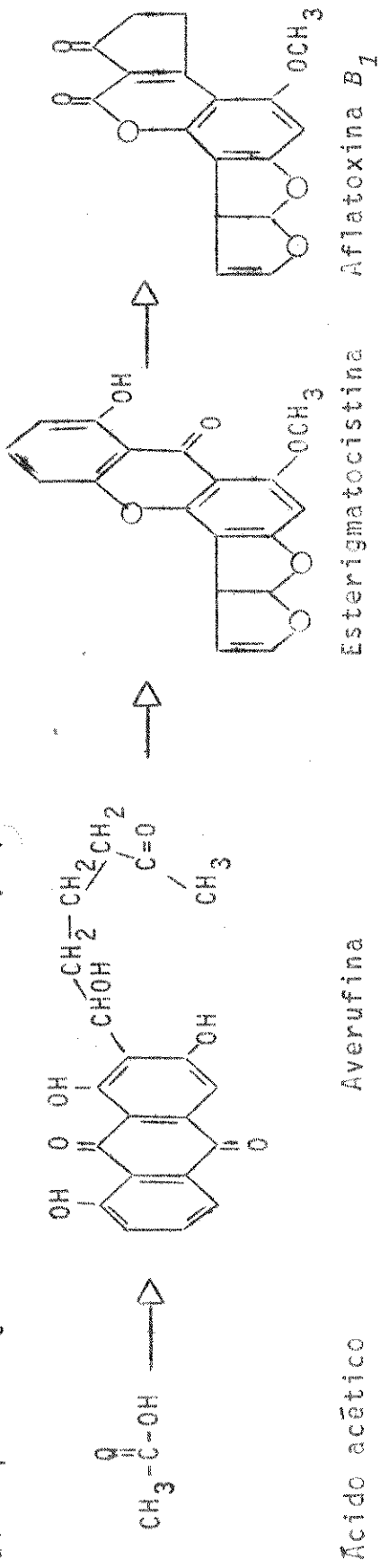
Segundo Moody (68), a aflatoxina se deriva do mavalonato e para Heathcot e colab. (52), o ácido cójico parece ser o precursor da parte não furânica da esterigmatocistina e/ou aflatoxina. Mais tarde, Biollaz e colab. (15) lançaram a hipótese de que a aflatoxina resulta da antraquinona através de uma série de transformações passando por esterigmatocistina, 0-metil esterigmatocistina e finalmente aflatoxina  $B_1$ . Da aflatoxina  $B_1$  podem-se formar as aflatoxinas  $G_1$  e  $M_1$ , sendo que esta última, também, pode resultar da transformação da esterigmatocistina.

Alguns esquemas das transformações hipotéticas acima estão apresentadas na figura 2.

## II. Controle de Toxidez

Conhecendo-se a toxidez da aflatoxina, a sensibilidade de diferentes espécies animais (42) onde o homem provavelmente está incluído (47) e a ampla distribuição de esporos dos fungos na natureza (54), é evidente a necessidade do controle para eliminar ou reduzir a contaminação, ou da remoção da aflatoxina dos produtos já contaminados. Os diferentes métodos propostos podem ser reunidos em três grupos:

a. Esquema segundo Holker e Underwood (56)



b. Esquema segundo Biollaz e colab. (15)

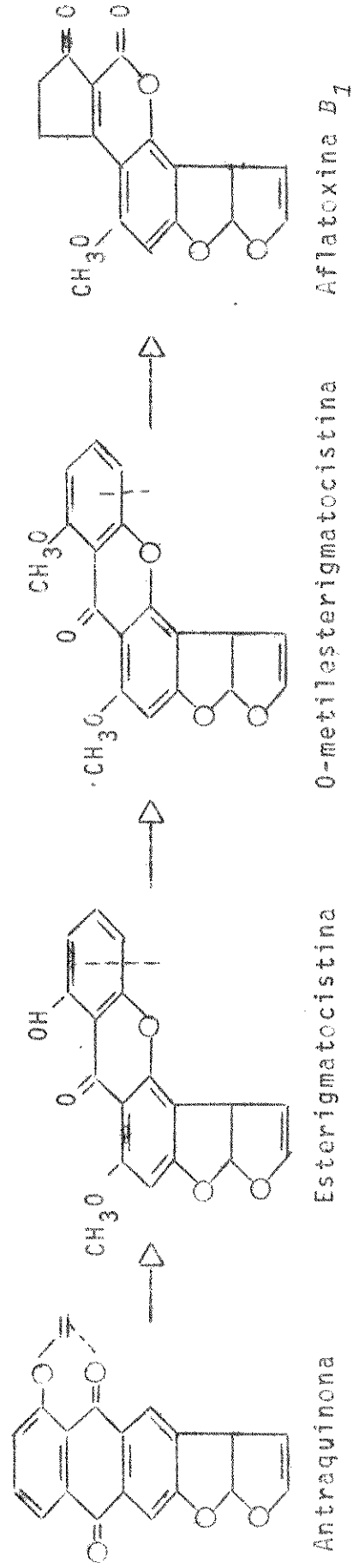


Figura 2: Síntese da aflatoxina pelo fungo, segundo algumas hipóteses atualmente existentes.

prevenção, remoção e inativação.

### 1. *Prevenção*

A prevenção da contaminação pela aflatoxina é o mais desejável (49), que somente será conseguida pelo emprego de cuidados visando eliminar as condições que possibilitam o ataque pelos fungos, tais como: colheita no momento exato, emprego de técnicas apropriadas para não danificar fisicamente o produto, armazenamento adequado usando umidade e temperatura controlada, bem como evitar o ataque por insetos e roedores. Conforme vários autores, a fase crítica é aquela entre a colheita e a armazenagem, sendo a umidade o fator limitante na produção de aflatoxina. Uma secagem rápida e eficiente deve ser praticada logo após a colheita, evitando danos mecânicos que facilitem a invasão do fungos e insetos. Durante o transporte e armazenamento, a umidade deve ser mantida a um nível seguro, como por exemplo, para amendoim e torta de amendoim a umidade do produto deve ser mantida a um teor inferior a 9% e 16% respectivamente (11, 35, 36, 37, 38, 49, 54, 83).

### 2. *Remoção*

Dois são os processos baseados neste princípio. O primeiro é a remoção dos grãos contaminados e o segundo é a extração da aflatoxina do produto (49). O primeiro processo apresentou pouca eficiência segundo Pettit e Taber (72). A

extração da aflatoxina apresentou melhores resultados.

Uma simples lavagem dos grãos com o solvente da aflatoxina não foi suficiente porque ela está presente no interior dos grãos (29). A aflatoxina de torta de amendoim foi totalmente extraída com metanol em extrator Soxhlet (43,85). Nas mesmas condições, acetona, benzeno e clorofórmio, apesar de serem excelentes solventes da toxina pura, não foram eficientes na extração (43). Mais tarde, Sreenivasamurthy e colab. (94) extraíram 80% da toxina com solução de  $\text{CaCl}_2$  a 1% em três lavagens.

Uma mistura azeotrópica acetona-hexano-água (60:35:5) removeu totalmente a aflatoxina da torta de amendoim (48). Vorster (103) verificou a eficiência de diferentes misturas como: hexano-metanol (73:27), hexano-etanol (79:21), hexano-etanol-água (85:12:13), hexano-acetona (41:59) e hexano-acetona-água (44,4:54,5:1,1). Os melhores resultados foram obtidos com a mistura hexano-metanol e hexano-acetona-água. Torta de amendoim tóxica tratada 3 vezes com a mistura acetona-água (90:10) a 50°C resultou na remoção total da aflatoxina (39), porém, a mesma mistura nas proporções de 65:35 e 70:30 removeu apenas 96 e 98% respectivamente (76).

Remoção completa da aflatoxina de torta de amendoim e algodão foi conseguida com a mistura isopropanol-água (80:20) a 60°C (81). Rayner e colab. (82) verificaram que a mistura de etanol-água nas proporções de 95,5:4,5 e 90:10 a 75°C removeu respectivamente 96 e 98% de aflatoxina da torta de amendoim e 93 e 96% da de algodão.

### 3. Inativação

Essa operação consiste na eliminação da toxidez do produto, seja pela neutralização ou pela destruição da toxina. Isto pode ser feito por métodos físicos, químicos e biológicos ou uma combinação desses.

- a. *Métodos Físicos*: dentre os métodos físicos foram testados o efeito da luz ultravioleta, raios gama e calor.
- i. *Luz ultravioleta* - A instabilidade da aflatoxina frente à luz ultravioleta era conhecida desde o seu isolamento (102). Assim, tentaram utilizar tal método para destoxicar farelo de amendoim, porém os resultados mostraram ser ineficiente (43). Entretanto, segundo Andrellos e colab. (7), a aflatoxina pura exposta à luz ultravioleta resultou em outra substância menos tóxica.
  - ii. *Raios gama* - A experiência em torta de amendoim tóxica mostrou que este método não é satisfatório (43).
  - iii. *Calor* - Aflatoxina presente em torta de amendoim é estável a 150°C por várias horas (17). Segundo Fishbach e Campbell (44), um aquecimento superior a 300°C é necessário para sua inativação. Mais tarde, Coomes e colab. (27) verificaram que aflatoxina presente em torta de amendoim era inativada progressivamente durante a autoclavagem do produto a 120°C e 15 psi (1 Atm.). Uma redução de até 95% foi conseguida em 4 horas de autoclavagem. Deste tratamento resultou um composto fluorescente solúvel em me-

tanol, cujas características mostraram ser o ácido *O*-cumárico descarboxilado, que é atóxico. Aflatoxina  $B_1$  pura aquecida sob refluxo em água resultou numa substância fluorescente semelhante ao ácido *O*-cumárico. Portanto, pode-se concluir que, durante a autoclavagem, a aflatoxina se hidrolisa a ácido *O*-cumárico que a seguir sofre uma descarboxilação.

Mann e colab. (66), estudando o efeito do calor e umidade na inativação de aflatoxina da torta de amendoim e algodão, verificaram que o aquecimento a 100°C reduzia a toxicidade proporcionalmente ao aumento da umidade e do tempo de tratamento. A aflatoxina na torta de algodão com 20% de umidade, aquecida a 100°C por 120 minutos, sofreu 80% de inativação e na torta de amendoim, apenas 34%, nas mesmas condições. Mais tarde, Mann e colab. (67) verificaram que o produto com 30% de umidade resultava numa inativação maior, porém era aplicável somente à torta de amendoim.

b. *Métodos Químicos:* durante o estudo das propriedades químicas da aflatoxina, verificou-se uma perda gradual da fluorescência na presença de algumas substâncias químicas (102). Isto fez pensar na possibilidade da inativação por agentes químicos.

Em 1965, Fishbach e Campbell (44) relataram que o tratamento da aflatoxina por uma solução de 5% de NaOCl resultou numa substância sem fluorescência e atóxica. Torta de amendoim com 1 µg/g de aflatoxina exposta numa atmosfera de 10% de cloro durante uma noite, mostrou uma redução de 90% da fluorescência e tornou-se atóxico ao embrião de galinha.

Feuell (43) apresentou um resumo da inativação da aflatoxina pura e na torta de amendoim, usando vários agentes químicos, tais como: solução de hidróxido de sódio a 5%, ácido clorídrico a 10%, gases de óxido de propileno a 1%, óxido de enxofre saturado ou cloro saturado. Aflatoxina pura foi inativada pela ação do HCl, SO<sub>2</sub> e Cl<sub>2</sub>, porém o NaOH pareceu duvidoso. O autor explica que a toxidez ainda presente no tratamento pelo álcali pode ser devido ao sal de sódio formado ou uma possível regeneração do anel lactona durante a digestão pela acidez gástrica. Conforme De Iongh e colab. (33), durante a inativação da aflatoxina com soda, ocorre a abertura do anel lactona que se regenera pela acidificação. Nenhum efeito foi verificado pelo óxido de propileno.

A eficiência de SO<sub>2</sub> e Cl<sub>2</sub> foram testados na torta de amendoim. O primeiro apresentou pequena eficiência. O cloro foi mais eficiente. Porém a sua eficiência parece ser bastante limitada, provavelmente devido à necessidade do contacto direto entre aflatoxina e cloro para haver inativação.

Um estudo bastante detalhado sobre a inativação da aflatoxina com água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi feito por Sreenivasamurthy e colab. (95). Eles conseguiram inativar 97% da aflatoxina presente em torta de amendoim desengordurada e suspensa em água (10% de sólidos) a um pH igual a 9,5, pelo tratamento com igual peso de uma solução 6% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 80°C durante meia hora.

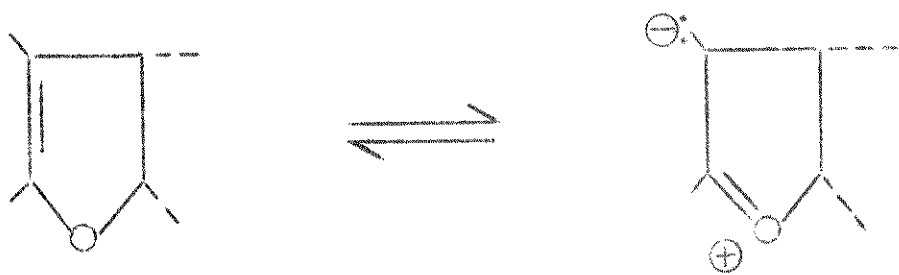
A inativação da aflatoxina pela ozonização é favorecida pelo aumento do tempo de tratamento, alta temperatura e elevada umidade do produto (41). Aflatoxina B<sub>2</sub> não é afetada enquanto que B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> são rapidamente inativadas. Torta de algodão com 0,214 µg/g de aflatoxina e 22% de umidade, tratada com ozônio a 100°C durante 2 horas, apresentou ape-

nas 0,02 µg/g. Portanto, houve uma redução de 91%, que correspondeu a 100% de inativação da aflatoxina  $B_1$ . O tratamento durante uma hora com ozônio a 100°C, de uma torta de amendoim tóxico com 30% de umidade, apresentou uma redução de 78% da toxidez. Neste caso também ocorreu 100% de inativação da aflatoxina  $B_1$  e  $G_1$ .

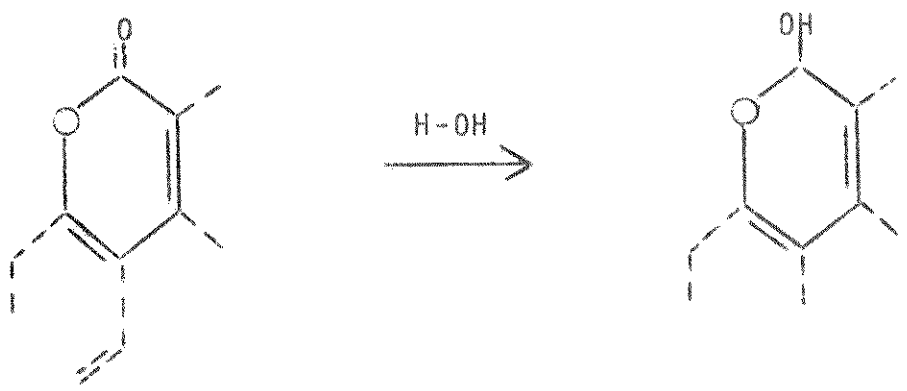
Mann e colab. (67), testando a eficiência destoxicante de mais de 60 compostos orgânicos e inorgânicos, destacando-se amônia, metilamina, hidróxido de sódio, formaldeído e anidrido succínico, verificaram que a eficiência dependia do tempo e temperatura de tratamento e da umidade do produto. O tratamento com amônia, a 100°C durante 120 minutos, removeu 77 e 34% da aflatoxina  $B_1$  respectivamente da torta de algodão e amendoim contendo 20% de umidade. A eficiência da metilamina foi aumentada quando usada juntamente com NaOH na proporção de 2:1. O formaldeído (0,5%) foi bastante eficiente, porém, o seu emprêgo não é viável economicamente. Dentre vários ácidos, anidridos, bases e agentes oxidantes testados, apenas o anidrido succínico (2%) conseguiu inativar 85% da aflatoxina presente na torta.

Trager e Stolof (100) apresentaram dois esquemas de reações hipotéticos que possivelmente ocorrem durante a inativação da aflatoxina. Para o caso das mais reativas por possuírem insaturação no anel furano terminal ( $B_1$  e  $G_1$ ), pode ocorrer adição e oxidação neste anel (veja esquema I; Figura 3) e/ou oxidação da ligação da lactona presente em tôdas as aflatoxinas (veja esquema II; Figura 3). Para o caso das aflatoxinas  $B_2$  e  $G_2$  (furano terminal saturado), provavelmente ocorre o segundo caso.





Esquema I



Esquema II

Figura 3: Esquema de reações hipotéticas na inativação da aflatoxina.

c. *Método Microbiológico*: Simulando a destoxicação por ácidos, Lindenfelser e Ciegler (65) tentaram inativar aflatoxina pela ensilagem do milho. Porém, nenhum resultado satisfatório foi obtido, provavelmente, devido à insuficiente produção de ácido lático, que é muito menos ativo do que ácido clorídrico.

Foi verificado que o amendoim contaminado com flora mista apresentava pequena quantidade de aflatoxina, o que pode ser atribuído à competição microbiana ou presença de organismos capazes de degradar a toxina (11, 87). Outros pesquisadores, enquanto estudavam condições para produção de aflatoxina, verificaram uma redução após o máximo de crescimento e produção de toxina (24, 86). Ciegler e colab. (24) verificaram uma redução brusca na toxina após 72 horas de incubação, que não era enzimica porque a inativação não dependia da concentração da toxina. Extrato sônico da cultura com 72 horas não degradava a aflatoxina. Parece que a condição essencial para ocorrer degradação é a lise do micélio, que ocorre com facilidade quando cultivado sob condição de alta aeração ou elevada temperatura (24). Esta redução assemelha-se muito à inativação pelo éster metílico peroxidado de óleo de soja. Em ambos os casos, formaram-se novos compostos com fluorescência azul concomitantemente à redução da toxidez.

Foi também verificado que na cultura de *Aspergillus parasiticus*, após 3 dias no meio de Czapeck Dox (50) com 8% de infusão de milho, ocorria uma redução brusca da aflatoxina. Porém, o mesmo fungo cultivado em arroz ou amendoim eram necessários 8 dias para ocorrer tal redução (86).

Cerca de 1.000 organismos foram testados por Ciegler

e colab. (22), quanto à capacidade de inativar aflatoxina. Verificaram que muitos fungos e esporos transformavam aflatoxina  $B_1$  em outro composto fluorescente. Certos esporos absorviam a aflatoxina, sendo porém facilmente extraída. Isolaram, também, uma bactéria, identificada como *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184, capaz de inativar aflatoxina de uma solução em 44 horas, período esse correspondente ao seu crescimento. A quantidade de aflatoxina removida aumentou com a sua concentração, porém, a percentagem de remoção diminuiu. Células altamente aberrantes apareceram quando cultivadas em meio contendo 20 a 100  $\mu\text{g}$  de toxina por ml de meio. A habilidade de destoxicação não aumentou quando as células eram cultivadas previamente em presença da toxina. Células autoclavadas também removeram aflatoxina, porém esta toxina podia ser recuperada, enquanto que das células vivas não. Portanto, concluíram que a aflatoxina provavelmente se ligava inicialmente à célula, sendo metabolizada em seguida. Destoxicação completa do leite (12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), óleo de milho (14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), manteiga de amendoim (14  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) e destoxicação parcial de soja foram conseguidas com  $2 \times 10^{13}$  células desta bactéria. Teste biológico em patos de um dia, mostrou ausência de qualquer substância tóxica nestes produtos.

Lillehoj e colab. (63) continuaram com os estudos de destoxicação da aflatoxina por *F. aurantiacum* NRRL B-184, verificando que, em concentração maior ou igual a 5 ppm de aflatoxina, o crescimento da bactéria foi inibido, aparecendo formas de aberração. Provavelmente a aflatoxina interfere na síntese da parede celular, pois dão origem a células longas divididas numa das extremidades, similarmente a ação da penicilina, que é um inibidor da síntese da parede celular. As células que crescem em concentrações sub-inibitórias de aflatoxina e as células aberrantes são mais sensíveis a ruptura sônica.

Cerca de  $10^{11}$  células vivas colocadas em presença de 7 µg/ml de aflatoxina  $B_1$ , removeram rapidamente 75% da toxina, porém, a remoção total somente ocorreu após incubação por 4 horas. O mesmo número de células autoclavadas ou o correspondente em preparado de parede celular, foi também capaz de remover, nas mesmas condições, 75% da aflatoxina, porém nenhuma remoção a mais foi verificada após períodos mais longos de incubação. Considerando o fato de que, tanto as células vivas como as autoclavadas ou o preparado de parede celular removeram a mesma percentagem inicial, os autores concluíram que provavelmente havia um equilíbrio entre célula e toxina ou que a aflatoxina  $B_1$  poderia estar presente em mais de uma forma. A aflatoxina removida pelas células autoclavadas ou pelo preparado da parede celular era facilmente recuperada, ao passo que das células vivas não era possível a recuperação. Concluiu-se, daí, que a remoção total e definitiva somente era possível com células vivas, e que a remoção seria pelo progressivo metabolismo da toxina previamente ligada à parede celular.

A temperatura e a acidez influíram na inativação da aflatoxina pelas bactérias. A remoção máxima foi verificada a 35°C e pH igual a 6,75. Lillehoj e colab. (64) verificaram que a aflatoxina  $G_1$  é também removida pela *F. aurantiacum* NRRL B-184. Neste caso, a inibição do crescimento ocorreu com concentração 2 a 3 vezes maior do que com a aflatoxina  $B_1$  e as formas de aberração somente apareceram com concentrações 20 vezes maiores. O pré-tratamento das células bacterianas com aflatoxina  $B_1$  não interferiu na capacidade de remover aflatoxina  $G_1$ , concluindo-se que o local de ação deve ser diferente.

As células em repouso ( $10^{13}$  células) remove-

ram 330 µg de aflatoxina  $G_1$  em 4 horas. O mesmo foi conseguido com células autoclavadas. A única diferença foi que, no caso de células autoclavadas, a aflatoxina foi recuperável. Daí, concluíram que aflatoxina  $G_1$  também se adsorve à célula no início, sendo, em seguida, metabolizada.

Durante o estudo do efeito antibiótico da aflatoxina à diferentes organismos, Arai e colab. (9) verificam que *Nocardia asteroides* reduzia aflatoxina. Esta inativação foi mais rápida em pH neutro, com preparado de aflatoxina cru do que com aflatoxina  $B_1$  purificada.

Mais tarde, Teunisson e Robertson (99) conseguiram isolar outro organismo capaz de inativar aflatoxina  $B_1$ , a *Tetrahymena pyriformis*, W. Somente a aflatoxina  $B_1$  era inativada. Cerca de  $22 \times 10^6$  células, colocadas em presença de 2,4 µg/ml e 2,0 µg/ml de aflatoxina  $B_1$  e  $G_1$ , respectivamente, reduziram 58% em 24 horas e 67% em 48 horas, formando um novo composto com fluorescência azul. O mesmo número de células lavadas e mantidas em meio sem nutrientes com 2 µg/ml de aflatoxina  $B_1$  e mesma concentração de  $G_1$ , reduziram 50% em 10 horas, 70% em 22 horas e 75% em 30 horas, formando também o composto fluorescente.

A aflatoxina  $B_1$  era inativada pela *T. pyriformis*, W, sem sofrer mudanças morfológicas visíveis. Porém, a aflatoxina  $G_1$  não era degradada, e produzia células anormais (arredondadas, imóveis, aparentemente mortas) após 72 horas. Não se sabe se o efeito tóxico é devido à aflatoxina  $G_1$  ou do produto resultante da interação da toxina com algum composto do meio.

Detroy e Hesselstine (34) conseguiram isolar 6 bolores capazes de reduzir a toxidez da aflatoxina  $B_1$ . São eles:

*Dactylum dendroides* NRRL 2574 e 2575, *Mucor griseo-cyanos* NRRL 3359, *Helminthosporium sativum* NRRL 3356, *Absidia repens* NRRL 1336 e *Mucor alternans* NRRL 3358. Estes bolões são hidroxilantes de esteróides pertencentes a diferentes classes e "habitat". Em 24 horas reduzem 50% da toxidez, transformando-a em uma nova substância com fluorescência azul, denominada  $R_0$ , que possui uma toxidez bastante reduzida.

A conversão máxima de 60% de aflatoxina  $B_1$  (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) foi conseguida em 72 horas, por uma cultura ativa de *Dactylum dendroides* NRRL 2575. Em 17 e 24 horas, apenas 50 e 54% da aflatoxina foi respectivamente inativada, não sendo afetado pela idade da cultura. Com uma incubação prolongada (90 a 100 horas) apareceu uma outra substância fluorescente denominada  $R_1$ , que possivelmente era o composto  $R_0$  reduzido.

O micélio de *D. dendroides*, lavado e suspenso em tampão de fosfato ou em água destilada, ao ser colocado em meio contendo 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de aflatoxina  $B_1$ , converteu 30% da toxina em 17 horas e 41% em 65 horas de incubação. Neste caso, também, houve formação do composto  $R_0$ .

O micélio lavado e homogeneizado converteu a aflatoxina, porém o mesmo não ocorreu com extrato livre de células. Daí, concluíram que a capacidade de reduzir a toxidez, mediante transformação da aflatoxina  $B_1$  a  $R_0$  e  $R_1$ , se devia à parede celular ou às ligações da membrana.

Os estudos das características das novas substâncias fluorescentes formadas,  $R_0$  e  $R_1$ , mostraram que apresen

tam o carbonilo (C=O) do anel ciclopentano reduzido (C-OH). Durante a destoxicação ácida (ácido clorídrico ou lático) da aflatoxina  $B_1$ , ela é transformada em aflatoxina  $B_{2\alpha}$  (23,65). Na destoxicação microbiológica ocorreu o mesmo para o caso dos fungos, no caso da *T. pyriformis*.W., também, ocorreu uma transformação, porém, de natureza desconhecida, ao passo que a *F. aurantiacum* parece metabolizar a aflatoxina.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### I. Materiais

Solos de diferentes regiões do Estado de São Paulo e uma torta de amendoim de procedência desconhecida, rica em aflatoxina foram utilizados como fontes dos microrganismos resistentes à aflatoxina. O tipo de solo foi bastante variável desde argiloso a arenoso.

Durante a execução deste trabalho, além do material de uso normal em laboratório de microbiologia, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- i - Aparelho para extração da aflatoxina sob refluxo.
- ii - Seringa "Hamilton", capacidade de 10 microlitros, para aplicação da amostra nas placas de cromatografia de camada delgada.
- iii - Conjunto para cromatografia em camada delgada para determinação da aflatoxina.
- iv - Câmara ultravioleta, utilizada na leitura ("Ultra Violet Products Inc.").

Aflatoxina necessária para o isolamento e teste preliminar de inativação, foi produzida por fungos do gênero *Aspergillus* já comprovados como bons produtores de toxina (70).



## II. Métodos

Técnicas adequadas e de fácil execução dentro das condições locais, foram escolhidas para a realização do presente trabalho. A exposição direta da aflatoxina à luz foi evitada durante todo o trabalho, ora pelo uso de salas adequadas, ora envolvendo os frascos com papel escuro, pois a toxina é fotossensível (7).

### 1. *Produção da Aflatoxina*

Os fungos isolados foram mantidos em cultura pura em tubos inclinados de "Czapeck agar" modificado pela adição de 20% de sacarose e 0,7% de extrato de levedura. Culturas com 1 a 3 semanas de idade foram inoculadas em frascos Fernbach de 2800 ml contendo aproximadamente 600 ml do meio YES (32). Estes frascos foram incubados a 26°C em incubadora estática, durante 8 dias, para produção da toxina.

### 2. *Extração e Dosagem da Aflatoxina*

As concentrações da aflatoxina foram determinadas pelo método de Coomes-Feuell modificado (70). Para extração da aflatoxina, um volume conhecido do material do qual se deseja extrair a toxina, foi adicionado de metanol na proporção de 60% do volume inicial, e esta mistura foi aquecida em ebulição sob refluxo durante 2 horas. A seguir, a amostra foi esfriada e procedeu-se a extração em funil de separação através de 4 lavagens sucessivas, utilizando clorofórmio

na base de 50% do volume do material para cada lavagem.

O extrato clorofórmico total foi concentrado a um volume conhecido, dependendo da quantidade de aflatoxina esperada. Esta solução concentrada foi então diluída sucessivamente até que, por tentativa, conseguiu-se a diluição que permitiu a determinação quantitativa da aflatoxina em placa cromatográfica preparada segundo Coomes-Fouell (28).

A aplicação na placa cromatográfica foi feita a 2 cm da base (linha de base), em pontos distantes cêrca de 1,5 cm um do outro e nas seguintes quantidades: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 microlitros. A seguir, a placa foi colocada na cuba de vidro saturada com o solvente clorofórmio-metanol (95:5) e fechado até que a frente do solvente tenha atingido 10 cm da linha de base. As placas foram retiradas, secadas ao ar e levadas à câmara ultravioleta para leitura. Para ajudar a saturação, foi colocado um pedaço de papel de filtro cobrindo totalmente a parede interna da cuba.

Considerando tôdas as diluições feitas a partir da solução concentrada inicial, calculou-se a concentração da aflatoxina apês conseguir um ponto na placa cromatográfica com fluorescência mìnima. Este ponto corresponde a uma quantidade de 0,0004 µg de aflatoxina B<sub>1</sub> (28).

0,01 µg / 1 µg

A aflatoxina empregada no teste de destoxicação foi, apês a extração, purificada pela precipitação com éter de petróleo, a seguir filtrada, deixando secar e redissolvida em clorofórmio puro.

Para cada placa desenvolvida com clorofórmio-metanol, uma repetição foi feita utilizando como solvente o ace-

tato de etila-metanol (3:1), para detectar um possível resultado falso (105). Além disto, as placas, após a leitura, foram novamente desenvolvidas com hexano e foi realizada uma nova leitura.

### 3. Isolamento de Microrganismos Resistentes à Aflatoxina

#### a. Preparo do Meio \*

O primeiro meio testado foi o caldo GTL (glucose-triptona-extrato de levedura). Após o seu preparo, as quantidades de 50 ml foram distribuídas em frascos Erlenmeyer de 250 ml acrescidas de 1 mg de aflatoxina  $B_1$  em solução clorofórmica, obtendo-se uma concentração final no meio de 20 µg/ml. A seguir, estes frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

O segundo meio testado foi preparado a partir do filtrado de uma cultura do fungo *Aspergillus* em meio YES (70) onde havia sido produzido a aflatoxina. Este filtrado foi padronizado, juntando-se água quando necessário, a uma concentração final de aflatoxina de 20 µg/ml e a seguir adicionou-se glucose e triptona na base de 5 g/l de cada. O meio assim obtido foi distribuído em porções de 50 ml, em frascos Erlenmeyer de 250 ml e autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

---

(\* ) Ver Apêndice para a composição e método de preparo dos meios de cultura usados no trabalho.

## *b. Isolamento*

Em cada frasco contendo os 50 ml de meio esterilizado, foi colocado 10 g do material (solo ou torta) que serviu de fonte dos microrganismos a serem isolados. A seguir, os frascos inoculados foram incubados à temperatura ambiente durante 5 dias com agitação constante em incubador com plata forma giratória a 180-200 rpm. A partir desta cultura foram isolados os microrganismos dominantes empregando-se a técnica de isolamento por estrias em placas de Petri (com quatro repetições) contendo o meio GTL-agar.

Após a incubação durante 24 horas a 30°C, determinou-se nos microrganismos dominantes, a morfologia da colônia na própria placa, morfologia da célula, reação de Gram e presença ou ausência de esporos. A seguir, estes microrganismos foram transferidos para tubos inclinados contendo meio GTL-agar ou malte-batata agar, para manutenção em cultura pura das bactérias e dos fungos respectivamente. Antes do uso destas culturas no teste de destoxicação, essas foram reativadas pela transferência em novos tubos de meio inclinado e incubados durante 2 ou 5 dias à temperatura ambiente (2 dias para bactérias e leveduras, e 5 para bolões). Daí, foram transferidas para tubos contendo 10 ml do caldo GTL e após 16 a 18 horas de incubação a 30-35°C as culturas estavam prontas para serem testadas.

## *c. Teste de Destoxicação da Aflatoxina*

Um teste preliminar, para verificar a capacidade

dos microrganismos isolados de inativar a aflatoxina, foi realizado. Para isto, testaram-se diversas técnicas utilizando meio sólido ou líquido.

O meio sólido consistia no GTL-agar modificado pela adição de 0,1% de fosfato diácido de potássio ( $KH_2PO_4$ ) e 1% de agar. A este meio, juntou-se aflatoxina  $B_2$  em solução clorofórmica para obter uma concentração final de 16  $\mu g/ml$ . Após a esterilização em autoclave, este meio foi utilizado para cultura em placas de Petri ou em lâminas. Um outro teste, utilizando-se do mesmo meio, foi feito adicionando-se a solução de aflatoxina após a esterilização. Neste caso foi necessário aquecer o meio para evaporar o clorofórmio.

O caldo GTL foi utilizado para o teste de destoxicação em tubo. A solução clorofórmica de aflatoxina foi adicionada ao meio visando obter uma concentração de 16  $\mu g/ml$ . Como no caso anterior a adição da aflatoxina foi feita antes e após a esterilização, sendo que quando se empregava a segunda alternativa, era necessário aquecer os tubos para evaporar o clorofórmio.

Numa tentativa de encontrar um teste em que fôsse fácil a evaporação do clorofórmio, foi utilizado papel de filtro que havia sido previamente impregnado com uma solução clorofórmica de aflatoxina de concentração conhecida. Este papel, após a evaporação do clorofórmio, foi colocado em placa de Petri de 6 cm de diâmetro, adicionando-se sobre esse 3 ml de caldo GTL contendo o microrganismo em desenvolvimento.

Finalmente, utilizou-se da placa de Petri de 6 cm

de diâmetro, preparada pela adição de 3ml de uma solução clorofórmica com 16 µg/ml de aflatoxina  $B_1$ . Para evaporação do clorofórmio, esta placa foi colocada sobre uma chapa com aquecimento moderado, evitando-se uma ebulição violenta, que poderia acarretar perda da toxina. Com a evaporação do clorofórmio, formou-se uma 'película' de aflatoxina, cobrindo-se o fundo da placa. Nesta placa assim obtida, foi adicionado 3 ml do caldo GTL, contendo o microrganismo em desenvolvimento. Desta forma, a concentração final da aflatoxina na placa voltou a ser 16 µg/ml.

Após a incubação por 24 horas a 30-35°C, foram adicionadas 10 ml de clorofórmio puro na placa, agitando-se, a seguir, cuidadosamente com a mesma pipeta. Uma alíquota de 0,1 ml da solução clorofórmica foi retirada e colocada num tubo de ensaio contendo pequena quantidade de sulfato de sódio anidro ( $Na_2SO_4$ ), no qual adicionou-se 9,9 ml de clorofórmio puro. Esta solução foi utilizada para dosagem da aflatoxina. Para isto, foi aplicada, na placa cromatográfica em camada delgada, as quantidades de 1 a 5 gotas e desenvolvidas conforme já descrito.

Os resultados das dosagens da aflatoxina remanescente nos testes de destoxicação foram registrados considerando-se a intensidade da fluorescência segundo a escala apresentada no quadro I. Desta forma, o ensaio em branco, onde o meio com aflatoxina não foi inoculado com nenhum microrganismo, representou a fluorescência máxima, recebendo arbitrariamente, o valor 10. Por outro lado, o ensaio onde somente havia meio de cultura a fluorescência foi nula, sendo portanto, o valor 0. As intensidades de fluorescência entre 0 e 10 receberam valores de 1 a 9 que correspondiam a aproximadamente 10 a 90% da aflatoxina empregada. Quanto menor a quantidade de aflatoxina encontrada maior seria a destoxi-

cação verificada, assim sendo os valores de 1 a 9 correspon-  
diam aproximadamente de 90 a 10% de destoxicação, respectiva-  
mente.

Quadro I

Escala de valores arbitrários para dosagem da aflatoxina  
no teste de destoxicação e seu correspondente percentual  
de toxina remanescente

Fluorescência	% de Destoxicação
10	0
9	10
8	20
7	30
6	40
5	50
4	60
3	70
2	80
1	90
0	100

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando-se o meio de "enriquecimento", contendo aflatoxina, foi possível obter culturas de microrganismos resistentes a essa toxina. Essa propriedade é bastante importante sob aspecto prático, uma vez que dificilmente poder-se-ia usar um microrganismo suscetível à toxina como agente de destoxicação na torta ou outro produto agropecuário.

Nessa condição de "enriquecimento", os microrganismos suscetíveis foram inibidos ou destruídos durante a incubação, enquanto que os resistentes conseguiram se multiplicar. Consequentemente, os organismos que produziram colônias em placas de Petri após a transferência das células do meio de "enriquecimento" eram quase todas resistentes à aflatoxina.

Foram testados dois meios de "enriquecimento". O primeiro foi o caldo GTL, ao qual adicionou-se uma solução clorofórmica de aflatoxina para obter uma concentração final de 20 µg/ml. A seguir este meio foi esterilizado em autoclave. O segundo meio utilizado foi o meio YES, onde o fungo tinha se desenvolvido para produzir a aflatoxina. A seguir, a cultura foi filtrada, padronizada para 20 µg/ml de aflatoxina e acrescida de glucose e triptona na proporção de 5 g/l de cada. Finalmente, o meio foi esterilizado em autoclave.

A fim de verificar se a autoclavagem tinha alguma influência na concentração da aflatoxina, foram feitas determinações antes e após a esterilização do meio. Verificou-se que não havia alteração. O segundo meio apresentou um resul



tado mais adequado porque a aflatoxina ficava uniformemente distribuída, ao passo que, no primeiro, a distribuição não era uniforme, dando, por conseguinte, um crescimento desigual dos microrganismos.

Os resultados do isolamento em placas de Petri após 1, 2, 5, 10, 15 e 20 dias de incubação mostraram que 5 dias de contacto entre a fonte de microrganismos e a aflatoxina foram suficientes para a seleção dos resistentes. Os microrganismos predominantes após 5 dias foram os mesmos encontrados até o décimo dia, após o qual notou-se, além do aumento em número, o aumento em espécies bem como o aparecimento de bolões.

Este aumento de microrganismos após o décimo dia pode ser devido à degradação da aflatoxina ou possivelmente à resistência adquirida por parte de alguns deles.

Durante o primeiro e o segundo dia de incubação verificou-se que os microrganismos (em número e espécie) foram praticamente os mesmos encontrados no frasco sem a aflatoxina (contrôle). Portanto, este período não foi suficiente para que os microrganismos sensíveis ou pouco resistentes fossem inibidos, ou destruídos pela toxina.

Os resultados da dosagem quantitativa de aflatoxina dos frascos contendo somente meio com toxina, mostraram que durante os 5 dias de incubação não houve nenhuma alteração na concentração da aflatoxina, desde que os frascos fossem incubados em ambiente escuro. A temperatura de incubação foi de 30 - 35°C visando o isolamento de microrganismos mesófilos.

Durante a dosagem da aflatoxina, foi verificada a influência do solvente, da camada de sílica gel e da saturação da cuba na resolução e no *Rf*. O solvente deve ser de preparação recente, pois com solvente preparado 24 horas antes, já se observaram resultados completamente diferentes, o que possivelmente se deve à variação na concentração dos componentes. Pequenas variações na resolução e no *Rf*, também foram observadas quando a cuba não estava totalmente saturada ou quando havia umidade na camada de sílica gel, resultante da secagem incompleta ou reabsorção de umidade. A espessura da camada também afetou o *Rf*, principalmente quando o solvente usado foi o clorofórmio-metanol.

Nenhum deslocamento da mancha fluorescente da aflatoxina foi observado quando uma placa com a toxina já separada pelo solvente clorofórmio-metanol (95:5) ou acetato de etila-metanol (3:1) foi colocada em cuba com hexano. Isso era de se esperar, uma vez que a toxina é insolúvel neste solvente.

No quadro II estão agrupados, de acordo com algumas de suas características, 42 fungos e 51 bactérias, que foram isolados após incubação durante 5 dias em meio contendo 20 µg/ml de aflatoxina  $B_1$ .

Dentre os fungos isolados, 31 eram leveduras e 11 eram bolores. As bactérias, todas em bastonete, sendo 27 produtoras de esporos, se distinguiram quanto à reação de Gram em: 26 Gram positivas, 16 Gram negativas e 9 Gram variáveis. Não foi encontrada nenhuma bactéria em forma de cocos, indicando que as bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* e as láticas são provavelmente sensíveis à aflatoxina.

Dos resultados do quadro II pode-se concluir que as bactérias Gram positivas eram possivelmente as mais resistentes à aflatoxina. Não houve diferença entre as bactérias Gram positivas produtoras de esporos e as não produtoras, porém entre as Gram negativas as produtoras de esporos apresentaram-se mais resistentes. Comparando-se as esporogênicas com as não esporogênicas, pode-se concluir que foram todos praticamente iguais.

Quadro II

Microrganismos resistentes à aflatoxina isolados de solos de diferentes regiões do Estado de São Paulo e da torta de amendoim.

Microrganismos	Número de culturas isoladas
<u>Bactérias</u>	
1. Gram	
Positivas . . . . .	26
Negativas . . . . .	16
Variáveis . . . . .	9
Total . . . . .	51
2. Esporogênicas, Gram	
Positivas . . . . .	13
ⓐ Gram Negativas . . . . .	11
Gram Variáveis . . . . .	3
Total . . . . .	27
3. Não Esporogênicas, Gram	
Positivas . . . . .	13
Gram Negativas . . . . .	5
Gram Variáveis . . . . .	6
Total . . . . .	24
<u>Fungos</u>	
Leveduras . . . . .	31
Bolores . . . . .	11
Total . . . . .	42

*13. de 1951*

Verificando-se as características morfológicas e a reação de Gram pode-se concluir que as bactérias esporogênicas pertencem ao gênero *Bacillus*, enquanto que as Gram positivas não esporogênicas podem ser representantes dos gêneros: *Arthrobacter*, *Corynebacterium* ou *Propionibacterium* e as Gram negativas não esporogênicas provavelmente dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter* ou *Aeromonas*.

Estes resultados discordam com os de Burmeister e Hesselstine (18), porém concordam com as conclusões de Arai e colab. (9) que afirmam que a aflatoxina não exerce ação inibidora contra uma série de microrganismos Gram positivos e Gram negativos. Algumas das bactérias que desenvolveram nas placas de Petri, apresentaram formas ligeiramente anormais, alongadas ou arredondadas e raramente formas filamentosas. As leveduras raramente apresentaram essas formas anormais, indicando que são mais resistentes.

As culturas isoladas em presença de aflatoxina foram consideradas resistentes à mesma, restando então verificar se possuíam capacidade de inativar a toxina. Para isto, foram testadas várias técnicas procurando cultivar o microrganismo em presença de uma concentração conhecida de aflatoxina. Após a incubação por 24 horas à temperatura de 30 - 35°C a toxina foi extraída e dosada a fim de detectar um possível decréscimo na sua concentração durante o período de contacto entre o microrganismo e a aflatoxina.

O primeiro problema consistiu em encontrar um meio de cultura que permitisse a adição de aflatoxina, que fôsse apropriado ao cultivo e que possibilitasse facilmente a extração da toxina para dosagem, após a incubação.

Iniciou-se testando o meio sólido (GTL-agar modificado) que foi utilizado tanto em cultura na placa de Petri como em lâmina. A adição da aflatoxina ao meio foi testada antes e após a esterilização em autoclave. Quando a solução clorofórmica da toxina era adicionada antes, a evaporação do clorofórmio ocorria durante a própria esterilização, ao passo que quando a adição era feita após a esterilização, a sua evaporação era feita através do aquecimento em banho-maria.

A intenção do emprêgo de meio sólido foi a de verificar a possibilidade de determinar a ação destoxicante através da leitura da fluorescência diretamente no meio após o cultivo do microrganismo a ser testado, que possivelmente formaria um halo não fluorescente em tórno da cultura, caso esta fôsse capaz de inativar a aflatoxina. Todavia a verificação da fluorescência correspondente à aflatoxina no meio não foi viável, pois o próprio meio já possuía substâncias fluorescentes na sua composição.

A extração da aflatoxina de um meio líquido (caldo GTL) é muito mais fácil do que de meio sólido e além disso não apresentou nenhuma substância fluorescente que interferisse na dosagem da toxina. Porém, a cultura líquida em tubo apresentou uma grande dificuldade na evaporação do clorofórmio, quando a solução da toxina era adicionada após a esterilização. Adicionando-se antes da esterilização, o clorofórmio era evaporado durante êste tratamento, porém observou-se uma redução no volume do meio. O uso de papel de filtro com aflatoxina, preparada pela absorção de uma solução clorofórmica de concentração conhecida não foi satisfatório, em virtude da dificuldade em obter um papel com a concentração desejada de aflatoxina. Além disso, houve interferência no crescimento da cultura, possivelmente devido a al-

guma substância do papel ou ao composto resultante da ação do clorofórmio no papel.

Dentre todos os métodos testados para avaliar a capacidade dos microrganismos de inativar a aflatoxina, o único satisfatório foi aquele empregando as placas de Petri de 6 cm de diâmetro onde o microrganismo em crescimento ativo era colocado sobre uma "película" da toxina previamente preparada no fungo da placa. Essa "película" foi obtida pela evaporação na placa de 3 ml de uma solução clorofórmica com 16 µg/ml de aflatoxina  $B_1$ . Apesar da aflatoxina não se dissolver completamente na cultura adicionada, havia um bom contacto entre a cultura e a toxina. Todos os inconvenientes encontrados nos outros métodos na evaporação do clorofórmio, neste, deixaram de existir, visto que esta operação era feita antes da adição do meio. Além disso, a recuperação da aflatoxina remanescente após a incubação com o microrganismo a ser testado era bastante facilitada.

Os resultados preliminares da destoxicação de aflatoxina estão apresentados nos quadros III e IV, onde os diferentes níveis de aflatoxina remanescentes em cada placa foram apresentados em uma escala numérica, arbitrariamente escolhida de 0 a 10. O valor 10 seria dado à fluorescência de máxima intensidade, correspondente à quantidade da toxina recuperável das placas sem a adição de cultura, e 0 à fluorescência nula. Os valores intermediários de 9 a 1 correspondiam às intensidades decrescentes de fluorescência. As quantidades de aflatoxina remanescentes representadas em porcentagens correspondiam aproximadamente de 100% a 0%.

Os resultados do quadro III mostram que dentre as 51 culturas de bactérias isoladas como resistentes à aflato-

xina, 43 (84%) reduziram esta toxina quando incubadas em sua presença na concentração de 16 µg/ml, durante 24 horas a 30 - 35°C. Mais de 40% da aflatoxina foi inativada por 10 culturas, mas a redução de 60% foi conseguida apenas por uma bactéria.

Os mesmos testes, quando efetuados com as leveduras, mostraram que dentre as 31 culturas isoladas, 26 (84%) conseguiram reduzir aflatoxina em quantidades que variaram de 10 a 60%. Dentre as culturas aptas a inativar esta toxina, 4 delas reduziram mais do que 40% e apenas uma cultura conseguiu reduzir 60%.

### Quadro III

Teste preliminar de destoxicação da aflatoxina  $B_1$   
por bactérias, bolores e leveduras isoladas. <sup>1</sup>

% de Redução (*)	Microrganismos resistentes à aflatoxina		
	Bactérias	Leveduras	Bolôres
0	8	5	0
10	8	6	0
20	11	10	2
30	14	6	4
40	6	2	3
50	3	1	1
60	1	1	1
70	0	0	0
80	0	0	0
90	0	0	0
100	0	0	0
Total	51	31	11

(\*) Valores comparativos correspondentes à redução da aflatoxina.

Jã os resultados obtidos com os bolõres, nas mesmas condições, mostraram que dentre as 11 culturas isoladas, tõdas reduziã a aflatoxina. Cinco delas reduziram mais do que 40% e apenas uma cultura conseguiu reduçãõ de 60%.

Em face dẽstes resultados, pode-se concluir que, dentre os microrganismos testados nas condições descritas, a pesar de terem as bactẽrias e as leveduras conseguido tambẽm a reduçãõ de atẽ 60%, os bolõres, de um modo geral, possuĩram maior atividade destoxicante da aflatoxina. Mais de 40% da toxina foi reduzida por 45% dos bolõres, 20% das bactẽrias e sõmente 13% das leveduras.

As 51 bactẽrias resistentes ã aflatoxina isoladas estãõ distribuĩdas no quadro IV de acõrdo com a reaçãõ de Gram, produçãõ de esporos e capacidade de reduzir aflatoxina. Quando se considera a reaçãõ de Gram, pode-se concluir que as bactẽrias Gram positivas, apesar de apresentarem uma maior percentagem (27%) de microrganismos cuja reduçãõ foi nula, apresentaram os melhores resultados em relaçãõ ã destoxicaçãõ. Reduções de mais de 40% foram conseguidas por 6 culturas (23%) e dentre elas uma conseguiu reduzir atẽ 60%. Quanto ãs Gram negativas e as Gram variãveis, os resultados mostraram que as reduções mãximas atingidas foram 50 e 40%, respectivamente. Considerando-se a caracterĩstica de produzir esporos, verificou-se a superioridade do grupo de bactẽrias esporogẽnias exceto para as Gram variãveis.



Quadro IV

Teste preliminar de destoxicação da aflatoxina  $B_1$  pelas  
bactérias isoladas. Total de 51 bactérias.

% de redução (*)	Reação de Gram			Esporuladas Gram			Não esporuladas Gram		
	+	-	v	+	-	v	+	-	v
0	7	1	0	2	1	0	5	0	0
10	2	5	1	1	2	1	1	3	0
20	5	2	4	3	1	2	2	1	2
30	6	5	3	3	4	0	3	1	3
40	3	2	1	2	2	0	1	0	1
50	2	1	0	1	1	0	1	0	0
60	1	0	0	1	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
	51			27			24		

(\*) Valores comparativos correspondentes a redução da aflatoxina.

Deve-se mencionar que os resultados da destoxicação acima discutidos não representam a capacidade máxima que esses microrganismos possuem de reduzir a aflatoxina, pois o período de incubação foi de apenas 24 horas, quando diversos

autores utilizaram um período de 96 horas ou mais. Este trabalho foi dedicado ao isolamento de microrganismos resistentes, sendo o teste de destoxicação apenas uma seleção preliminar daqueles que realmente apresentam interêsse na aplicação como destoxicantes de aflatoxina.

## CONCLUSÕES

1. O meio de "enriquecimento" preparado pela modificação do meio líquido YES, onde aflatoxina tinha sido produzida pelos fungos, foi mais adequado para conseguir o isolamento de microrganismos resistentes à toxina do que aquele em que a toxina era adicionada.
2. O contato entre a fonte de microrganismos e a aflatoxina durante 5 dias, nas condições do trabalho, foi suficiente para selecionar os organismos resistentes.
3. Verificou-se melhor precisão na dosagem da aflatoxina, quando o solvente clorofórmio-metanol (95:5) foi preparado recentemente.
4. Dentre os organismos existentes no solo e na torta de amendoim as bactérias em bastonete Gram positivas mostraram ser as mais resistentes. As bactérias em forma de cocos apresentaram-se suscetíveis à aflatoxina e dentre as bactérias Gram negativas (em bastonete), as esporogênias mostraram ser as mais resistentes.
5. A adição de cultura ativa do microrganismo em caldo GTL a uma placa de Petri de 6 cm de diâmetro contendo aflatoxina (16 µg/ml) foi um método fácil e rápido para a verificação da capacidade destoxicante dos microrganismos.

6. Dentre os microrganismos testados quanto à capacidade de destoxicar a aflatoxina os bolões apresentaram-se mais ativos, seguidos das bactérias e das leveduras.
7. Nas condições do trabalho, dentre as bactérias, as Gram positivas esporogênicas foram as mais ativas na inativação da aflatoxina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adye, J.C. e Mateles, R.I. 1964. Incorporation of Labelled compounds into aflatoxins. *Biochem. Biophys. Acta* 86: 418-420.
2. Allcroft, R. 1965. Aspects of aflatoxicosis in farm animals. In "Mycotoxins in Foodstuffs", G.N. Wogan (Ed). The MIT Press, Cambridge, Mass. 153-162.
3. Allcroft, R. e Carnaghan, R.B.A. 1962. Groundnut toxicity. *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: Preliminary communications. *Vet. Rec.* 74: 863-864.
4. Allcroft, R. e Carnaghan, R.B.A. 1963. Toxic products in groundnuts. Biological effects. *Chem. Ind.* 2: 50-53.
5. Allcroft, R., Carnaghan, R. B. A., Sargeant, K. e O'Kelly, J. 1961. A toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.* 73: 428-429.
6. Allcroft, R. e Lewis, G. 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of the "Milk Toxin". *Nature* 209: 154-155.
7. Andrellos, P.J., Beckwith, A.C. e Eppley, R.M. 1967. Photochemical changes of aflatoxin  $B_1$ . *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 50: 346-350.

↓  
Anual.

8. Andreellos, P.J. e Reid, G.R. 1964. Confirmatory tests for aflatoxin  $B_1$ . J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 47: 801-803.
9. Arai, T., Ito, T. e Koyama, Y. 1967. Antimicrobial activity of aflatoxins. J. Bacteriol. 93: 59-65.
10. Asao, T., Büchi, G., Abdel-Karder, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. e Wogan, G.N. 1963. Aflatoxin B and G. J. Amer. Chem. Soc. 85: 1706-1707.
11. Ashworth Jr., L.J., Schroeder, H.W. e Langley, B.C. 1965. Aflatoxins: Environmental factors governing occurrence in Spanish peanuts. Science 148: 1228-1229.
12. Asplin, F.D. e Carnaghan, R.B.A. 1961. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Vet. Rec. 73: 1215-1219.
13. Ayres, J.L. e Sinnhuber, R.O. 1966. Fluorodensitometry of aflatoxins on thin layers plates. J. Amer. Oil Chem. Soc. 43: 423-424.
14. Bampton, S.S. 1963. Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. Tropical Science 5: 74-81.
15. Biollaz, M., Büchi, G. e Milne, G. 1970. The biosynthesis of the aflatoxins. J. Amer. Chem. Soc. 92: 1035-1043.

16. Blount, W.P. 1961. The X Disease Mystery. Agr. Merchant 41: 85-88.
17. Blount, W.P. 1961. Turkey "X" Disease. Turkeys 9: 52, 55-58, 61 e 67.
18. Burmeister, H.R. e Hesseltine, C.W. 1966. Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin. Appl. Microbiol. 14: 403-404.
19. Campbell, T.C., Caeds Jr., J.P., Bulatao-Jayme, J., Salamat, L. e Engel, R.W. 1970. Aflatoxin  $M_1$  in human urine. Nature 227: 403-404.
20. Carnaghan, R.B.A., Hartley, R.D. e O'Kelly, J. 1963. Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins (*Aspergillus flavus*). Nature 200: 1101.
21. Carnaghan, R.B.A. e Sargeant, K. 1961. The toxicity of certain groundnut meals to poultry. Vet. Rec. 73: 726-727.
22. Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E. e Hall, H.H. 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14: 934-939.
23. Ciegler, A. e Peterson, R.E. 1968. Aflatoxin detoxification. Hydroxydihydro aflatoxin  $B_1$ . Appl. Microbiol. 16: 665-666.
24. Ciegler, A., Peterson, R.E., Lagoda, A.A. e Hall, H.H. 1966. Aflatoxin production and degradation by *Aspergillus flavus* in 20-liter fermentors. Appl. Microbiol. 14: 826-833.

25. Clifford, J. I. e Riss, K. R. 1967. The Action of aflatoxin  $B_1$  on the rat liver. *Biochem. J.* 102: 65-75.
26. Codner, R.C., Sargeant, K. e Yeo, R. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Bio-technol. Bioeng.* 5: 185-192.
27. Coomes, T.J., Crowther, P.C., Feuelli, A. J. e Francis, B.J. 1966. Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. *Nature* 209: 406-407.
- X 28. Coomes, T.J. e Feuelli, A.J. 1965. Recommended Procedures for the detection and estimation of aflatoxin  $B_1$  in groundnuts and groundnut materials. Report N° G 13. Tropical Products Inst. Ministry of Overseas Develop. Londres, 24 p.
29. Cucullu, A.F., Lee, L.S., Mayne, R.Y. e Goldblatt, L.A. 1966. Determination of aflatoxins in individual peanuts and peanut sections. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 43: 89-92.
30. Dalezious, J., Wogan, G.N. e Weinreb, S.M. 1971. Aflatoxin  $P_1$  - New aflatoxin metabolite in monkeys. *Science* 171: 584-585.
31. Davis, N.D. e Diener, U.L. 1968. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. *Appl. Microbiol.* 16: 158-159.



32. Davis, N.D., Diener, U.L. e Eldridge, D.W. 1966. Production of aflatoxins  $B_1$  and  $G_1$  by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. Appl. Microbiol. 14: 378-380.
33. De Jongh, H., Beerthuis, R.K. Vles, R.O., Barret, C.B., e Ord, W.O. 1962. Investigation of the factor in groundnut meals responsible for turkey X disease. Biochem. Biophys. Acta 65: 548-555.
34. Detroy, R.W. e Hesseltine, C.W. 1969. Transformation of aflatoxin  $B_1$  by steroid-hydroxylating fungi. Can. J. Microbiol. 15: 495-500.
35. Diener, U.L. 1960. The mycoflora of peanuts in storage. Phytopathol. 50: 220-223.
36. Diener, U.L. 1966. Toxic and nontoxic molds found in food materials. Bot. and Plant Pathol. Dept. Agr. Expt. Stat., Auburn Univer., Alabama. 4p.
37. Diener, U.L. e Davis, N.D. 1966. Aflatoxin - Serious problem in seeds, feeds and food crops. Highlights of Agr. Res. Publ., 13: (3), Agr. Expt. St. Auburn Univer., Auburn, Alabama. 1p.
38. Diener, U.L. e Davis, N.D. 1967. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. J. Amer. Oil Chem. Soc. 44: 259-263.

39. Doller, F. G., Mann, G. E., Codfer Jr. L. P., Gardner Jr., H. K., Koltun, S.P. e Vix, H.L.E. 1968. Elimination of aflatoxins from peanut meal. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45: 862-865.
40. Dutton, M.F. e Heathcote, J.G. 1966. Two new hydroxy-aflatoxins. Biochem. J. 101: 21p-22p.
41. Dwarakanath, C.T., Rayner, E.T., Mann, G.E. e Doller, F.G. 1968. Reduction of aflatoxins levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45: 93-95.
42. Engebrecht, R.H., Ayres, J.L. e Sinnhuber, R.O. 1965. Isolation and determination of aflatoxin  $B_1$  in cottonseed meals. J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 48: 815-818.
43. Feuill, A.J. 1966. Aflatoxin in groundnuts. Part IX - Problems of detoxification. Tropical Science 8: 61-70.
44. Fischbach, H. e Campbell, A.D. 1965. Note on detoxification of the aflatoxins. J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 48: 28.
45. Fonseca, H. 1968. Contribuição ao estudo da ocorrência de aflatoxina em tortas, fardos e farinhas de amendoim (*Arachis hypogaea*, L) do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 64p.

46. Fonseca, H. e Del Nery, H. 1968. Ocorrência de aflatoxi  
na em pastas de amendoim (*Arachis hypogaea*, L). A-  
presentado ao IV Simpósio Brasileiro de Cromatogra  
fia, Curitiba, Pr.
47. Gabliks, J., Schaeffer, W., Friedman, L. e Wogan, G.N.  
1965. Effect of aflatoxin  $B_1$  on cell cultures.  
J. Bacteriol. 90: 720-723.
48. Goldblatt, L.A. 1965. Removal of aflatoxin from peanut  
products with acetone-hexane-water solvent. In  
"Mycotoxins in Foodstuffs", G.N. Wogan (Ed). The  
MIT Press, Cambridge, Mass. 261-263.
49. Goldblatt, L.A. 1968. Aflatoxin and its Control.  
Economic Botany 22: 51-62.
50. Harrigan, W.F. e McCance, M.E. 1966. "Laboratory methods  
in Microbiology". Academic Press, London, New York.  
362p.
51. Hartley, R.D., Nesbitt, B.E. e O'Kelly, J. 1963. Toxic  
metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature 198:  
1056-1058.
52. Heathcote, J.C., Child, J.J. e Dutton, M.F. 1965. The  
possible role of kojic acid in the production of  
aflatoxin by *Aspergillus flavus*. Biochem. J. 95:  
23p.
53. Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Ellis, J. J.,  
Stubblefield, R. D. 1966. Aflatoxin formation by  
*Aspergillus flavus*. Bacteriological Rev. 30: 795-805.

54. Hiscocks, E.S. 1965. The importance of molds in the deterioration of tropical foods and feedstuffs. In "Mycotoxins in Foodstuffs", G. N. Wogan (Ed). The MIT Press, Cambridge, Mass. 15-26.
55. Hodges, F.A., Zust, J.R., Smith, H.R., Nelson, A.A., Armbrecht, B.H. e Campbell, A.D. 1964. Mycotoxins: Aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*, Bainer. Science 146: 1439.
56. Holker, J.S.E. e Underwood, J.G. 1964. A synthesis of a cyclopentenocoumarin structurally related to aflatoxin B. Chem. Ind. 45: 1865.
57. Holzappel, C.W., Steyn, P.S. e Purchase, I.F.H. 1966. Isolation and structure of aflatoxins  $M_1$  and  $M_2$ . Tetrahedron Letters 25: 2799-2803.
58. Jayaraman, A., Herbst, E.J. e Ikawa, M. 1968. The bioassay of aflatoxins and related substances with *Bacillus megaterium* spores and chick embryos. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45: 700-702.
59. Kulik, M.M. e Holaday, C.E. 1966. Aflatoxin: A metabolic product of several fungi. Mycopatologia Mycologia Applicata 30: 137-140.
60. Lancaster, M.C., Jenkins, F.P. e Philip, J. McL. 1961. Toxicity associated with certain samples of ground nut. Nature 192: 1095-1096.
61. Legator, M. 1966. Biological effects of aflatoxin in cell culture. Bacteriological Rev. 30: 471-477.

62. Lillehoj, E.B. e Ciegler, A. 1969. Biological Activity of aflatoxin  $B_{2\alpha}$ . *Appl. Microbiol.* 17: 516-519.
63. Lillehoj E.E., Ciegler, A. e Hall, H. H. 1967. Aflatoxin  $B_1$  uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects. *J. Bacteriol.* 93: 464-471.
64. Lillehoj, E. B., Ciegler, A. e Hall, H. H. 1967. Aflatoxin  $G_1$  uptake by cells of *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects. *Can. J. Microbiol.* 13: 629-632.
65. Lindenfelser, L. A. e Ciegler, A. 1970. Studies on aflatoxin detoxification in shelled corn by ensiling. *J. Agr. Food Chem.* 18: 640-643.
66. Mann, G.E., Codifer Jr., L.P. e Doller, F.G. 1967. Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals. *J. Agr. and Food Chem.* 15: 1090-1092.
67. Mann, G.E., Codifer Jr., L.P., Gardner Jr., H. K., Koltun, S.P. e Doller, F.G. 1970. Chemical inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 47: 173-176.
68. Moody, D.P. 1964. Biogenetic hypotheses for aflatoxin. *Nature* 202: 185.
69. Nabney, J. e Nesbitt, B.F. 1965. A spectrophotometric method for determining the aflatoxins. *Analyst* 90: 155-160.

- x 70. Nakamura, H. e Yokoya, F. 1970. Comparação da capacidade de sintetizar aflatoxina entre vários fungos do gênero *Aspergillus*. Rev. Bras. de Tecnol. 1: 81-86.
71. Nesbitt, B.F., O'Kelly, J., Sargeant, K. e Sheridan, A. 1962. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature 195: 1062-1063.
72. Pettit, R.E. e Taber, R.A. 1968. Factors influencing aflatoxin accumulation in peanut kernels and the associated mycoflora. Appl. Microbiol. 16: 1230-1234.
73. Platonow, N. 1964. Effect of prolonged feeding of toxic groundnut meal in mice. Vet. Rec. 76: 589-590.
74. Pons Jr., W. A. 1969. Collaborative study on the determination of aflatoxins in cottonseed products. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 52: 61-72.
75. Pons Jr., W. A., Cucullu, A.F., Franz Jr., A. O. e Goldblatt, L. A. 1968. Improved objective fluorodensitometric determination of aflatoxins in cottonseed products. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45: 694-699.
76. Pons Jr., W.A. e Eaves, P.H. 1967. Aqueous-acetone extraction of cottonseed. J. Amer. Oil Chem. Soc. 44: 460-464.
77. Pons Jr., W.A. e Goldblatt, L.A. 1965. The determination of aflatoxins in cottonseed products. J. Amer. Oil Chem. Soc. 42: 471-475.

78. Pons Jr., W.A., Robertson, J.A. e Goldblatt, L.A. 1966. Objective fluorometric measurement of aflatoxins on TLC plates. J. Amer. Oil Chem. Soc. 43:665-669.
79. Protein Advisory Group FAO, WHO and UNICEF. 1967. Feedstuffs 39: 8.
80. Purchase, I.F.H. 1967. Acute toxicity of aflatoxins  $M_1$  and  $M_2$  in one-day-old ducklings. Food Cosmet. Toxicol. 5: 339-342.
81. Rayner, E.T. e Dollear, F.G. 1968. Removal of aflatoxins from oilseed meals by extraction with aqueous-isopropanol. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45: 622-624.
82. Rayner, E.T., Dollear, F.G. e Codifer Jr., L.P. 1970. Extraction of aflatoxins from cottonseed and peanut meals with ethanol. J. Amer. Oil Chem. Soc. 47: 26.
83. Sanders, T.H., Davis, M.D. e Diener, U.L. 1968. Effect of carbon dioxide, temperature and relative humidity on production of aflatoxin in peanuts. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45: 683-685.
84. Sargeant, K., Allcroft, R. e Carnaghan, R.B.A. 1961. Groundnut toxicity. Vet. Rec. 73: 865.
85. Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J. e Carnaghan, R.B.A. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature 192: 1096-1097.
86. Schroeder, H.W. 1966. Effect of corn steep liquor on micelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. Appl. Microbiol. 14: 381-385.

87. Schroeder, H.W. e Ashworth Jr., L.J. 1965. Aflatoxin in Spanish peanuts in relation to pod and kernel conditions. *Phytopathol.* 55: 464-465.
88. Schroeder, H.W. e Hein Jr., H. 1967. Aflatoxins: Production of the toxins in vitro in relation to temperature. *Appl. Microbiol.* 15: 441-445.
89. Schroeder, H.W. e Verret, M.J. 1969. Production of aflatoxin by *Aspergillus wentii*, Wehmer. *Can. J. Microbiol.* 15: 895-898.
90. Scott, P.M., Van Valbeek, W. e Forgacs, J. 1967. Formation of aflatoxins by *Aspergillus ostianus*, Wehmer. *Appl. Microbiol.* 15: 945.
91. Shoental, R. 1967. Aflatoxins. In "Annual Review of Pharmacology". 7: 343-356.
92. Shotwell, O.L., Hesselstine, C.W., Stubblefield, R.D. e Sorenson, W.G. 1966. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425-428.
93. Smith, K.M. 1960. Disease of Turkey poults. *Vet. Rec.* 72: 652.
94. Sreenivasamurthy, V., Jayaraman, A., Parpia, H.A.B. 1965. Aflatoxin in indian peanuts: Analysis and extraction. In "Mycotoxins in Foodstuffs", G.N. Wogan (Ed). The MIT Press, Cambridge, Mass. 251-260.



95. Sreenivasamurthy, V., Parpia, H.A.R., Srikanta, S. e Shankar, M. 1967. Detoxification of aflatoxin in peanut meal by hydrogen peroxide. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 50: 350-354.
96. Stevens, A.J., Saunders, C.N., Spence, J.B. e Newnham, A.G. 1960. Investigations into "Disease" of turkey poults. Vet. Rec. 72: 627-628.
97. Stubblefield, R.D., Shotwell, O.L. e Shannon, G.M. 1968. Aflatoxins  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  and  $G_2$ : Separation and purification. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45: 686-688.
98. Tango, J.S., Menezes, T.J.B. e Teixeira, C.G. 1965. Levantamento da ocorrência de aflatoxina em sementes de amendoim nas safras das águas e da seca. Coletânea do Inst. Tecnol. Alimentos 1: 1-11.
99. Teunisson, T.J. e Robertson, J.A. 1967. Degradation of pure aflatoxins by *Tetrahymena pyriformis*. Appl. Microbiol. 15: 1099-1103.
100. Trager, W. e Stoloff, L. 1967. Possible reactions for aflatoxin detoxification. J. Agr. Food Chem. 15: 679-681.
101. Tropical Products Institute. Aflatoxin in groundnuts and groundnut products. Interpretation of physico-chemical and biological test results. Ministry of Overseas Development. 1p.

102. Van der Zijden, A.S.M., Koelensmid, W.A.A., Boldingh, J., Barret, C.B., Ord, W.O. e Philp, J. 1962. *Aspergillus flavus* and "Turkey X Disease". Isolation in crystalline form of a toxin responsible for "Turkey X Disease". Nature 195: 1060-1062.
103. Vorster, L.J. 1966. Studies on the detoxification of peanuts contaminated by aflatoxin. Rev. Fr. Corps Gras. 13: 7-12.
104. Wogan, G.N. 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bacteriological Rev. 30: 460: -470.
- ✓ 105. Yokotsuka, T., Sasaki, M., Kikuki, T., Asao, Y. e Nobuhara, A. 1967. Production of fluorescence compounds other than aflatoxins by japanese industrial molds. In "Biochemistry of some Food borne Microbial Toxins", R.I. Mateles e G.N. Wogan (Ed). The MIT Press, Cambridge, Mass. 131-152.

## APÊNDICE

### PREPARO E COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

#### 1. Czapek-Dox Agar modificado

##### a. Composição

Nitrato de sódio. . . . .	2,0 g
Cloreto de potássio . . . . .	0,5 g
Sulfato de magnésio hepta-hidratado . . . . .	0,5 g
Fosfato monoácido de potássio . . . . .	1,0 g
Sulfato ferroso hepta-hidratado . . . . .	0,01 g
Sacarose . . . . .	200,0 g
Extrato de levedura . . . . .	7,0 g
Agar. . . . .	15,0 g
Água destilada. . . . .	1000 ml

##### b. Preparo

Misturar todos os ingredientes e aquecer até que o agar se dissolve completamente. Distribuir em tubos de cultura (aproximadamente 10 ml por tubo) e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Em seguida inclinar os tubos de modo a formar um ângulo de aproximadamente 30° e deixar em repouso até que o meio se solidifique totalmente.

## 2. Meio YES

### a. Composição

Sacarose . . . . .	200,0	g
Extrato de levedura. . . . .	20,0	g
Água destilada . . . . .	1000	ml

### b. Preparo

Dissolver completamente todos os ingredientes, distribuir em frascos (aproximadamente 550 ml por frasco Fernbach de 2800 ml) e esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

## 3. GTL-Agar Modificado

### a. Composição

Glucose . . . . .	1,0	g
Triptona. . . . .	5,0	g
Extrato de levedura . . . . .	2,5	g
Fosfato diácido de potássio . . . . .	1,0	g
Agar . . . . .	10,0	g
Água destilada. . . . .	1000	ml

### b. Preparo

Misturar todos os ingredientes e aquecer até que o agar se dissolva totalmente e distribuir em frascos (aproximadamente 50 ml por frasco Erlenmeyer de 250 ml) e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

#### 4. Caldo GTL

##### a. Composição

Triptona . . . . .	5,0	g
Extrato de levedura . . . . .	2,5	g
Glucose . . . . .	1,0	g
Água destilada . . . . .	1000	ml
pH . . . . .	7,0	

##### b. Preparo

Dissolver totalmente os ingredientes, distribuir (50 ml em frasco Erlenmeyer de 250 ml ou 10 ml em tubos de cultura) e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### 5. GTL-Agar

##### a. Composição

Agar . . . . .	15	g
Triptona . . . . .	5,0	g
Extrato de levedura . . . . .	2,5	g
Glucose . . . . .	1,0	g
Água destilada . . . . .	1000	ml
pH . . . . .	7,0	

##### b. Preparo

Misturar todos os ingredientes e aquecer até que o agar se dissolva completamente. Ajustar o pH a 7,0, distribuir aproximadamente 10 ml em tubos de cultura, esterilizar a 121°C por 15 minutos e inclinar os tubos como no meio de cultura número 1.

## 6. Malte-Batata Agar

### a. Composição

Batata. . . . .	200,0	g
Extrato de malte. . . . .	20,0	g
Agar . . . . .	15,0	g
Água destilada. . . . .	1000	ml

### b. Preparo

Descascar as batatas, pesar 200 g e cortar em pedaços. Adicionar 200 ml de água, cozinhar as batatas e filtrar. Adicionar os demais ingredientes a este filtrado, completar o volume a 1000 ml e aquecer até que o agar se dissolva totalmente. Distribuir aproximadamente 10 ml em tubos de cultura e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Inclinare os tubos e deixar até que o meio se solidifique.

Literatura consultada: 32, 50.

*Datilografado e Impresso*  
na FUNDAÇÃO CENTRO TROPICAL DE PESQUISAS  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAMPINAS