

## “ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* PRODUTORAS DE AFLATOXINA, NA REGIÃO ARARAQUARENSE, SP.”\*

HOMERO FONSECA \*\*  
ALCIDES MARTINELLI FILHO \*\*  
HUMBERTO DEL NERY \*\*\*  
ELISABETH RONCATTO \*\*\*\*

### RESUMO

No presente trabalho foram isoladas, e estudadas quanto à produção de aflatoxina, espécies do gênero *Aspergillus*, principalmente as linhagens de *A. flavus* ocorrentes na região Araraquarense.

O isolamento, seguindo métodos usuais em microbiologia, foram executados em amostras de amendoim, provenientes de duas épocas do ano, ou seja, da safra das «águas» e da safra da «seca».

Após o isolamento as culturas foram classificadas. Dessa classificação pôde-se obter: 102 culturas de *A. flavus*; 4 culturas de *A. oryzae*; var. *effusus*; 2 culturas de *A. oryzae*; 2 culturas de *A. parasiticus* e 1 cultura do Grupo *A. ochraceus*. Durante os trabalhos 4 culturas foram perdidas, dessa forma foram estudadas realmente 107 culturas.

Todas as culturas, a seguir, foram estudadas para a verificação de sua habilidade em produzir aflatoxina. A extração da toxina foi feita no micélio e no meio de cultura, usando-se técnicas padrões.

A separação dos metabólitos foi feita em placas de camada delgada de silicagel, usando-se como solvente o benzeno-acetato de etila-etanol e quantificadas sob luz ultra-violeta.

Analisando-se as 107 culturas de *Aspergillus*, notou-se que apenas 33 delas (31%) produziram aflatoxina, sendo que destas, 4 produziram apenas no meio de cultura, enquanto que duas produziram aflatoxina apenas no micélio.

Observando-se ainda o comportamento das culturas que produziram aflatoxina, verificou-se que a produção da toxina no micélio foi muito maior que no meio da cultura, algumas produzindo elevadas quantidades (até 400 ppm de B<sub>1</sub> e 300 ppm de G<sub>1</sub>).

---

\* Agradecemos à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para a realização da pesquisa. Entregue para publicação em 27/12/1974.

\*\* Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ.

\*\*\* Bolsista pós-graduado da FAPESP junto ao Departº de Tecnologia Rural da ESALQ.

\*\*\*\* Bolsista do CNPq junto ao Departº de Tecnologia Rural da ESALQ.

Das 33 culturas que produziram aflatoxina, 32 pertenciam à espécie *A. flavus* e apenas uma pertencia à espécie *A. oryzae*.

Foram confirmadas observações anteriores quando se constataram elevadas quantidades de aflatoxina G<sub>1</sub>, em relação à B<sub>1</sub>, naquela região.

## INTRODUÇÃO

Quando em 1960, aproximadamente 100.000 peruzinhos morreram nas granjas inglesas, atribuiu-se a causa à uma doença nova, denominada por BLOUNT (1961) de “doença ‘X’ dos perus”. Após algumas pesquisas, notou-se que o fator comum à todas as granjas, onde ocorreu a mortalidade, era o uso da ração contendo torta de amendoim.

ALLCROFT et al. (1961) demonstraram que a causa das mortes era uma toxina presente na torta de amendoim. Procurando a origem da toxina na torta, SARGEANT et al. (1961) isolaram o *Aspergillus flavus* e demonstraram ser esse microrganismo o produtor da tal toxina, que por esse motivo recebeu o nome de aflatoxina.

Pelo aprimoramento das técnicas de análise, ficou claro que a aflatoxina compunha-se de um grupo de metabólitos, dois dos quais apresentavam fluorescência azul-violeta e os outros dois, fluorescência esverdeada, pelo que aquelas receberam as denominações de B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e estas de G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (HARTLEY, 1963).

HOLZAPFEL et al. (1966) isolaram e cristalizaram as aflatoxinas do leite, já denominadas de M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> por ALLCROFT et al. (1966) e determinaram suas propriedades físicas e estrutura química.

Atualmente conhece-se também as aflatoxinas B<sub>2a</sub> e G<sub>2a</sub>, isoladas por DUTTON & HEATHCOTE (1966) e as GM<sub>1</sub> e B<sub>3</sub> (DUTTON & HEATHCOTE (1969)).

O problema das toxinas produzidas por fungos, inclusive a aflatoxina, foi motivo de diversas revisões, algumas abordando as micotoxicoses, outras os metabólitos cancerígenos de fungos e ainda a ocorrência e formação das micotoxinas em meios naturais (FORGACS & CARLL, 1962; KRAYBILL & SHIMKIN, 1964; WOGAN, 1965; BORKER et al., 1966, BARNES, 1967).

Especificamente sobre a aflatoxina foram feitas revisões por SPENSLEY (1963), GOLDBLATT (1965), MARTH (1967), SCHOENTAL, (1967) e PEERS (1967) e sobre a produção da toxina por *Aspergillus flavus*, pelos autores: AUSTWICK & AYERST (1963), HESSELTINE et al., (1966) WILDMAN et al. (1967), MATELES & WOGAN (1967).

Até 1964, a literatura cita como produtores de aflatoxina o *Aspergillus flavus* Link e *A. parasiticus* Speare, (SKAU, 1965) porém antes mesmo da descoberta da aflatoxina, já haviam relatos sobre toxicoses pelo grupo do *A. flavus*. Foi SHILO (1940) o primeiro a mostrar a produção de toxinas

pelo grupo, sendo seguido por LEVITSKII & KONIUKHOVA (1947). Em 1957, porém, BURNSIDE et al. (1957) isolaram nove culturas de *A. flavus* de ração a base de milho que havia causado morte por hemorragia em porcos, na Georgia, E. U. A., em 1954 e mostrou que o milho inoculado com esses isolados reproduzia a mesma doença aos porcos. A hepatite canina (Hepatite X) foi atribuída por BAILEY & GROTH (1959) à mesma causa da doença dos porcos. KULIK & HOLADAY (1967) encontraram toxinas na fração insaponificável dos lipídeos extraídos de tortas infeccionadas por *A. flavus*.

Sabe-se que a aflatoxina não é somente produzida pelo grupo de *A. flavus*, mas também por outros fungos. HODGES et al; (1964) comunicaram a produção dessa toxina por *Penicillium puberulum* Baidner; KULIK & HOLADAY (1967) verificaram 107 fungos isolados de milho mofado, tendo constatado a produção de aflatoxina pelas espécies: *Penicillium variable*, *P. citrinum* e *P. frequentans*. Os mesmos autores encontraram a toxina produzida por *Aspergillus niger*, *A. wentii* e *A. ruber*. SCOTT et al. (1967) relatam a produção por *A. ostianus* e van WALBEEK et al. (1968) por *A. ochraceus* e *Rhizopus* sp.

Por outro lado, existem raças de *A. flavus* que não produzem aflatoxina, outras que só produzem as do grupo B e outras só as do grupo G. HANKUO & GIM SAI (1966) citam a ocorrência de raças de *A. flavus* que produzem apenas aflatoxina do grupo das G.

Em 1967 FONSECA (1968) fez um levantamento geral da ocorrência de aflatoxina no Estado de São Paulo em suas diversas regiões, salientando que na região Araraquarense o índice de toxidez era maior que os das outras regiões e ainda que, nessa região, o teor das aflatoxinas G foi maior que nas demais.

FONSECA (1969) novamente ressalta o fato da ocorrência de altos teores de aflatoxina do grupo das G na região Araraquarense, levantando a hipótese da existência de linhagens específicas de *Aspergillus flavus* naquela região.

O objetivo desta pesquisa foi estudar as espécies de *Aspergillus*, especialmente linhagens de *A. flavus*, ocorrentes na região Araraquarense, em sequência as duas pesquisas anteriores já citadas, (FONSECA, 1968 e 1969) tendo sido estudados vários aspectos relacionado à produção de aflatoxina pelas espécies e linhagens isoladas, tanto no meio de cultura como no micélio dos fungos.

Essa toxina, tendo ação letal sobre diversos animais e com ação tóxica sobre o homem (ZUCKEMAN & FULTON, 1966 e AMLA et al. 1971), merece ser estudada sob todos os ângulos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e identificação das amostras

As amostras foram coletadas na região Araraquarense, em duas via-

gens realizadas, uma após a colheita do amendoim das águas (mês de março) e outra na colheita do amendoim da seca (fim de maio).

Para esse fim foram usados frascos de 500 ml, previamente esterilizados, tamponados com algodão.

As localidades visitadas e o número de amostras coletadas foram as seguintes:

#### Primeira coleta

|                     |             |
|---------------------|-------------|
| MATÃO .....         | 4 amostras  |
| SANTA ADELIA .....  | 2 "         |
| MONTE ALTO .....    | 3 "         |
| CATANDUVA .....     | 3 "         |
| FERNANDÓPOLIS ..... | 4 "         |
| TOTAL .....         | 16 amostras |

#### Descrição das amostras:

|   |
|---|
| A 1 — Amendoim de varredura — Matão                                       |
| A 2 — " do Paraná — Matão   |
| A 3 — " mofado ensacado — Matão   |
| A 4 — " mofado ensacado — Matão   |
| A 5 — " em casca, úmido — Sta. Adélia                                     |
| A 6 — " descascado, ensacado — Sta. Adélia                                |
| A 7 — " em casca, ensacado — Mte. Alto                                    |
| A 8 — " em casca, ensacado — Mte. Alto                                    |
| A 9 — " resto de depósito — Mte. Alto                                     |
| A10 — " refugo — Catanduva  |
| A12 — " de varredura — Catanduva  |
| A13 — " em casca, ensacado — Fernandópolis                                |
| A14 — " em casca, ensacado — Fernandópolis                                |
| A15 — " em casca, ensacado, mofado, depositado na CEAGESP — Fernadópolis. |

#### Segunda coleta

|                    |            |
|--------------------|------------|
| SANTA ADÉLIA ..... | 2 amostras |
| MONTE ALTO .....   | 3 "        |
| CATANDUVA .....    | 3 "        |

|                     |    |          |
|---------------------|----|----------|
| FERNANDÓPOLIS ..... | 2  | ”        |
| TOTAL .....         | 10 | amostras |

### Descrição das amostras

|       |                              |                 |
|-------|------------------------------|-----------------|
| B 1 — | Amendoim em casca, ensacado  | — Santa Adélia  |
| B 2 — | ” em casca, ensacado         | — Santa Adélia  |
| B 3 — | ” em casca, a granel, úmido  | — Mte. Alto     |
| B 4 — | ” em casca, a granel, úmido  | — Mte. Alto     |
| B 5 — | ” em casca, a granel, úmido  | — Mte. Alto     |
| B 6 — | ” em casca, a granel         | — Catanduva     |
| B 7 — | ” em casca, ensacado, mofado | — Catanduva     |
| B 8 — | ” descascado, em bom estado  | — Catanduva     |
| B 9 — | ” em casca, varredura        | — Fernandópolis |
| B10 — | ” em casca, varredura        | — Fernandópolis |

### Armazenamento das amostras

As amostras, até o isolamento dos fungos, permaneceram nos frascos, em que foram coletadas, e armazenados em geladeira.

### Isolamento dos fungos

Para cada amostra, o isolamento seguiu o seguinte esquema:

Tomou-se 10 g do material e transferiu-se assepticamente, para Erlenmeyer contendo 90 ml de água esterilizada e agitou-se cuidadosamente por algum tempo. Obteve-se uma suspensão de esporos de 1:10. A seguir, tomou-se, com pipeta esterilizada, 1 ml dessa solução e transferiu-se para tubos de cultura contendo 9 ml de água esterilizada e repetiu-se a operação de modo a se obter diluições de 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>, 1:10<sup>7</sup> e 1:10<sup>8</sup>. Das três últimas diluições, tomou-se 1 ml e colocou-se em placas de Petri esterilizadas, com duas repetições para cada diluição. Quando, pela aparência geral, o amendoim apresentou ter pouca contaminação, fez-se diluições apenas até 1:10<sup>7</sup> ou 1:10<sup>6</sup>, tomando-se sempre 1ml das 3 últimas diluições obtidas. As placas de Petri, acrescentou-se o meio de Czapek a uma temperatura que não afetasse os esporos e logo a seguir agitou-se lenta e cuidadosamente as placas de Petri, para provocar uma distribuição dos esporos por todo o meio. Esperou-se o meio endurecer pelo esfriamento e levou-se para incubadeira regulada para 26°C. Esperou-se o desenvolvimento das colônias até a maturação, o que ocorreu dentro de 10 a 15 dias. Pôde-se, então, distinguir as colônias do grupo do *Aspergillus flavus* por suas características macroscópicas: conidióforos longos, abun-

dande produção de esporos de coloração verde-oliva, verde-amarelada ou mesmo amarela. Transferiu-se, assepticamente, esporos de cada colônia obtida para tubos de cultura contendo meio de Czapek, inclinado e armazenou-se. Quando se obteve um grande número de colônias, fez-se uma amostragem, procurando tomar algumas que apresentassem características de pertencerem à espécies diferentes.

### **Armazenamento das colônias**

Até serem classificados, os microrganismos permaneceram em tubos inclinados, em incubadeiras a 26°C, sendo periodicamente transferidos a outros tubos, para conservar os fungos sempre vigorosos, em condições de serem usados para a classificação.

A medida que foram sendo classificados, os microrganismos foram transferidos para novos tubos inclinados e quando completamente desenvolvidos, cobriu-se a cultura com óleo mineral, Nujol, esterilizado, para conservação mais longa.

### **Classificação do fungos**

Cada microrganismo foi classificado, seguindo-se as descrições contidas em RAPER & FENNEL (1965), conforme o desenvolvimento de 3 colônias equidistantes em placas de Petri com meio de Czapek e meio de extrato de malte e ainda conforme tamanho e forma da cabeça dos conidióforos, da visícula, dos esporos, número de camadas de esteríngmas, formação ou não de esclerócios e coloração e forma dos mesmos e outras características. Para esse fim contamos com um microscópio munido com ocular de micrometria.

### **Cultivo das colônias**

Os fungos isolados e classificados foram transferidos do meio Czapek para o Czapek modificado (sacarose — 200 g; nitrato de sódio — 3 g; fosfato de potássio — 1 g; sulfato de magnésio — 0,5 g; cloreto de potássio — 0,5 g; sulfato ferroso — 0,01 g; extrato de levedura — 7 g; Agar — 15 g; água destilada — 1.000ml), neste permanecendo um período de 6-8 dias a 25°C. Após esse período foram inoculados em meio YES (2% de extrato de levedura; 20% de sacarose e 1.000 ml de água desmineralizada). Esse meio foi preferido, pois já foi utilizado em trabalhos anteriores (DAVIS et al. 1966) com bom resultado e também pela dificuldade e incerteza de se encontrar amendoim (que seria o substrato ideal) que não contenha aflatoxina. O fungo permaneceu nesse meio um período de 6-8 dias a 25°C e em seguida fez-se a extração da toxina.

## Extração da toxina

A extração da toxina foi feita no micélio e no meio de cultura.

### a) Extração no meio de cultura

O meio de cultura foi transferido cuidadosamente e filtrado em Büchner, sobre papel de filtro Whatman n.º 1, a vácuo de trompa, sendo o meio recebido em Kitazato. Uma vez transferida a maior parte do meio, o micélio também foi transferido para o Büchner e sobre o papel de filtro foi seccionado em pequenos pedaços para facilitar o escoamento do meio ainda impregnando o micélio. Terminada a filtração, o peso do meio foi anotado.

Do meio assim separado foi tomada uma alíquota de 5 ml a qual foi extraída com 25 ml de clorofórmio em funil de separação. Em seguida deixou-se separar as fases e a inferior foi passada a um Erlenmeyer de 100 ml. Foi adicionado  $\text{Na}^2\text{SO}^4$  anidro e o extrato passado para um frasco escuro para ser feita, posteriormente, a cromatografia em placas de silicagel-G.

b) O micélio foi passado cuidadosamente para o balão extrator de Soxhlet e refluxado com 50 ml de acetona a 70% durante uma hora e trinta minutos. A seguir, o solvente foi passado para um funil de separação de 250 ml, lavando-se o balão extrator com 20 ml de água destilada. A extração da toxina foi feita com duas porções de 25 ml de clorofórmio. A fase inferior foi recebida em um Erlenmeyer de 250 ml, ao qual adicionou-se  $\text{Na}^2\text{SO}^4$  anidro para remover a umidade. O líquido passado para um frasco escuro, para posterior cromatografia.

## Determinação quantitativa

A separação dos metabólitos foi feita em placas de camada delgada de silicagel-G de 0,5 mm de espessura, usando-se como solvente o benzeno-acetato de etila-etanol (YOKOTSUKA *et al.*, 1967) e quantificadas sob luz ultra-violeta conforme a técnica de COOMES & FEUELL (1965).

Foi feita apenas uma determinação para cada colônia, visto que estas podem ser consideradas como repetições de uma mesma amostra, numerada em algarismos arábicos.

## Análise estatística

A análise da variância foi feita segundo GOMES (1970) e as correlações segundo SNEDECOR (1956).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Colônias obtidas

Pelo método descrito obtivemos 62 colônias do grupo A e 49 do grupo

**B** (1.<sup>a</sup> e 2.<sup>a</sup> coletas, respectivamente). Cada colônia isolada recebeu uma numeração onde a letra maiúscula (A ou B) representa o grupo coletado; o número em seguida, representa a amostra coletada, (conforme relação) e a letra minúscula seguinte, distingue as diversas colônias conseguidas no isolamento de cada amostra.

A relação das colônias são as seguintes:

### Colônias do Grupo A

**Espécie: A. flavus**

**Colônias:** A1b, A2a, A2b, A3a, A3b, A4a, A5a, A5b, A5c, A5e, A5f, A5g, 6c, Acd, Ace, A6h, A6i, A6j, A7b, A7c, A7d, A8a, A9a, A9b, A5h, A6a, A6c, Acd, Ace, A6h, A6i, A6j, A7b, A7c, A7d, A8a, A9a, A9b, A9c, A9d, A9e, A9f, A10a, A10b, A12a, A12b, A12c, A12f, 13a, A13b, A13c, A13d, A13e, A14a, A14b, A14c, A14d, A13b, 13c, A13d, A13e, A14a, A14b, A14c, A14d, A15a, A15c, A15a, A15c, A15d, A16a, A16b, A16c, A16d, A12d. A15d, A16a, A16b, A16c, A16d, A12d.

**Espécie: A. oryzae var. effusus**

**Colônias:** A1a, A6b, A6g.

**Espécie: A. parasiticus**

**Colônias:** A6f, A15b.

**Espécie: A. oryzae**

**Colônia:** A5d.

**Espécie: A. ochraceus** (Não pertencente ao Grupo **A. flavus-oryzae**).

**Colônia:** A12e.

### Resumo

|                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| <b>A. flavus</b> .....              | 55 colônias |
| <b>A. oryzae var. effusus</b> ..... | 3 "         |
| <b>A. parasiticus</b> .....         | 2 "         |
| <b>A. oryzae</b> .....              | 1 "         |
| <b>Grupo do A. ochraceus</b> .....  | <u>1</u> "  |
| <b>Total</b> .....                  | 62 colônias |



**Colônias do Grupo B****Espécie: *A. flavus***

Colônias: B1a, B1b, B1c, B1d, B2a, B2b, B2e, B3b, B3e, B4a, B4b, B4c, B4d, B5a, B5c, B5d, B5e, B6b, B6d, B6c, B6e, B6f, B7a, B7b, B7c, B7d, B7e, B7f, B8a, **B8b**, B8c, B8d, B9a, B9b, B9c, B10b, B10d, B10f, B10g, B10h.

**Espécie: *A. oryzae* var. *effusus***

Colônia: B3d

**Espécie: *A. oryzae***

Colônia: B5b

**Resumo**

|   |             |
|---|-------------|
| <b><i>A. flavus</i></b> .....                     | 47 colônias |
| <b><i>A. oryzae</i> var. <i>effusus</i></b> ..... | 1 "         |
| <b><i>A. oryzae</i></b> .....                     | <u>1</u> "  |
| <b>Total</b> .....                                | 49 colônias |

**RESUMO GERAL DAS SÉRIES A e B**

|   |              |
|---|--------------|
| <b><i>A. flavus</i></b> .....                     | 102 colônias |
| <b><i>A. oryzae</i> var. <i>effusus</i></b> ..... | 4 "          |
| <b><i>A. oryzae</i></b> .....                     | 2 "          |
| <b><i>A. parasiticus</i></b> .....                | 2 "          |
| <b>Grupo do <i>A. ochraceus</i></b> .....         | <u>1</u> "   |
| <b>Total</b> .....                                | 111 colônias |

Durante os trabalhos de repicagem das culturas, para teste de produção de aflatoxina, quatro delas (A6f, A5b, B8b, B10d) foram perdidas. Desta forma das cento e onze culturas classificadas, foram estudadas somente cento e sete.

Os resultados do teste de produção de aflatoxina destas colônias encontram-se no QUADRO 1.

**Quadro 1:** *Peso dos meios de cultura e dos micélios e produção de aflatoxina das culturas de A. flavus e outras espécies de Aspergillus.*

| Amostra | Peso do Meio de Cultura (g) | Peso do Micélio (g) | Contéudo de Aflatoxinas (ppm) |                |                |                |
|---------|-----------------------------|---------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|         |                             |                     | Meio de Cultura               |                | Micélio        |                |
|         |                             |                     | B <sub>1</sub>                | G <sub>1</sub> | B <sub>1</sub> | G <sub>1</sub> |
| A1a     | 32,30                       | 15,20               | —                             | —              | —              | —              |
| A1b     | 43,40                       | 7,20                | 0,2                           | 0,15           | 0,8            | 0,6            |
| A2a     | 40,40                       | 8,00                | —                             | —              | —              | —              |
| A2b     | 42,25                       | 24,00               | —                             | —              | —              | —              |
| A3a     | 41,20                       | 7,00                | —                             | —              | —              | —              |
| A3b     | 26,40                       | 21,60               | 0,8                           | 0,6            | 4              | 3              |
| A4a     | 24,70                       | 23,10               | 20                            | 15             | 200            | 150            |
| A4b     | 27,40                       | 21,30               | —                             | —              | 0,8            | 0,6            |
| A5a     | 28,80                       | 18,00               | 0,2                           | 0,15           | —              | —              |
| A5b     | 23,70                       | 22,65               | —                             | —              | —              | —              |
| A5c     | 34,40                       | 12,70               | —                             | —              | —              | —              |
| A5d     | 35,30                       | 26,50               | 10                            | 7,5            | —              | —              |
| A5e     | 31,20                       | 16,40               | —                             | —              | —              | —              |
| A5f     | 33,80                       | 13,50               | —                             | —              | —              | —              |
| A5g     | 31,00                       | 16,00               | —                             | —              | —              | —              |
| A5h     | 35,00                       | 12,40               | —                             | —              | —              | —              |
| A6a     | 36,40                       | 10,50               | —                             | —              | —              | —              |
| A6b     | 33,00                       | 16,50               | —                             | —              | —              | —              |
| A6c     | 35,10                       | 10,70               | —                             | —              | —              | —              |
| A6d     | 32,10                       | 15,50               | —                             | —              | —              | —              |
| A6e     | 34,70                       | 12,80               | 8                             | 6              | 400            | 300            |
| A6g     | 33,60                       | 15,20               | —                             | —              | —              | —              |
| A6h     | 28,90                       | 16,80               | —                             | —              | —              | —              |
| A6i     | 30,20                       | 13,60               | —                             | —              | 80             | 60             |
| A6j     | 32,20                       | 16,60               | 10                            | 7,5            | 100            | 75             |
| A7a     | 33,90                       | 18,10               | 1,52                          | 1,2            | 8              | 6              |
| A7b     | 28,30                       | 17,70               | —                             | —              | —              | —              |
| A7c     | 32,80                       | 16,00               | —                             | —              | —              | —              |
| A7d     | 28,30                       | 17,70               | —                             | —              | —              | —              |
| A8a     | 32,90                       | 15,60               | —                             | —              | —              | —              |
| A9a     | 33,20                       | 13,40               | —                             | —              | —              | —              |
| A9b     | 33,30                       | 13,80               | —                             | —              | —              | —              |
| A9c     | 33,60                       | 14,50               | —                             | —              | —              | —              |
| A9d     | 29,30                       | 18,60               | 1,52                          | 1,20           | 80             | 60             |
| A9e     | 46,40                       | 11,20               | —                             | —              | —              | —              |
| A9f     | 35,50                       | 13,50               | —                             | —              | —              | —              |

| Amostra | Peso do Meio de Cultura (g) | Peso do Micélio (g) | Conteúdo de Aflatoxinas (ppm) |                |                |                |
|---------|-----------------------------|---------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|         |                             |                     | Meio de Cultura               |                | Micélio        |                |
|         |                             |                     | B <sub>1</sub>                | G <sub>1</sub> | B <sub>1</sub> | G <sub>1</sub> |
| A10a    | 31,40                       | 17,30               | —                             | —              | —              | —              |
| A10b    | 29,30                       | 18,90               | —                             | —              | —              | —              |
| A12a    | 24,30                       | 8,40                | —                             | —              | —              | —              |
| A12b    | 37,30                       | 11,50               | —                             | —              | —              | —              |
| A12c    | 28,00                       | 20,30               | 0,8                           | 0,6            | 8              | 6              |
| A12d    | 34,30                       | 24,50               | —                             | —              | —              | —              |
| A12e    | 31,80                       | 15,60               | —                             | —              | —              | —              |
| A12f    | 36,30                       | 11,70               | —                             | —              | —              | —              |
| A13a    | 33,50                       | 14,90               | —                             | —              | —              | —              |
| A13b    | 37,40                       | 10,60               | —                             | —              | —              | —              |
| A13c    | 33,60                       | 14,10               | 10                            | 7,5            | 100            | 75             |
| A13d    | 35,80                       | 12,50               | —                             | —              | —              | —              |
| A13e    | 35,00                       | 22,60               | 0,4                           | 0,3            | —              | —              |
| A14a    | 31,20                       | 15,40               | —                             | —              | —              | —              |
| A14b    | 36,30                       | 14,30               | —                             | —              | —              | —              |
| A14c    | 21,70                       | 39,00               | 0,8                           | 0,6            | —              | —              |
| A14d    | 33,50                       | 15,90               | —                             | —              | —              | —              |
| A15a    | 19,40                       | 28,90               | —                             | —              | —              | —              |
| A15b    | 20,10                       | 26,80               | —                             | —              | —              | —              |
| A15c    | 26,30                       | 23,20               | —                             | —              | —              | —              |
| A15d    | 20,10                       | 26,80               | —                             | —              | —              | —              |
| A16a    | 33,50                       | 16,90               | 0,4                           | 0,3            | 4              | 3              |
| A16b    | 33,20                       | 15,20               | —                             | —              | —              | —              |
| A16c    | 42,80                       | 9,60                | 10                            | 7,5            | 100            | 75             |
| A16d    | 34,20                       | 15,50               | 4                             | 3              | 40             | 30             |
| B1a     | 34,60                       | 12,90               | —                             | —              | —              | —              |
| B1b     | 30,00                       | 17,20               | —                             | —              | —              | —              |
| B1c     | 32,30                       | 14,70               | —                             | —              | —              | —              |
| B1d     | 33,70                       | 15,00               | —                             | —              | —              | —              |
| B2a     | 35,00                       | 12,50               | 20                            | 15             | 200            | 150            |
| B2b     | 42,60                       | 4,90                | 20                            | 15             | 200            | 150            |
| B2d     | 36,40                       | 13,00               | 40                            | 30             | 400            | 300            |
| B2e     | 38,40                       | 11,80               | 8                             | 6              | 8              | 6              |
| B3a     | 31,30                       | 13,70               | —                             | —              | —              | —              |
| B3b     | 37,40                       | 10,80               | —                             | —              | —              | —              |
| B3d     | 32,30                       | 16,50               | —                             | —              | —              | —              |

| Amostra | Peso do Meio de Cultura (g) | Peso do Micélio (g) | Conteúdo de Aflatoxinas (ppm) |                |                |                |
|---------|-----------------------------|---------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|         |                             |                     | Meio de Cultura               |                | Micélio        |                |
|         |                             |                     | B <sub>1</sub>                | G <sub>1</sub> | B <sub>1</sub> | G <sub>1</sub> |
| B3e     | 31,00                       | 15,70               | —                             | —              | —              | —              |
| B4a     | 33,40                       | 15,10               | —                             | —              | —              | —              |
| B4b     | 33,50                       | 15,90               | 2                             | 1,5            | 8              | 6              |
| B4c     | 25,40                       | 23,70               | —                             | —              | —              | —              |
| B4d     | 29,90                       | 15,40               | 8                             | 6              | 40             | 30             |
| B5a     | 38,80                       | 9,70                | —                             | —              | —              | —              |
| B5c     | 36,80                       | 7,20                | —                             | —              | —              | —              |
| B5d     | 35,30                       | 27,50               | 10                            | 7,5            | —              | —              |
| B5e     | 35,60                       | 13,00               | 8                             | 6              | 16             | 12             |
| B6a     | 34,70                       | 14,00               | 0,8                           | 0,6            | 8              | 6              |
| B6b     | 25,20                       | 21,30               | —                             | —              | —              | —              |
| B6c     | 29,60                       | 18,90               | —                             | —              | —              | —              |
| B6d     | 28,60                       | 18,40               | —                             | —              | —              | —              |
| B6e     | 22,30                       | 24,80               | 0,8                           | 0,6            | —              | —              |
| B6f     | 27,00                       | 20,00               | —                             | —              | —              | —              |
| B7a     | 15,20                       | 30,70               | —                             | —              | —              | —              |
| B7b     | 31,60                       | 16,40               | —                             | —              | —              | —              |
| B7c     | 30,20                       | 12,50               | —                             | —              | —              | —              |
| B7d     | 28,50                       | 14,30               | —                             | —              | —              | —              |
| B7e     | 31,60                       | 10,90               | —                             | —              | —              | —              |
| B7f     | 27,80                       | 15,00               | —                             | —              | —              | —              |
| B8a     | 27,30                       | 16,00               | —                             | —              | —              | —              |
| B8c     | 26,90                       | 14,50               | —                             | —              | —              | —              |
| B8d     | 28,70                       | 14,20               | 0,4                           | 0,3            | 8              | 6              |
| B9a     | 31,10                       | 14,00               | —                             | —              | —              | —              |
| B9b     | 24,20                       | 20,40               | 0,8                           | 0,6            | 40             | 30             |
| B9c     | 28,70                       | 15,60               | 8                             | 6              | 80             | 60             |
| B9d     | 29,10                       | 12,20               | —                             | —              | —              | —              |
| B10a    | 30,60                       | 12,10               | —                             | —              | —              | —              |
| B10b    | 31,10                       | 13,20               | —                             | —              | —              | —              |
| B10c    | 30,80                       | 13,10               | 0,2                           | 0,15           | —              | —              |
| B10e    | 36,40                       | 12,40               | —                             | —              | —              | —              |
| B10f    | 24,90                       | 22,80               | 0,8                           | 0,6            | 160            | 120            |
| B10g    | 33,40                       | 15,40               | —                             | —              | —              | —              |
| B10h    | 36,40                       | 11,60               | —                             | —              | —              | —              |

QUADRO 2 — Análise da variância da aflatoxina no meio de cultura.

| F.V.                    | G.L. | S.Q.     | Q.M.     | F       |
|-------------------------|------|----------|----------|---------|
| Tipos de aflatoxina (T) | 1    | 0.019284 | 0.019284 | 7.12*   |
| Amostras (A)            | 17   | 4.584069 | 0.269651 | 99.61** |
| T X A (Resíduo)         | 17   | 0.046027 | 0.002707 |         |
| TOTAL                   | 35   |          |          |         |

\* Significativo ao nível de 95% de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 99% de probabilidade

QUADRO 3 — Análise da variância da aflatoxina no micélio.

| F.V.            | G.L. | S.Q.      | Q.M.     | F         |
|-----------------|------|-----------|----------|-----------|
| Tipos (T)       | 1    | 0.241469  | 0.421469 | 3.44 n.s. |
| Amostras (A)    | 17   | 21.664701 | 1.274394 | 10.40**   |
| T X A (Resíduo) | 17   | 2.082413  | 0.122494 |           |
| TOTAL           | 35   | 24.168583 |          |           |

n.s. Não significativo

\*\* Significativo ao nível de 99% de probabilidade

Analisando-se as 107 culturas de *Aspergillus* estudadas, notou-se que apenas 33 delas (31%) produziram aflatoxina, sendo que destas, sete (A5a; A5d; A13e; A14a; B5d; B6e; B10c) produziram aflatoxina apenas no meio de cultura, enquanto que duas (A4b; A6e) produziram aflatoxina apenas no micélio.

Por outro lado pode-se notar que, na série A, das 17 amostras coletadas, 11 produziram aflatoxina em pelo menos uma das colônias isoladas, o que representa uma percentagem de 65%. Na série B, das 10 amostras coletadas, 7 produziram aflatoxina através de pelo menos uma de suas colônias isoladas o que representa 70%. É de se notar nesta série B, que todas as quatro colônias isoladas da amostra n.º 2, (a saber: B2a, B2b, B2d, B2e) produziram aflatoxina em grande quantidade, tanto no meio de cultura como no micélio.

Observando os resultados das que produziram aflatoxina verificou-se que a produção da aflatoxina no micélio foi muito maior que no meio de cultura, sendo que, em 14 casos (A4a; A6e; A6i; A6j; A9d; A13b; A16c; B2a; B2b; B2d; B4c; B9b; B9c e B10f) a produção de aflatoxina apresentou-se em quantidade bastante superior à produzida no meio. Em apenas um

caso (B2d) a quantidade de aflatoxina produzida no meio de cultura chegou a 40 ppm enquanto que no micélio a produção chegou a 400 ppm (B2d).

Verificou-se ainda que, em apenas um caso (B2a) a quantidade de aflatoxina produzida no meio de cultura foi igual à produzida no micélio. Nos demais casos a quantidade de aflatoxina no micélio foi sempre superior.

A quantidade total de aflatoxina produzida pelas 33 culturas no meio de cultura no micélio foi de:

**Meio de cultura:**

$$B_1 = 227,46 \text{ ppm (31 culturas)}$$

$$G_1 = 154,95 \text{ ppm}$$

**Micélio:**

$$B_1 = 2.293,60 \text{ ppm (26 culturas)}$$

$$G_1 = 1.720,00 \text{ ppm}$$

Com estes dados pudemos constatar mais uma vez que a quantidade de aflatoxina encontradas nos micélios foi bastante superior à encontrada nos meios de cultura.

O peso de micélio produzido variou de 4,9 g a 39,8 g e embora não tenha sido calculada uma possível correlação entre o peso do micélio e produção de aflatoxina (entre as que a produziram) pode-se observar facilmente que essa correlação não existiu. O peso médio de micélio foi de 16,13 g.

Das 33 amostras que produziram aflatoxina 32 pertenciam à espécie *A. flavus* e apenas uma (A5d) pertencia à espécie *A. oryzae*, sendo que, esta última só produziu aflatoxina no meio de cultura. As demais espécies não produziram aflatoxina.

**Análise de variância**

a) Aflatoxina no meio de cultura

Pela análise de variância no meio de cultura (QUADRO 2) pode-se dizer que, com 95% de probabilidade existe um efeito de tipo, ou seja, com 95% de probabilidade as diferenças entre as aflatoxinas  $B_1$  e  $G_1$  não foram devidas ao acaso. Com 99% de probabilidade existe um efeito de amostras, ou seja, com 99% de probabilidade a diferença entre as amostras não foram devidas ao acaso.

b) Aflatoxina no micélio

Pela análise da variância no micélio (QUADRO 3) não se conseguiu detectar diferenças significativas entre tipos de aflatoxina ( $B_1$  e  $G_1$ ).

Porém existe com 99% de probabilidade de que as diferenças entre amostras não sejam ao acaso.

### Correlações

a) **Correlação entre aflatoxina produzida no meio e no micélio.**

$$r = 0,027$$

As análises estatísticas não detectaram correlação entre aflatoxina produzida no meio e no micélio, tanto é verdade que às vezes a produção de aflatoxina no micélio foi muito maior que no meio, e nem sempre havia produção no meio e no micélio em uma mesma amostra.

b) **Correlação entre as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> no meio de cultura.**

$$r = 0,988 **$$

(\*\*) significativa ao nível de 99% de probabilidade.

Pelo resultado verificou-se que houve uma correlação altamente positiva, ao nível de 99% de probabilidade entre as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> no meio de cultura. Em todas as amostras estudadas todas as vezes que havia produção de aflatoxina no meio pôde-se observar a presença de B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>.

c) **Correlação entre as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> no micélio.**

$$r = 0,826 **$$

(\*\*) significativo ao nível de 99% de probabilidade.

Também neste caso, observou-se uma correlação altamente positiva, ao nível de 99% de probabilidade na produção das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> no micélio.

d) **Correlação entre peso do meio de cultura e peso do micélio.**

$$r = 0,357$$

Pelo resultado verificou-se que não existiu correlação entre peso do meio de cultura e peso do micélio.

### CONCLUSÕES

1) As constatações anteriores de que a produção de aflatoxina G<sub>1</sub> por linhagens de *A. flavus* desta região, era bastante elevada, aproximando-se bastante do teor de B<sub>1</sub>, foram plenamente confirmadas.

2) As cepas que ocorrem nesta região têm realmente a característica de produzirem elevada proporção de aflatoxina G<sub>1</sub> o que não ocorre em outras regiões do Estado de São Paulo.

3) Uma percentagem razoável de amostras (65% na série A e 70% na série B) produziram aflatoxina em pelo menos uma das colônias isoladas.

4) Algumas colônias produziram elevada quantidade de aflatoxina, chegando a 400 ppm de B<sub>1</sub> e 300 ppm de G<sub>1</sub>.

5) Uma baixa proporção do total das colônias (31%) produziu aflatoxina.

6) Dentre as demais espécies de **Aspergillus** apenas uma colônia de **A. oryzae** produziu aflatoxina e mesmo assim, só no meio de cultura.

7) Não houve correlação entre a produção de aflatoxina no meio de cultura e no micélio ( $r = 0,027$ ), porém houve uma correlação fortemente positiva entre a produção de aflatoxina B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> no meio de cultura ( $r = 0,988$ ) e também no micélio ( $r = 0,826$ ).

## SUMMARY

### "AFLATOXIN PRODUCING SPECIES OF **ASPERGILLI** IN THE REGION ARARAQUARENSE, SP., BRAZIL"

Species of the genus **Aspergillus**, mainly **A. flavus** strains, occurring in the Araraquarense region (State of São Paulo, Brazil), were isolated and their ability to produce aflatoxin was studied.

The isolation was conducted following routine methods in microbiology.

The cultures were obtained from samples of peanuts collected in the "rainy season" and in the "dry season".

After the isolation the cultures were classified as follows: 102 **A. flavus**; 4 **A. oryzae** var. **effusus**; 2 **A. oryzae**; 2 **A. parasiticus** and 1 **A. ochraceus**.

During the work, 4 cultures were lost, remaining 107 cultures.

The cultures were then tested in their ability to produce aflatoxin, which was extracted from the mycelium and from the culture medium.

The metabolites were separated by thin layer chromatography using the solvent benzene-ethyl acetate-ethanol and quantified under long wave U. V. light.

From 107 cultures of **Aspergillus** only 33 (31%) produced aflatoxin; seven of those produced it only in the culture medium, while two, only in the mycelium.

The production of aflatoxin was much higher in the mycelium than in the culture medium; some of them produced very high quantities, up to 400 p.p.m. of B<sub>1</sub> and 300 p.p.m. of G<sub>1</sub>.

From the 33 cultures producing aflatoxin, 32 belonged to the **A. flavus** species and only one to the **A. oryzae**.



Previous studies when high yields of aflatoxin G<sub>1</sub> as related to B<sub>1</sub> were reported in that region, were confirmed in the present work.

### LITERATURA CITADA

- ALLCROFT, R., R. B. A. CARNAGHAN, K. SARGEANT & J. O'KELLY, 1961 — A toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.* **74** (31) : 863-4.
- ALLCROFT, R., H. ROGERS, G. LEWIS, J. NABNEY & P. E. BEST, 1966 — Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the «milk toxin». *Nature*, **209** : 154-5.
- AMLA, L., C. S. KAMALA, G. S. GOPALAKRISNA, A. P. JAYARAJ, V. SREENIVASA-MURTHY & H. A. B. PARPIA, 1971 — Cirrhosis in children from peanut meal contaminated by aflatoxin. *Am. J. Clinical Nutr.* **24** (June) : 609-14.
- AUSTWICK, P. K. C. & G. AYERST, 1963 — Toxic products in groundnuts. *Chem. Ind. (London)*, **2** : 55-61.
- BAILEY, W. S. & A. H. GROTH Jr., 1959 — The relationship of hepatitis «X» of dogs and moldy corn poisoning of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **134** : 514-6.
- BARNES, J. M., 1967 — Toxic fungi with special reference to aflatoxin. *Trop. Sci.*, **9** : 64-74.
- BLOUNT, W. P., 1961 — Turkey «X» disease. *Turkeys*, **9** (2) : 52-67.
- BORKER, E. F. INSALATA, C. P. LEVI & J. S. WITZEMAN, 1966 — Mycotoxins in feeds and foods. *Advan. Appl. Microbiol.*, **8** : 315-351.
- BURNSIDE, J. E., W. L. SIPPEL, J. FORGACS, W. T. CARLL, M. B. ATWOOD & E. R. DOLL, 1957 — A disease of swine and cattle caused by eating moldy corn. *Am. J. Vet. Res.*, **18** : 817-24.
- COOMES, T. J. & A. J. FEUELL, 1965 — Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B<sub>1</sub> in groundnuts and groundnut materials. Tropical Products Institute, Report G 13, Londres.
- DAVIS, N. D. U. L. DIENER & D. W. ELDRIDGE, 1966 — Production of aflatoxin B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.* **15** : 1517-18.
- DUTTON, M. F. & J. G. HEATHCOTE, 1966 — Two new aflatoxins. *Biochem. J.*, **101**(2) : 21-2.
- DUTTON, M. F. & J. G. HEATHCOTE, 1969 — Some interesting relationship between the new aflatoxins and their associated metabolites. *J. South Afr. Chem. Inst.*, **XXII** : 5107-5118.
- FONSECA, H., 1968 — Contribuição ao estudo da ocorrência de aflatoxina em tortas, farelos e farinhas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado, ESALQ-USP, Piracicaba, SP. 64 pp.
- FONSECA, A., 1969 — Contribuição ao estudo da aflatoxina no amendoim (*Arachis hypogaea* L.) da colheita à industrialização. Tese de Livre-docência. ESALQ-USP, Piracicaba, SP., 98 pp.
- FORGACS, J. & W. T. CARLL, 1962 — Mycotoxicosis. *Advan. Vet. Sci.*, **7** : 273-382.
- GOLBLATT, L. A., 1965 — Aflatoxin, *Assoc. Food Drug. Off. Quant. Bull. V. S.*, **29** : 58-69.
- GOMES, F. P. 1970 — Curso de Estatística Experimental. 4.<sup>a</sup> Ed. Livraria Nobel, São Paulo, S. P.
- HAN KUO, L. & Y. GIM SAY, 1966 — The occurrence of aflatoxin in Malaysian imported oil cakes and groundnut kernels. *The Malaysian Agr. J.*, **45** : 232-44.

- HARTLEY, R. D., B. F. NESBITT & O'KELLY, 1963. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 198 : 1056-58.
- HESELDTINE, C. W., O. L. SHOTWELL, J. J. ELLIS, & R. D. STUBBLEFIELD, 1966 — Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bacteriol. Rev.* 30(4) : 795-805.
- HODGES, F. A., J. R. ZUST, H. R. SMITH, A. A. NELSON, B. H. ARMBRECHT & A. D. CAMPBELL, 1964 — Mycotoxins: Aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*. *Science*, 145 : 1439.
- HOLZAPFEL, C. W., P. S. STEYN & I. F. H. PURCHASE, 1966 — Isolation and structure of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>. *Tetrahedron Letters*, pp. 2799-2803.
- KRAYBILL, F. H. & M. B. SHIMKIN, 1964 — Carcinogenesis related to foods contaminated by processing and fungal metabolites. *Advan. Cancer Res.*, 8 : 191-246.
- KULIK, M. M. & C. E. HOLADAY, 1967 — Aflatoxin: a metabolite product of several fungi. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 30 : 137-40.
- LEVITSKII, R. G. & V. B. KONIUKHOVA, V. B. 1947 — On the toxicity of feed contaminated with common fungi. *Veterinarya*, 24 : 40-3.
- MARTH, E. H., 1967 — Aflatoxin and other mycotoxins in agricultural products. *J. Milk Food Technol.*, 30 : 192-8.
- MATELES, R. I. & G. N. WOGAN, 1967 — Aflatoxin. *Advan. Microb. Physiol.* 1:25.
- PEERS, F. G., 1967 — Aflatoxin — A summary of recent work. *Trop. Sci.*, 9: 186-203.
- RAPER, K. B. & D. I. FENNEL (Eds.), 1965 — «The Genus *Aspergillus*». The Williams and Wilkins Co. Baltimore, E. U. A.
- SARGEANT, K., A. SHERIDAN, J. O'KELLY & R. B. A. CARNAGHAN, 1961 — Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192 : 1096-7.
- SCHOENTAL, R., 1967 — Aflatoxins. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 7 : 343-56.
- SCOTT, P. M., W. van WALBEEK & J. FORGACS, 1967 — Formation of aflatoxin by *Aspergillus ostianus* Wihmer. *Appl. Microbiol.*, 15 : 945.
- SHILO, Y. M., 1940 — Toxic action of *Aspergillus flavus* in the animal body. *Sbornik Trudov Kharkovskogo Inst.*, 19 : 63-73.
- SKAU, D. B., 1965 — Bibliography on aflatoxin from 1960. U. S. Dept. Agr. ARS. SURDD, N. Orleans, E. U. A. 36 pp.
- SNEDECOR, G. W., 1956 — «Statistical Methods). The Iowa State College Press, Ames, Ia. E. U. A. 5.<sup>a</sup> Ed., 534 pp.
- SPENSLEY, P. C. 1963 — Aflatoxin, the active principle in turkey «X» disease. *Endeavour*, 22 : 75-9.
- van WALBEEK, W., P. M. SCOTT, & F. S. THATCHER, 1968 — Mycotoxins from food borne fungi. *Can. J. Microbiol.*, 14 : 131-7.
- WILDMAN, J. D., L. STOLOFF & R. JACOBS, 1967 — Aflatoxin production by a potent *Aspergillus flavus* Link isolate. *Biotechnol. Bio Eng.* 9 : 429-37.
- WOGAN, G. N., 1965 — Experimental toxicity and carcinogenicity of aflatoxins. Em: G. N. Wogan (Ed.): «Mycotoxins in Foodstuffs». M. I. T. Press, Cambridge, Mass., E. U. A. 291 pp.
- YOKOTSUKA, T., M. SASAKI, T. KIKUCHI, Y. ASAO & A. NOBUHARA, 1967 — Production of fluorescent compounds other than aflatoxins by Japanese industrial molds. Em: R. I. Mateles & G. N. Wogan (Eds.): «Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins». The M. I. T. Press, Cambridge, Mass. E. U. A.
- ZUCKERMAN, A. J. & F. FULTON, 1966 — Acute toxic effects of aflatoxin on human embryo liver cells in culture. *Brit. Med. J.* 2 : 90-1.