

## PESQUISA E DOSAGEM DE AFLATOXINA EM AMENDOIM E DERIVADOS E EM OUTROS CEREAIS

### SEARCH AND DOSAGE OF AFLATOXIN IN PEANUTS AND DERIVATIVES AND OTHER CEREALS

WALDOMIRO PREGNOLATTO <sup>(1)</sup>  
MYRNA SABINO <sup>(1)</sup>

Chromatography techniques in paper and in thin layer chromatography are described for the searching and determination of aflatoxin in foods for human consumption, and in rations for animals.

Using these techniques, 32 foods were analysed, of which 20 contained aflatoxin, and 130 rations, where 104 were contaminated

Besides the peanut flour and other peanut products, the manioc flour showed highly contaminated with aflatoxin.

Sodium bisulfite 1:10.000 showed effectual to avoid the development of the *Aspergillus flavus* in the peanut flour.

### INTRODUÇÃO

O amendoim, uma importante fonte de proteínas, usado principalmente em rações para aves, é facilmente invadido por cêpos de *Aspergillus flavus*, os quais produzem metabólitos extremamente tóxicos que receberam o nome de Aflatoxinas num relatório apresentado por STENVENSON ao "Interdepartmental Working Party," em 1962 <sup>40</sup>.

O problema dessas toxinas veio à luz devido a grande perda de peruzinhos ocorrida em 1960 em Granjas da Inglaterra. De fato, nesse ano cerca de 100.000 peruzinhos e patos jovens morreram em poucos meses. As aves afetadas morriam no espaço de uma semana, durante a qual perdiam o apetite, tornavam-se apáticas e perdiam a força das asas.

O exame *post-mortem* evidenciou franca hemorragia no fígado e aumento do rim <sup>47</sup>.

Simultaneamente, um mal semelhante ocorria na Áustria, Hungria <sup>17</sup>, Uganda,

Kenya <sup>19</sup>. Nestes dois últimos países perderam-se 14.000 patinhos em 4 semanas.

Não somente aves domésticas como perus, patos, faisões, raramente frangos mostravam-se sensíveis a estas toxinas, mas também animais como porcos, veados e carneiros <sup>29, 31, 40, 41</sup>.

Inicialmente êste tipo de intoxicação foi atribuído a substâncias tóxicas existentes nos componentes das rações. Rapidamente, porém, estabeleceu-se a ligação entre êste tipo de intoxicação e o uso nas rações de tortas de amendoim procedentes do Brasil, segundo ALLCROFT *et alii* <sup>3</sup> e SARGEANT *et alii* <sup>13</sup>, os quais mostraram também que dessas tortas tóxicas se podia extrair um princípio ativo que produzia a morte, com os mesmos sintomas verificados na Inglaterra. SARGEANT *et alii* <sup>13</sup>, mostraram que não eram somente as tortas de amendoim provenientes do Brasil as responsáveis por êsse tipo de intoxicação, mas também as provenientes da Nigéria, África

(1) Da Seção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz.

Ocidental, África Oriental, Gâmbia e Índia, o que conduziu as pesquisas para o campo das toxinas. Em setembro de 1960, AUSTWICK & AYERST<sup>7</sup> observaram a presença de fragmentos de hifas de fungos em algumas tortas, o que levou SARGEANT *et alii*<sup>14</sup> a isolar de uma torta de amendoim de Uganda especialmente tóxica um produto produzido por um fungo, que foi identificado como sendo o *Aspergillus flavus* tendo as mesmas propriedades tóxicas das tortas estudadas. Daí, naturalmente, o nome de aflatoxina dada a esse princípio tóxico por êle elaborado.

WILSON *et alii*<sup>12</sup>, estudaram 121 fungos isolados, representando 20 espécies dos quais somente os da espécie *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* produziram aflatoxina, sendo o *Aspergillus flavus* Link é o responsável pela produção de maiores quantidades de aflatoxina.

Outros bolores foram estudados, dos quais o *Penicillium puberulum* Bain produz aflatoxina em pequena quantidade, como demonstraram HODGES *et alii*<sup>22</sup> e KULIK & HOLADAY<sup>23</sup> ao encontrarem esse fungo em amostras de amendoim.

*Aspergillus flavus* é um fungo muito comum, podendo ser facilmente encontrado e isolado em muitos depósitos de gêneros alimentícios tropicais. Eles se desenvolvem muito rapidamente, mas necessitam de um teor de umidade maior que a maioria dos fungos.

Em climas tropicais, onde encontramos normalmente temperaturas de 30° ou mais, este fungo necessita de uma umidade relativa do ar de no mínimo 80% o que corresponde a uma umidade mínima de cerca de 9% na semente do amendoim e de 16% nas farinhas desengorduradas do amendoim.

O desenvolvimento do fungo e, por consequência, a formação da aflatoxina só ocorre numa pequena parte da semente. Este fungo é geralmente distinguido por possuir coloração rosea de carne.

O fungo pode atacar diretamente a semente antes que o processo de secagem diminua a porcentagem da umidade abaixo do limite próprio para o seu desenvolvimento, ou pode ter lugar também em qual-

quer estágio posterior, desde que o teor de umidade e temperatura sejam favoráveis. A secagem posterior não afeta o teor de aflatoxina já produzido, pois ela resiste às condições de secagem e até mesmo ao processo de torração.

Enquanto as sementes estão nas cascas, são e em estado de crescimento, e o teor de umidade é demasiado alto, cerca de 25%, elas não são atacadas pelo fungo, pois possuem um mecanismo protetor, que pode ainda ser suplementado pelas barreiras físicas representadas pela própria casca e tegumentos.

Mas, se se deixar que os grãos amadureçam além do ponto normal de maturação, o ataque do fungo pode ocorrer com sérios riscos então para a qualidade do grão ocasionando ainda a queda das barreiras naturais de proteção da semente.

O *Aspergillus flavus* considerado como uma espécie cosmopolita do solo, das matérias orgânicas e dos grãos, especialmente os oleosos, é abundantemente encontrado no amendoim e seus derivados<sup>8, 20, 27, 45</sup>, e ainda no feijão, arroz, mandioca<sup>34, 38</sup>, também nas tortas de algodão<sup>18, 28, 30, 39</sup>, e raramente no milho<sup>25</sup>.

Também já foi encontrado no trigo, soja, girassol e seus derivados, como sejam farinhas, pastas etc.<sup>2, 9, 24, 3, 37</sup>.

Diversas toxinas com propriedades físico-químicas muito semelhantes às da aflatoxina têm sido encontradas por diversos autores: ALLARD<sup>4</sup> mostrou que *Aspergillus versicolor* (Vuil) Tirab é capaz de produzir aflatoxina entre seus metabólitos, mas BULLOCK *et alii*<sup>11</sup> mostrou que pode ter havido confusão com a sterigmatocystina e aversina, substâncias com propriedades muito semelhantes às da aflatoxina.

Também o fungo *Macrophomina phaseoli* produz uma toxina parecida com a aflatoxina, como o demonstrou CROWTHER<sup>16</sup> que também descreveu uma técnica simples em C.C.D. pela qual se podem diferenciar estas toxinas.

Muito numerosos são os metabólitos produzidos por *Aspergillus flavus*, como verificaram ASAO *et alii*<sup>6</sup> e ARMBRECHT *et alii*<sup>4</sup>, porém, os mais conhecidos e mais

tóxicos são os do grupo B e G, assim classificados em função de apresentarem fluorescência característica azul e verde respectivamente, quando observados sob luz ultravioleta.

Em 1963, COOMES & SANDERS<sup>15</sup> separam, por cromatografia em papel, aflatoxina B e G para, em seguida, um grupo de investigadores da Inglaterra — BROADBENT, CORNELIUS & SHONE<sup>10</sup>, NESBITT *et alii*<sup>35</sup>, VAN DER ZIJDEN *et alii*<sup>50</sup> isolarem finalmente por C.C.D. 4 toxinas, respectivamente aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>2</sub>, aflatoxina G<sub>1</sub> e aflatoxina G<sub>2</sub>. Logo em seguida HARTLEY, NESBITT & O'KELLY<sup>21</sup> estabelecem as fórmulas moleculares dessas substâncias, para ASAO *et alii*<sup>5, 6</sup> proporem a fórmula estrutural das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> e CHANG *et alii*<sup>12</sup>, VAN DORP *et alii*<sup>51</sup> proporem as da B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>.

Os espectros característicos das 4 aflatoxinas foram estabelecidos por diversos investigadores<sup>5, 6, 21, 50, 51</sup>.

Métodos, quer sejam químicos ou biológicos, são abundantemente encontrados na literatura. Esses métodos baseiam-se sempre na extração da toxina com solventes adequados e separação cromatográfica em papel<sup>10, 15</sup>, ou em camada delgada<sup>10, 14, 21, 26, 35, 50</sup>, subsequente determinação por espectrofotometria no ultravioleta ou por fluorometria.

Dos métodos descritos na literatura o que oferece melhores resultados é o estabelecido por LEE<sup>26</sup>, como ficou demonstrado no "Istituto Superiori di Sanità"<sup>14</sup>, método esse que adaptamos aos nossos trabalhos de rotina na determinação das aflatoxinas.

Para quem não dispõe porém de equipamento para cromatografia em camada delgada, estabelecemos um método rápido e mais simples por cromatografia em papel, que dá resultados aceitáveis, mas não tão bons como quando se trabalha em C.C.D.

## MATERIAL E MÉTODOS

A determinação da aflatoxina envolve as seguintes operações:

1. Preparo da amostra
2. Extração de aflatoxina
3. Separação cromatográfica dos metabólitos
4. Avaliação

### 1. MATERIAL

Silica gel para C.C.D., Merck

Clorofórmio p.a.

Éter dietílico p.a livre de peróxidos (éter anestésico Rhodia)

Metanol p.a.

Acetona

Solventes

Clorofórmio-metanol (97:3)

(para a cromatografia em C.C.D.)

Água-éter-acetona-metanol (3:1:1:1)  
(para a cromatografia em papel)

Silicato de sódio

Cubas e equipamentos para cromatografia em papel e em C.C.D.

### 2. MÉTODOS

1. *Preparo da amostra* — Para material desengordurado, ou contendo pequena quantidade de gordura, basta moer muito bem e homogeneizar; quando porém o material contém mais de 4% de gordura, extrair em Soxhlet com éter de petróleo (30-60°C) por 6 horas. Secar o resíduo em estufa a 45°C.

2. *Extração da aflatoxina* — Pese 25g do material, transfira para copo de 300 ml e umideça com água fervente, cuidadosamente até que se forme uma pasta: deixe em repouso por 10 minutos, e adicione aos poucos e cuidadosamente à pasta 100 ml de clorofórmio, com constante homogeneização; deixe em agitação fraca e constante por 30 minutos, filtre a vácuo recolhendo

o filtrado em balão de 100 ml, lave o resíduo com 10 ml de clorofórmio e complete o volume com clorofórmio. Evapore cuidadosamente o clorofórmio em banho-maria até secar, tendo o cuidado de evaporar as últimas porções em corrente de nitrogênio. Dissolva o resíduo em 10 ml de clorofórmio.

### 3. CROMATOGRAFIA

#### a) *Em camada delgada*

Use placas de 20 x 20 com camada de sílica gel de 400  $\mu$ , secadas ao ar por 30 minutos e ativada em estufa a 105°C por 2 horas.

Transfira para a placa de 30 a 600 microlitros de extrato clorofórmico e desenvolva o cromatograma com clorofórmio-metanól (97:3), até a altura de 12 cm da base; seque ao ar e observe sob luz ultra-violeta, marque os Rf. Desenvolva novamente a placa com éter como solvente: as manchas devem permanecer nas mesmas posições (deslocamento das manchas indicam que as mesmas não eram de aflatoxina). Nestas condições, observam-se, sob luz fluorescente, 4 manchas que correspondem às 4 aflatoxinas conhecidas, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>,

G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, nos respectivos Rf de 0,65, 0,60, 0,50 e 0,34.

#### b) *Em papel*

Impregne tiras de papel Whatman nº 1 de 20 x 5 cm, em solução de silicato de sódio a 2% p/v e seque-as em estufa a 100°C por 1 hora. Transfira para o papel de 30 a 600 microlitros do extrato clorofórmico e desenvolva o cromatograma com água-éter-acetona-metanól (3:1:1:1) até atingir a altura de 12 cm da base. Seque ao ar e observe sob luz ultra-violeta. A mancha com Rf de 0,70 corresponde a aflatoxina B<sub>1</sub>, a com Rf de 0,60 à B<sub>2</sub> e, no Rf de 0,35, aparecem as G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> juntas.

### 4. AVALIAÇÃO — Aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>

Raspe a camada de sílica da placa ou recorte o papel em tiras que correspondem às toxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e elua-as em 2 ml de metanól por contato e durante 30 minutos. Filtre, lave o resíduo com 2 ml de metanól recolhendo o filtrado e o álcool de lavagem em cuba apropriada (cuba de 10 mm do Beckmann DU). Leia a absorbância dessas soluções a 363 e 420 m $\mu$ , usando como branco o metanól previamente tratado com a sílica ou o papel usados na cromatografia e que sofreu o mesmo tratamento.

#### *Cálculo*

$$\frac{(A_{363} - A_{420}) \times 4 \times 312}{22\ 000} = X \text{ mg aflat. em } 4 \text{ ml metanol}$$

$$X \text{ mg aflat.} \times \frac{10}{0,6} = y \text{ mg de aflat. em } 10 \text{ ml de clorofórmio, que corresponde a } 25 \text{ g da amostra}$$

$$Y \text{ mg aflat.} \times 40 = \text{mg por quilo da amostra}$$

P.M. Aflat, B<sub>1</sub> = 312

Coefficiente molar extinção de B<sub>1</sub> = 22 000

Para a determinação da aflatoxina em certos alimentos ricos em gordura e/ou em carboidratos, torna-se necessário purificar previamente a amostra.

Para isso, transfira-se 25 g da amostra já moída e homogeneizada para copo de 600 ml, junte 150 ml de etanol a 95%

e agite durante 5 minutos com agitador mecânico.

Filtre através Buchner a vácuo, lave o resíduo com cerca de 100 ml de etanol, recolhendo filtrado e álcool de lavagem em balão de 250 ml, complete o volume com etanol e homogeneize.

Transfira para funil de separação de 250 ml, 25 ml dessa solução, junte 10 ml de HCl N, e extraia as substâncias lipossolúveis com 2 vezes 25 ml de tetracloreto de carbono. Adicione à fase alcoólica 65 ml de HCl N e extraia daí as toxinas com 3 vezes 20 ml da mistura clorofórmio-éter (9:1), à qual se junta 2 g de sulfato de sódio anidro e, em seguida, 2 g de sílica gel. Filtre através de Gooch de placa porosa contendo 5 g de óxido de alumínio cromatográfico, lavando o resíduo com 20 ml de clorofórmio. Evapore o líquido em cápsula de porcelana em banho-maria cuidadosamente até secura. Dissolva o resíduo em 0,5 ml de clorofórmio e cromatografe.

#### MEIOS DE EVITAR A CONTAMINAÇÃO E COMO DESTRUIR A AFLATOXINA

Derivados dos lipídios do amendoim, tais como o óleo e as pastas gordurosas, apresentam-se livres de aflatoxina como já havia sido verificado por PARKER & MELNICK<sup>36</sup>, de acôrdo, aliás, com as observações de SHIMKIN & KRAYBILL<sup>46</sup> e SPENSLEY<sup>48</sup>, que verificaram ser a aflatoxina destruída no processo de refinação dos óleos, ao serem êstes lavados com álcali.

Nas farinhas contaminadas, é impossível destruir a aflatoxina por meios práticos.

A contaminação de farinhas elaboradas a partir de amendoim não contaminado pode ser evitada pela adição de bissulfito de sódio, na proporção de 1:10 000; de fato, farinhas puras às quais juntamos bissulfito naquela proporção, mantidas em ambiente ideal para o desenvolvimento do fungo e posteriormente contaminadas, não apresentaram depois de 1 mês quaisquer traços de aflatoxina, enquanto que a farinha testemunho apresentou-se com mais de 15 p.p.m. de aflatoxina. Propionato de cálcio também impede o desenvolvimento do fungo, mas em quantidades anti-econômicas, enquanto que o benzoato de sódio não exerce qualquer ação inibidora.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por cromatografia em C.D. e em papel consegue-se separar perfeitamente as aflatoxinas existentes em produtos naturais.

Produtos de amendoim analisados mostraram-se um alto teor de aflatoxina, sendo que, raramente, se encontrou uma amostra negativa.

Isso evidencia a precariedade das condições higiênicas na conservação do amendoim e na elaboração de derivados; o problema torna-se ainda mais grave quando se verifica que não só as farinhas de amendoim destinadas à fabricação de rações animais mas também praticamente todos os produtos destinados ao consumo humano evidenciaram alto teor em aflatoxina B<sub>1</sub>: “pé de moleque”, “paçoca”, amendoim cru e torrado de várias regiões, amendoim salgado e “amendoim japonês” mostraram-se contaminados.

Além de amendoim e seus produtos procurou-se positivar a aflatoxina em outros produtos e farinhas e com surpresa verificamos estarem as farinhas de mandioca altamente contaminadas; a quantidade de aflatoxina na farinha de mandioca em alguns casos era tão alta que em farinhas de trigo, quando esta continha 10% de farinha de mandioca, podia-se separar e identificar a aflatoxina.

Nozes, castanhas do Pará, castanha de cajú, farinhas de algodão, milho, trigo, soja, sorgo foram analisadas e tôdas se apresentaram livres desta toxina; por outro lado, rações para carneiros, coelhos, cobaias e cavalos mostraram-se contaminadas e ainda, em farinha de gergelim e rações para cavalo, evidenciou-se toxinas que possuíam tôdas as características da esterigmatocistina.

Pela análise destes resultados, chegamos à conclusão de que o desenvolvimento de fungos em certos alimentos naturais é sério, o que naturalmente não é de se estranhar, pois sabemos muito bem quão precárias são as condições de higiene em alguns depósitos e fábricas destes produtos.

#### RESUMO

Descrevem-se técnicas de cromatografia em papel e em camada delgada para pesquisa e determinação de aflatoxina em alimentos para consumo humano e em rações para animais.

Usando essas técnicas foram analisados 32 alimentos, dos quais 20 continham aflatoxina, e 130 rações das quais 104 estavam contaminadas.

Além da farinha de amendoim e outros produtos de amendoim, a farinha de mandioca mostrou-se altamente contaminada com aflatoxina.

Bissulfito de sódio a 1:10 000 mostrou-se efetivo para evitar o desenvolvimento do *Aspergillus flavus* na farinha de amendoim.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLARD, C. — Modalités de la production des aflatoxines. Phytiat. — Phytopharm 14:81-7, 1965.
2. ALLCROFT R. & CARNAGHAN, R. B. A. — Toxic products in groundnuts: biological effects. Chem. Ind. 2:50-3, 1963.
3. ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R. B. A.; SARGEANT, K. & O'KELLY, J. — A toxic factor in Brazilian groundnut meal. Vet. Rec. 73:428-9, 1961.
4. ARMBRECHT, B. K.; HODGES, F. A.; SMITH, H. R. & NELSON, A. A. — Mycotoxins. I. Studies on aflatoxin derived from contaminated peanut meal and certain strains of *Aspergillus flavus*. J. Ass. Off. Agric. Chem. 46:805, 1963.
5. ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M. M.; CHANG, S. B.; WICK, E. L. & WOGAN, G. N. — The structures of aflatoxins B and G<sub>1</sub>.
6. ASAO, TOYOMOBU *et alii* — Aflatoxins B and G. J. Am. Chem. Soc. 85(11):1706-7, 1963.
7. AUSTWICKS, P. K. C. & AYERST, G. — Toxic in groundnuts: groundnut microflora and toxicity. Chem. Ind. 2:55-61, 1963.
8. BAMPTON, S. S. — Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. Trop. Sci. 5:74-81, 1963.
9. BIXLER, E. & LOPEZ, L. C. — Estudios preliminares em aves sobre la toxicidad de los granos atacados por *Aspergillus flavus*. Técnica Pecuária en Mexico, n.º 2, p. 27-9, 1963. Apud MOREAU, C. 32.
10. BROADBENT, J. H.; CORNELIUS, J. A.; SHONE, G. — The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials. Part II. Thinlayer chromatographic procedure. Analyst, Lond. 88:214, 1963.
11. BULLOCK, E.; KIRKALDY, D.; ROBERTS, J. C. & UNDERWOOD, J. G. — Studies in mycological chemistry. Two new metabolites from a variant strain of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi. J. Chem. Soc. 155:829-35, 1963.
12. CHANG, S. B.; ABDEL, KADER, M. M.; WICK, E. L. & WOGAN, G. N. — Aflatoxin B<sub>2</sub>: chemical identity and biochemical activity. Science, N. Y. 142:1191-2, 1963.
13. CHINDEMI, A. & CULTRERA, A. — Considerazioni sui metodi di determinazione dell'aflatoxina B<sub>1</sub> nei semididi arachide e nei prodotti derivati. Boll. Labor. Chim. Provin. 17(1):59-75, 1966.
14. Circolare Ministero della Sanita, del 13 Settembre 1965, n.º 702/8434/202. Apud CHINDEMI, A. 13.
15. COOMES, T. J. & SANDERS, J. C. — The detection and estimation of aflatoxin in groundnut materials. Part I: paper chromatographic procedure. Analyst 88:209, 1963.
16. CROWTHER, P. G. — Metabolite of *Macrospora phaseoli* (Maubl) Ashby with thin-layer chromatographic behavior similar to that of aflatoxin B. Analyst 93:623-4, 1968.
17. DERZSY, D.; MESZAROS, J.; PROKOPOVITSCH, L.; TOT-HBARANY, I. — (Virus hepatitis and toxic hepatitis caused by groundnut meal induck in Hungary). Magy. Allatorv. Lap. 17:49-53, 1962.
18. ENGBRECHET, R. H.; AYRES, J. L. & SINNHUBER, R. O. — Isolation and determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in cottonseed meals. J. Ass. Off. Agric. Chem. 48:815-8, 1965.
19. HAIG, D. A. — (Communication personelle á Carnaghan et Sargeant) 1961. Apud MOREAU, C. 32.
20. HARCKNESS, C.; McDONALD, D.; STONEBRIDGE, W. C.; A'BROOK, J. & DARLING, H. S. — The problem of mycotoxins in groundnuts and other food crops in tropical Africa. Ed. Technol., Lond. 20:72-8, 1966.
21. HARTLEY, R. O.; NESBITT, B. F. & O'KELLY, J. — Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature, Lond. 198:1056-8, 1963.
22. HODGES, F. A.; ZUST, J. R.; SMITH, H. R.; NELSON, A. A.; ARMBRECHT, B. H. & CAMPBELL, A. D. — Mycotoxins; aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*. Science, N. Y. 145: 1439, 1964.
23. KULIK, M. M. & HOLADAY, C. E. — Aflatoxin: a metabolic product of several fungi. Mycopat. Mycol. Appl. 30:137-40, 1966.

24. LAFONT, P. — Les mycotoxines produites par les *Aspergilli* differents d'*A.flavus*. Colloque aflatoxines, Villejuif, 7 mars, 1966.
25. LAFONT, P. — Pollution par *Aspergillus flavus* de produits vegetaux europeens. Colloque aflatoxines, Villejuif, 7 mars, 1966.
26. LEE, W. — Quantitative determination of aflatoxin in groundnut products. Analyst 90:305-7, 1965.
27. LIM HAN KUO & YEP GIM SAI-THE — The occurrence of aflatoxin in Malayan imported oil cakes and groundnut kernels. Malay. Agric. J 45:232-44, 1966.
28. LOOSMORE, R. M.; ALLCROFT, R.; TUTTON, E. A. & CARNAGHAN, R. B. A. — The presence of aflatoxin in a sample of cottonseed cake. Vet. Rec. 76:64-5, 1964.
29. LOOSMORE, R. M. & HARDING, J. D. J. — A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. Vet. Rec. 73:1362-4, 1961.
30. MAYNE, R. J.; PONS, W. A.; FRANZ, A. O. & GOLDBLATT, L. A. — Elaboration of aflatoxin on cottonseed products by *Aspergillus flavus*. J. Am. Oil Chem. Soc. 43:251-3, 1966.
31. MINNE, A. J.; ADELAAR, T. F.; TERBLANCHE, M. & SMITH, J. D. — Vet. Bull. T. XXXIV, p. 516, 1946. *Apud* MOREAU, C.<sup>32</sup>.
32. MOREAU, C. — Moisissures toxiques dans l'alimentation. Paris, Lechevalier, 1968.
33. MOREAU, C. & MOREAU, M. — Pollution fongique de l'atmosphère. Sa responsabilité dans les alterations de quelques denrées alimentaires. Bull. Soc. Mycol. Fr. 75(1):72-9, 1959.
34. NARTEY, F. — Aflatoxins of *Aspergillus flavus* grow on cassava. Physiol. Pl. 19:818-22, 1966.
35. NESBITT, B.; O'KELLY, J.; SARGEANT, K & SHERIDAN, A. — Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature Lond. 195:1062-3, 1962.
36. PARKER, W. A. & MELNICK, D. — Absence of aflatoxin from refined vegetable oils. J. Ass. Off. Agric. Chem. 49:635, 1966.
37. PELHATE, J. — Moisissures dangereuses dans l'alimentation animale. C. R. Hebd. Séanc. Acad. Agric. Fr. 52:850-5, 1966.
38. PETIT, J. P.; REVIÈRE, R.; PERREAU, P. & PAGOT, J. — Recherches sur l'aflatoxine. Revue des travaux effectués pendant le premier semestre 1964 dans les laboratoires centraux de l'I.E.M.V.T. — Rev. Elev. Vét. Pays Trop. 17:239-53, 1964.
39. PONS, W. A. & GOLDBLATT, L. A. — The determination of aflatoxins in cottonseed products. J. Am. Oil Chem. Soc. 42(1):475, 1965.
40. RAYNAUD, J. P. — Une épidémie d'hépatite cirrhotique du porc sévissant à Madagascar. Étude des tests hépatiques chez le porc et utilisation de la vitesse de sédimentation pour un diagnostic précoce. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 16:429-37, 1961.
41. Rep. of the Secretary to the Federal Ministry of Agriculture in Rhodesia and Nyasaland for the year end 20th sept. 1961. Vet. Bull., t. XXXIII, p. 215, 1961. *Apud* MOREAU, C.<sup>32</sup>.
42. SARGEANT, K.; ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R. B. A. — Groundnut toxicity. Vet. Rec. 73:865, 1961.
43. SARGEANT, K.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R. B. A. & ALLCROFT, R. — The assay of a toxic principle in Brazilian groundnut meal. Vet. Rec. 73:1219-23, 1961.
44. SARGEANT, H.; SHERIDAN, A.; O'KELLY, J. & CARNAGHAN, R. B. A. — Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, Lond. 192:1096-7, 1961.
45. SERRES, H. — La toxicité de certains tourteaux d'arachede Y Madagascar. Bull. Madagascar 209:575-80, 1963. *Apud* MOREAU, C.<sup>32</sup>.
46. SHIMKIN, M. B. & KRAYBILL, H. F. — (Non toxicité de l'huile d'arachide). J. Am. Med. Ass. 184:57, 1963.
47. SILLER, W. G. & OSTLER, D. C. — The histopathology of an enterohepatic syndrome of turkey poultry. Vet. Rec. 73:134-8, 1961.
48. SPENSLEY, P. C. — L'aflatoxine, principe actif de la maladie "X" du dindon. Endeavour 22:75-9, 1963.
49. STENVENSON, D. E. — Toxicity associated with certain batches of groundnuts. Br. Vet. J. 118:531-2, 1962.
50. VAN DER ZIJDEN, A. S. M.; KOELENMID, W. A. A. B.; BOLDING, J.; BARRET, C. B.; ORD, W. O. & PHILIP, J. — Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey X disease. Nature, Lond. 195:1060-2, 1962.
51. VAN DORP, D. A.; VAN DER ZIJDEN, A. S. M.; BEERTHUIS, R.F.; SPARRE BOOM, S.; ORD, W. O.; De IONGH, H. & KENNING, R. — Dihydro-aflatoxin B<sub>1</sub> a metabolite of *Aspergillus flavus*. Recl. Trav. Chim. Pays. Bas, Belg. 82:587-92, 1963.
52. WILSON, B. J. *et alii* — Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the *Aspergillus flavus* group. Appl. Microbiol. 16:819, 1968.

