



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**FUMONISINA B<sub>1</sub> EM ARROZ: VALIDAÇÃO DE MÉTODO E EFEITO DE  
TRATAMENTO TÉRMICO NOS NÍVEIS DA MICOTOXINA**

Tania Aparecida Becker

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Badiale Furlong  
Orientadora

Rio Grande/RS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**FUMONISINA B<sub>1</sub> EM ARROZ: VALIDAÇÃO DE MÉTODO E EFEITO DE  
TRATAMENTO TÉRMICO NOS NÍVEIS DA MICOTOXINA**

Tania Aparecida Becker

Dissertação apresentada para  
obtenção do título de Mestre em  
Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Badiale Furlong  
Orientadora

Rio Grande/RS  
2012

*À minha família e ao meu noivo...  
o reconhecimento de vocês sempre foi minha fonte de inspiração!*

## Agradecimentos

Agradeço a Deus e à minha “Santinha” (N. Sr<sup>a</sup>. Aparecida) pela força espiritual e por protegerem a mim e às pessoas que eu amo durante esses dois anos.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliana Badiale-Furlong, dedico dois agradecimentos distintos. Primeiramente, agradeço pela sua orientação, por acreditar no meu trabalho e me aceitar como orientada. Obrigada por sempre se mostrar solícita em ajudar, mesmo quando essas ajudas lhe custavam as horas de descanso dos finais de semana. Obrigada pela dedicação, paciência, ensino e pelas oportunidades de crescimento que me proporcionou. Enfim, obrigada por me orientar! E em segundo lugar, e não menos importante, agradeço pela sua amizade, por desde o início, se preocupar com a minha adaptação e meu bem estar em Rio Grande. Obrigada por me “cuidar” e pelas tantas vezes que me fez companhia no laboratório durante os experimentos de final de semana. Pelas conversas, conselhos, ensinamentos de vida e por saber que posso sempre contar contigo!

Ao Thiago Algeri, meu noivo. Obrigada meu amor, por ter me apoiado desde o dia em que eu decidi “largar tudo” e me inscrever para a seleção do mestrado. Pela incomparável paciência nas horas difíceis e nos momentos de estresse. Obrigada por ter se adaptado ao nosso novo ritmo, e fazer com que esses dois anos “separados” não mudassem em nada a trajetória da nossa história. Pela dedicação e prontidão para me ajudar nos mais variados problemas. Obrigada pelo seu amor, pela sua espera e por sua compreensão. Eu te amo muito!

Aos meus pais, obrigada por tudo! Por sempre estarem do meu lado, me ajudando, me dando força e estímulo. Obrigada mãe por se mostrar forte para que eu não enfraquecesse e por ser meu ponto de equilíbrio. Obrigada pai e mãe, por terem me ensinado que o único caminho que leva ao sucesso é o trabalho!

À minha família, minha irmã Taise, meu irmão Walter, minha cunhada Gisele e meu sobrinho lindo Vinícius. Obrigada pelo amor e dedicação. Por sempre me apoiarem e estarem do meu lado. Eu amo muito vocês!

À minha “família Rio Grandina”, grandes amigos que conquistei e que quero levar sempre comigo. Obrigada Helen pela paciência ao me ensinar a trabalhar com o HPLC, por passar teus conhecimentos que foram tão úteis para a construção deste trabalho e por sempre ter me ajudado quando precisei. Obrigada por ter me acolhido em sua casa por tantos finais de semana, pelas risadas, passeios, enfim, por sua amizade! Obrigada Méri e Rodrigo, por serem meus “anjos da guarda”, e sempre se

mostrarem solícitos em me ajudar, independente do motivo, eu sempre soube que podia contar com vocês. Obrigada Priscila Scaglione, por ser minha amiga, parceira de risadas, conversas, conselhos e festas. Por sempre se mostrar disposta a ajudar quando precisei! Obrigada Re, pela sua amizade, por tantas vezes ter me ajudado com cálculos, sugestões, métodos, aulas práticas e procedimentos. Obrigada pelos conselhos, risadas e conversas. Obrigada Lidi e Pri, pela cumplicidade, amizade e momentos de descontração!

À Bruna e Rafael, por toda a dedicação e comprometimento para o desenvolvimento deste trabalho, por tantas conversas, risadas e acima de tudo pela nossa amizade!

Aos amigos do laboratório, Jesus, Michele, Gabi, Larine, Fernanda, Cristiano, Ane, Tai, Lu, Cris, Grégory, Ale, Denise, Ricardo, Letícia, Adri, Júlio e Ana, por sempre se mostrarem solícitos em ajudar, pelas conversas, risadas, enfim, pela amizade!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jaqueline, por ter contribuído tanto neste trabalho com seu conhecimento e sugestões, aplicadas desde a qualificação, até as mais corriqueiras dúvidas do dia a dia. Obrigada por tantas vezes me auxiliar e sempre se mostrar disponível.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deisy Alessandra Drunkler, por toda ajuda no projeto de doutorado, por me acompanhar desde a graduação, e aceitar fazer parte de mais um momento muito importante na minha vida acadêmica.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Myriam, por aceitar compor esta banca e mais uma vez contribuir com o seu conhecimento para o meu crescimento acadêmico.

À FURG e aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do Mestrado, onde pude contar com a colaboração de todos. À CAPES por proporcionarem o desenvolvimento de meus estudos.

Aos meus amigos no Paraná, pela amizade e cumplicidade! Por sempre manterem contato e me ajudarem quando precisei!

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Nós não atraímos o que queremos, mas o que está em sintonia com o que somos.”*

(Paulo e Lauro Raul)

## Sumário

Lista de tabelas .....	x
Lista de figuras .....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1 Introdução .....	1
2 Objetivos .....	3
2.1 Objetivo geral .....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 Revisão Bibliográfica .....	4
3.1 Arroz .....	4
3.1.1 Características morfológicas do arroz .....	4
3.1.2 Composição química do arroz .....	6
3.1.3 Classificação do arroz .....	8
3.1.4 Produção e consumo do arroz.....	10
3.2 Contaminação de alimentos .....	13
3.2.1 Contaminação fúngica de alimentos .....	13
3.2.2 Micotoxinas .....	15
3.2.3 Contaminação micotoxicológica do arroz .....	18
3.2.4 Fumonisinas.....	19
3.2.5 Legislação .....	22
3.2.6 Métodos para detecção de FB <sub>1</sub> em alimentos.....	24
3.2.7 Efeito do tratamento térmico na redução de FB <sub>1</sub> em alimentos.....	26
4 Material e Métodos.....	29
4.1 Solventes e reagentes.....	29
4.1.1 Padrão de Fumonisina B <sub>1</sub> .....	30
4.2 Equipamentos .....	30
4.3 Amostras .....	31
4.3.1 Área de estudo e abrangência.....	31
4.3.2 Preparo da amostra.....	32
4.4 Padronização da determinação de fumonisina B <sub>1</sub> .....	33
4.4.1 Confirmação da fluorescência de FB <sub>1</sub> :OPA-MCE por HPTLC.....	33

4.5 Estabelecimento das condições cromatográficas .....	33
4.5.1 Condições para determinação por HPLC-FL .....	33
4.5.2 Limite de detecção e quantificação do instrumento .....	34
4.5.3 Linearidade e Faixa de Aplicação.....	34
4.5.4 Precisão do instrumento.....	35
4.5.4.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída) .....	35
4.5.4.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas).....	35
4.5.5 Exatidão .....	36
4.5.6 Robustez .....	36
4.5.6.1 pH da fase móvel.....	36
4.5.6.2 Condições e tempo de derivatização do padrão .....	37
4.6 Estabelecimento das condições de extração.....	37
4.6.1 Método de Binkerd .....	38
4.6.2 Método de QuEChERS .....	38
4.6.3 Limite de detecção e quantificação do método .....	39
4.6.4 Ensaio de recuperação.....	39
4.6.5 Seletividade.....	40
4.6.6 Precisão do método.....	41
4.6.6.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída) .....	41
4.6.6.2 Exatidão do método.....	41
4.6.7 Aplicação do método cromatográfico.....	41
4.7 Efeito do tratamento térmico sobre os níveis de FB <sub>1</sub> em arroz.....	41
4.7.1 Tratamento hidrotérmico com evaporação da água.....	42
4.7.2 Tratamento hidrotérmico com autoclavagem .....	42
4.7.3 Tratamento térmico seco .....	43
4.8 Determinação da Fumonisina B <sub>1</sub> .....	44
4.9 Estimativa de redução de FB <sub>1</sub> .....	44
4.10 Caracterização química.....	44
4.10.1 Composição química .....	44
4.10.2 Teor de tirosina .....	45
4.10.3 Digestibilidade <i>in vitro</i> .....	45
4.11 Análise estatística .....	45
5 Resultados e Discussão .....	47
5.1 Padronização da determinação de Fumonisina B <sub>1</sub> .....	47



5.1.1 Confirmação da fluorescência por HPTLC.....	47
5.2 Estabelecimento das condições cromatográficas HPLC.....	48
5.2.1 Condições para determinação por HPLC-FL.....	48
5.2.2 Limites de detecção e quantificação, linearidade e faixa de aplicação do instrumento.....	50
5.2.3 Precisão – Repetibilidade (precisão inter-corrída) e precisão intermediária (precisão intra-corrída) do sinal do instrumento.....	51
5.2.4 Robustez.....	53
5.2.4.1 pH da fase móvel.....	53
5.2.4.2 Condições e tempo de derivatização.....	54
5.3 Estabelecimento das condições de extração.....	56
5.3.1 Estudo da recuperação do Método de Binkerd e QuEChERS.....	56
5.3.2 Limite de detecção e quantificação do método.....	58
5.3.3 Ensaio de recuperação.....	59
5.3.4 Seletividade.....	60
5.3.5 Precisão e exatidão do método.....	61
5.3.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída) e exatidão.....	61
5.4 Aplicação do método padronizado.....	62
5.4.1 Ocorrência de FB <sub>1</sub> em amostras de arroz.....	62
5.5 Efeito dos tratamentos térmicos nos níveis de contaminação por FB <sub>1</sub> .....	66
5.5.1 Tratamento hidrotérmico com evaporação.....	66
5.5.2 Tratamento hidrotérmico com autoclavagem.....	68
5.5.3 Tratamento térmico seco.....	71
5.6 Caracterização química das amostras.....	78
5.6.1 Composição química.....	78
5.6.2 Teor de tirosina.....	81
5.6.3 Digestibilidade protéica <i>in vitro</i> .....	83
6 Conclusões.....	86
7 Referencias Bibliográficas.....	88

## Lista de tabelas

Tabela 1: Composição centesimal média ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido. ....	7
Tabela 2: Principais espécies de fungos toxigênicos e suas micotoxinas.....	15
Tabela 3: Micotoxinas, seus principais fungos produtores, material contaminado e efeitos biológicos no homem e animais. ....	17
Tabela 4: Limites Máximos Toleráveis para $\text{FB}_1$ e $\text{FB}_2$ em alimentos, segundo RDC ANVISA, 2011. ....	23
Tabela 5: Constituição da unidade amostral e identificação das amostras. ....	32
Tabela 6: Testes de composição da fase móvel.....	34
Tabela 7: Valores reais e codificados das variáveis do DCC: tratamento hidrotérmico com autoclavagem. ....	43
Tabela 8: Valores reais e codificados das variáveis independentes do DCCR: tratamento térmico seco.....	43
Tabela 9: Condições cromatográficas para separação de Fumonisina $\text{B}_1$ . ....	50
Tabela 10: Indicativos de eficiência para determinação de $\text{FB}_1$ por HPLC-FL.....	50
Tabela 11: Repetibilidade ou precisão intra-corrída e exatidão ( $\text{RSD}_r$ ) do instrumento.....	51
Tabela 12: Precisão intermediária ou precisão inter-corrída ( $\text{RSD}_{pi}$ ) do instrumento. ..	52
Tabela 13: Valores de exatidão para Precisão intermediária ou precisão inter-corrída ( $\text{RSD}_{pi}$ ) do instrumento. ....	52
Tabela 14: Indicativos de eficiência das curvas padrão e de robustez.....	53
Tabela 15: Repetibilidade e exatidão da curva de robustez.....	54
Tabela 16: Áreas dos picos referentes a quantificação de $\text{FB}_1$ sob diferentes proporções de padrão:OPA-MCE.....	55
Tabela 17: Recuperação (%R) e CV% dos métodos de extração QuEChERS e Binkerd.....	57
Tabela 18: Valores de recuperação (%R) e CV% para $\text{FB}_1$ em amostras de arroz.....	59
Tabela 19: Indicativos de eficiência para as curvas analíticas da matriz e do padrão..	61
Tabela 20: $\text{RSD}_r$ e exatidão do método QuEChERS para extração de $\text{FB}_1$ em arroz. .	61
Tabela 21: Quantificação de $\text{FB}_1$ em amostras naturalmente contaminadas. ....	63
Tabela 22: Níveis de redução (%) de $\text{FB}_1$ em amostras de arroz após cocção.....	67
Tabela 23: Matriz do DCC com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de Redução de $\text{FB}_1$ (%), para o Tratamento térmico com autoclavagem.....	68

Tabela 24: ANOVA do modelo linear para Redução de $FB_1$ (%) através de tratamento hidrotérmico com autoclavagem.....	70
Tabela 25: ANOVA do modelo linear para Redução de $FB_1$ (%) considerando os efeitos significativos.....	71
Tabela 26: Matriz do DCCR com níveis reais e codificados das variáveis, respostas para Redução de $FB_1$ (%), valores preditos pelo modelo e desvios relativos para o tratamento térmico seco.....	73
Tabela 27: ANOVA do modelo quadrático para predição da Redução de $FB_1$ após tratamento térmico seco.....	74
Tabela 28: ANOVA do modelo quadrático para predição da Redução de $FB_1$ .....	75
considerando os efeitos significativos.....	75
Tabela 29: Composição química de amostras de arroz cru e com cocção. ....	79
Tabela 30: Teores de tirosina quantificados em amostras de arroz cru e após cocção .....	82

## Lista de figuras

Figura 1: Constituintes do grão de arroz.....	4
Figura 2: Participação (%) dos principais estados produtores de arroz do Brasil em 2008.....	12
Figura 3: Estrutura química das principais fumonisinas.....	20
Figura 4: Estrutura química da Fumonisina B <sub>1</sub> .....	20
Figura 5: Estrutura dos produtos de degradação da FB <sub>1</sub> formados sob condições de tratamento térmico. ....	28
Figura 6: Procedimento para quarteamento de amostra sólida. ....	32
Figura 7: Cromatogramas de eluição de FB <sub>1</sub> em HPLC utilizando quatro diferentes fases móveis. ....	49
Figura 8: Cromatogramas de separação em fase reversa de derivados de FB <sub>1</sub> .....	55
Figura 9: Cromatogramas de eluição de FB <sub>1</sub> .....	63
Figura 10: Superfície de resposta e curva de contorno para redução de FB <sub>1</sub> em função do nível de contaminação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). ....	76
Figura 11: superfície de resposta e curva de contorno para redução de FB <sub>1</sub> em função do nível de contaminação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e tempo de aquecimento (min).....	76
Figura 12: superfície de resposta e curva de contorno para redução de FB <sub>1</sub> em função da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo de aquecimento (min).. ....	76
Figura 13: Estimativa da digestibilidade in vitro de amostras de arroz cru (barras vermelhas) e arroz com cocção (barras azuis). ....	84

## Lista de Abreviaturas

- % R – Porcentagem de Recuperação
- % Red – Porcentagem de Redução
- ACN - Acetonitrila
- AFB<sub>1</sub> - Aflatoxina B<sub>1</sub>
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC – “Association of Official Analytical Chemistry”
- AP<sub>x</sub> - Amino-pentol
- CCD - Cromatografia de Camada Delgada
- CV – Coeficiente de Variação
- DDA - Digestão Diária Admissível
- DON - Deoxinivalenol
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FAO – “Food and Agriculture Organization of the United Nations”
- FB<sub>1</sub> - Fumonisina B<sub>1</sub>
- FB<sub>1</sub>:OPA-MCE – Fumonisina B<sub>1</sub>:o-phtaldialdeído-2-mercaptoetanol
- GC-FID - Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas
- GC-MS - Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa
- GL - Graus de Liberdade
- HFB<sub>x</sub> - Fumonisinas Hidrolisadas
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- HPLC-FL - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência
- HPTLC – Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IN – Instrução Normativa
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- IRGA – Instituto Rio Grandense de Arroz
- LEM - Leucoencefalomalácia
- LMT – Limite Máximo Tolerável
- LOD – Limite de Detecção
- LOD<sub>i</sub> – Limite de Detecção do Instrumento
- LOD<sub>m</sub> – Limite de Detecção do Método
- LOQ – Limite de Quantificação
- LOQ<sub>i</sub> – Limite de Quantificação do Instrumento

LOQ<sub>m</sub> – Limite de Quantificação do Método  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MCE – 2-mercaptoetanol  
MetOH - Metanol  
MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de Magnésio  
MQ - Média Quadrática  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato de Sódio Dibásico  
NaCl – Cloreto de Sódio  
OPA – o-phtaldialdeído  
OTA – Ocratoxina A  
PMTDI - Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória  
QuEChERS – “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”  
RSD% - Desvio Padrão Relativo Porcentual  
RSD<sub>pi</sub> – Precisão Intermediária  
RSD<sub>r</sub> - Repetibilidade  
So/Sa – Metabolismo esfinganina/esfingosina  
SQ - Soma Quadrática  
TACO – Tabela de Composição de Alimentos  
T-2 – Toxina T<sub>2</sub>  
UV – Ultra Violeta  
WHO – “World Health Organization”  
WHO-IARC – “World Health Organization – International Agency for Research on Cancer”  
ZEA - Zearalenona

## Resumo

O arroz (*Oryza sativa*, L.), como todos os cereais, pode ser contaminado por fungos responsáveis por danos tecnológicos, nutricionais e toxicológicos, dentre eles a produção de micotoxinas. Diversas toxinas fúngicas produzidas pelo gênero *Fusarium* tem sido relatadas em arroz, no entanto a fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) é pouco estudada neste grão. As principais características da FB<sub>1</sub> é a alta solubilidade em solventes polares, estabilidade a altas temperaturas além de efeitos neurotóxicos e carcinogênicos. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico e hidrotérmico nos teores de fumonisina B<sub>1</sub> e nas características químicas de arroz comercial. Na primeira etapa do trabalho foi adaptado um método para detecção e quantificação de FB<sub>1</sub> em arroz cru e após cocção, por HPLC-FL. O método foi avaliado quanto aos indicativos de eficiência destacando-se o LOD (30 µg.kg<sup>-1</sup>) e a recuperação (90% para arroz cru e 86% pra arroz cozido). Na segunda etapa realizou-se o levantamento de ocorrência de FB<sub>1</sub> em 05 diferentes amostras comerciais de arroz integral, branco e parboilizado da cidade de Rio Grande, RS, totalizando 9 amostras. Foi detectada a presença de FB<sub>1</sub> em 7 das 9 amostras, sendo que os maiores índices foram encontrados em amostras de arroz parboilizado e integral apresentando níveis de contaminação entre 30 e 170 µg.kg<sup>-1</sup>. A terceira etapa do trabalho consistiu no estudo do efeito de tratamentos térmicos sobre os níveis de FB<sub>1</sub> em amostras após aplicação de calor. Foram testados tratamento hidrotérmico com evaporação, tratamento hidrotérmico com autoclavagem e tratamento térmico seco. O maior nível de redução dos teores iniciais de FB<sub>1</sub> foi 82,8% quando se empregou tratamento térmico seco a 125 °C/3 min. Ainda foram avaliados os efeitos do tratamento hidrotérmico com evaporação de água na composição química e na digestibilidade protéica. Esta característica proporcionou aumento de até 100% na digestibilidade *in vitro* das proteínas e reduziu em média 73% do teor de contaminação com FB<sub>1</sub>.

Palavras chave: arroz; composição química; digestibilidade *in vitro*; fumonisina B<sub>1</sub>; tratamento térmico.

## Abstract

### Effect of Thermal and Hydrothermal Treatment in Levels of Mycotoxins in Rice

The rice (*Oryza sativa L.*) as all cereals, can be contaminated by fungi responsible for technological, nutritional and toxicological damages, including the production of mycotoxins. Several fungal toxins produced by *Fusarium* has been studied in rice, among them are the fumonisins. However, the fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) is little studied in this grain. The main features of FB<sub>1</sub> are the high solubility in polar solvents, stability at high temperatures and the neurotoxic and carcinogenic effects. Thus the objective of this study was to evaluate the effect of thermal treatment on the levels of fumonisin B<sub>1</sub> and in chemical and physical characteristics of commercial rice. In the first step of this study was adapted a method for detection and quantification of FB<sub>1</sub> in nature rice and after cooking, by HPLC-FL. The method was evaluated for the indicative efficiency emphasizing the LOD (30 µg.kg<sup>-1</sup>) and recovery (90% for rice in nature and 86% for cooked rice). In the second step was did a survey of the occurrence of FB<sub>1</sub> in 05 comercial samples of integral, white and parboiled rice, sold in Rio Grande, RS, totaling nine samples. We reported the presence of FB<sub>1</sub> in 7 of 9 samples with the highest values in samples of integral rice with levels of contamination between 30 and 170 µg.kg<sup>-1</sup>. The third step of this study was to study the thermal treatment effect on the levels of FB<sub>1</sub> in samples after heat aplication. They were tested: evaporation hidrothermal treatment, hidrothermal treatment with autoclaving and dry thermal treatment. The highest level of reduction of the initial content of FB<sub>1</sub> was 82.8% when used dry thermal treatment at 125 °C/3 min. We also evaluated the hidrothermal treatment with water evaporation effects on the centesimal composition and protein digestibility. This feature provided an increase of up to 100% in vitro proteins digestibility, and reduced by 73% the average content of FB<sub>1</sub>.

Key words: rice; physical chemical composition; *in vitro* digestibility; fumonisin B<sub>1</sub>; thermal treatment.



## 1 Introdução

Uma das principais fontes alimentícias, o arroz, juntamente com o trigo e o milho é um dos principais cereais cultivados e consumidos no mundo. Com a maior parcela do consumo nos países asiáticos, o arroz se tornou um alimento básico para grande parte da população mundial. De acordo com dados da Embrapa (2010) no Brasil, apesar da pulverização da produção, esta pode ser dividida em três pólos: o primeiro é a Região Sul, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul, o segundo é a região Central, abrangendo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso, e o terceiro pólo o estado do Maranhão. Segundo dados do IBGE (2011), o Rio Grande do Sul obteve recorde de produção em 2011, alcançando 13,5 milhões de toneladas, contribuindo assim com aumento de 19,5% da produção nacional.

O arroz produzido na região sul do país tem qualidade para competir no mercado internacional, devido à produção ser baseada no sistema irrigado que, comparado com o sistema de plantio em terras altas, adere maior valor ao grão, aumentando assim, o potencial do Brasil como exportador deste cereal. No entanto, as condições de cultivo além da climática favorecem a contaminação fúngica que representa a possibilidade de danos econômicos, nutricionais e toxicológicos.

O arroz tem alto valor nutricional em função de sua composição química, que está diretamente relacionada com o tipo de arroz, sendo os componentes distribuídos nas diferentes frações do cereal. Quando é submetido a beneficiamento, alguns nutrientes podem ser separados, parcial ou inteiramente, do produto destinado à alimentação humana. Esta distribuição de nutrientes também norteia o risco de contaminação fúngica, ou seja, algumas frações são mais susceptíveis que outras. Considerando a forma de consumo, é importante o estudo da disponibilidade e digestibilidade dos nutrientes tanto na amostra bruta quanto submetida aos devidos tratamentos de beneficiamento (polimento, parboilização) e para consumo (tempero, cocção e outros), bem como do risco de ocorrência de contaminantes químicos e biológicos.

Um aspecto importante na qualidade do arroz refere-se a contaminação micotoxicológica, especialmente pela freqüência do consumo rotineiro no país e os relatos contínuos de micotoxinas em arroz e seus derivados. Também neste caso o tratamento de preparo é um fator que afeta efetivamente os níveis de toxinas ingeridas na dieta.

No grupo das micotoxinas as fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> tem chamado atenção dos pesquisadores e órgãos regulamentadores. A fumonisina B<sub>1</sub> é a mais abundante em cereais, representando até 70% do total de fumonisinas produzidas em culturas de laboratório ou em milho naturalmente contaminado, além de ser a mais tóxica, segundo classificação da “World Health Organization – International Agency for Research on Cancer” como possivelmente carcinogênica para humanos (CAWOOD et al., 1991; WHO-IARC, 1993). Esta toxicidade vem sendo relacionada com casos de câncer de esôfago em humanos, e também a efeitos neurotóxicos em animais de criação. O alimento mais frequentemente contaminado com esta micotoxina é o milho e seus derivados, porém as condições de produção do arroz no Rio Grande do Sul propiciam a contaminação por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, produtores desta toxina.

Assim como outras micotoxinas em geral, as fumonisinas são termicamente estáveis, e estudos revelam que a FB<sub>1</sub> pode ser resistente a temperaturas de até 150 °C, portanto, o emprego de tratamento térmico no arroz, além de poder alterar a disponibilidade e digestibilidade dos nutrientes, ainda pode intervir nos níveis de ingestão de FB<sub>1</sub> ou de outra toxina.

Tendo em vista os poucos relatos de FB<sub>1</sub> em arroz, destes nenhum referenciado ao tratamento térmico e seus efeitos neste contaminante ou na composição química e digestibilidade protéica, este trabalho vêm acrescentar informações referentes à ocorrência de FB<sub>1</sub> em amostras de arroz comercializadas no estado responsável pela maior produção nacional deste cereal. Além disso, pode indicar as reais concentrações de alguns nutrientes disponíveis e proteínas digeridas após aplicação de tratamento térmico neste alimento que, além de ter alto valor nutricional, faz parte da dieta de milhares de pessoas em todo o mundo.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Padronizar metodologia para determinação de fumonisina B<sub>1</sub> e avaliar o efeito do tratamento térmico e hidrotérmico nos teores dela e nas características químicas de arroz comercializado para consumo humano.

### 2.2 Objetivos específicos

- Padronizar metodologia para determinação de fumonisina B<sub>1</sub> em arroz empregando HPLC-FL;
- Avaliar ocorrência de fumonisina B<sub>1</sub> em arroz comercial integral, branco e parboilizado;
- Determinar efeito de tratamentos térmicos (tratamento hidrotérmico com evaporação, tratamento hidrotérmico com autoclavagem e tratamento térmico seco) nos níveis de fumonisina B<sub>1</sub> em arroz.
- Caracterizar nutricionalmente através da composição química e digestibilidade proteica de arroz cru e tratado termicamente.

### 3 Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Arroz

##### 3.1.1 Características morfológicas do arroz

O arroz (*Oryza sativa L.*) é um cereal consumido principalmente como grão inteiro, constituído por diversos tecidos, que apresentam estrutura, composição química e funções diferenciadas (VIEIRA e CARVALHO, 1999). O grão de arroz (Figura 1) é basicamente constituído pela cariopse e por uma camada protetora, a casca. A casca é composta de duas folhas modificadas, a pálea e a lema. A cariopse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona. A camada de aleurona apresenta duas estruturas de armazenamento proeminentes, os grãos de aleurona (corpos protéicos) e os corpos lipídicos. No lado ventral na base do grão está localizado o embrião ou gémem, que é rico em proteínas e lipídios. O endosperma forma a maior parte do grão e é constituído por células ricas em grânulos de amido e alguns corpos protéicos. O grão de arroz pode apresentar forma ablonga, ablonga estreita, arredondada ou recurvada, cujas dimensões variam entre 5 e 11 mm (JULIANO e BECHTEL, 1985; NESS, 1998).

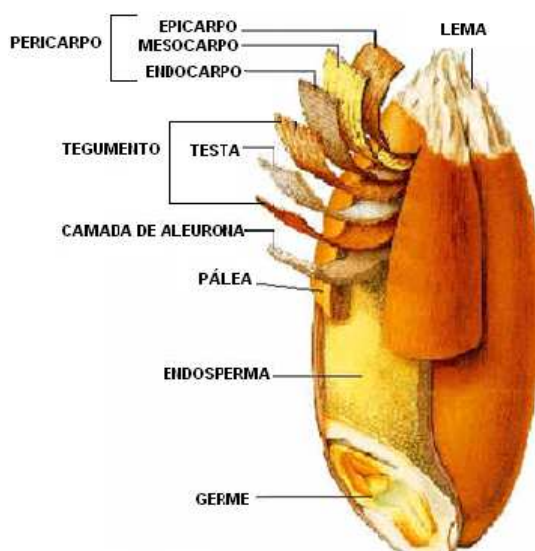


Figura 1: Constituintes do grão de arroz

Fonte: Adaptado de GRAINS, (2010)

A casca do arroz corresponde cerca de 20% (m/m) do peso do grão e devido a sua alta dureza, fibrosidade e natureza abrasiva, os produtos obtidos a partir dela são de baixa propriedade nutritiva porém de boa resistência ao desgaste e muita cinza. Atualmente, parte desta casca é utilizada na fabricação de blocos e painéis empregados na construção civil, onde substitui a fibra de madeira comumente utilizada e uma grande quantidade é reaproveitada dentro da própria usina de beneficiamento do arroz onde, a partir da sua combustão, é gerado calor para a parboilização (KENNEDY et al., 2002; DELLA, et al., 2001).

O pericarpo é composto pelas camadas que envolvem o endosperma amiláceo do grão de arroz, sendo rico em proteínas, lipídeos, vitaminas e sais minerais. É muito utilizado na fabricação de ração animal, combustível e fertilizante (ALENCAR e ALVARENGA, 1991).

O embrião representa 2 a 3% (m/m) do peso do grão integral e está ligado ao endosperma. As células do embrião contém amido, proteína e gordura armazenados, os quais são usados na germinação como fonte de energia e síntese de enzimas (MARSHAL e WADSWORTH, 1993).

O endosperma corresponde entre 89 e 93% (m/m) da cariopse, constitui a maior fração do arroz polido. É a parte do grão de arroz utilizada na alimentação humana que após o polimento apresenta em sua composição grânulos de amido e algumas proteínas, entre outros constituintes. Devido a diferenças morfo-fisiológicas, o endosperma divide-se em duas frações: aleurona e endosperma (KENT, 1993, citado por NESS, 1998).

A camada do aleurona é formada pela parte externa do endosperma, sendo que o número de camadas presente varia dependendo da origem do grão, variedade e fatores ambientais. As proteínas e amido presente no endosperma são responsáveis pelas mudanças que ocorrem no arroz, sendo que o baixo conteúdo de amilose faz com que haja espaços aéreos no grão facilitando a quebra durante a moagem. Já o germe é separado do endosperma pelo escutelo e consiste de plúmula e radícula (SALUNKHE, et al., 1999).

Segundo a FAO (2006), já foram identificadas 140.000 variedades de arroz, sendo que as principais diferenças observadas entre elas são origem genética, dimensões e composição do amido quanto ao teor de amilose. Nos países asiáticos, mais de dois bilhões de habitantes tem o arroz e seus derivados como fontes de 60 a 70% das calorias ingeridas diariamente.

O arroz pertence ao gênero *Oryza* compreende 21 espécies, das quais apenas uma tem importância comercial no Brasil, a *Oryza sativa* L. Esta espécie divide-se em três principais sub-espécies: índica, japônica e javânica, consumindo-se mais as duas primeiras. Os grãos da sub-espécie índica são longos, finos e apresentam-se mais longos quando cozidos do que os da sub-espécie japônica, que tem normalmente grãos curtos e largos, neste caso, devido ao baixo teor de amilose, depois de cozidos os grãos ficam bem macios (KENNEDY e BURLINGAME, 2003).

### 3.1.2 Composição química do arroz

De acordo com Badiale-Furlong, (2005) “o valor nutricional de um alimento é função de sua composição química e da disponibilidade de nutrientes nele contidos. No caso do arroz a primeira observação a ser destacada é que se trata de um alimento obtido de uma semente, uma porção vegetal que possui a função biológica de perpetuar a espécie dando origem a um novo indivíduo. Conseqüentemente todos os “esforços” metabólicos no vegetal são no sentido de acumular nutrientes nesta porção de modo a subsidiar as primeiras necessidades do novo indivíduo, indiscutivelmente o que pode ser mais nutritivo.”

O arroz é constituído por amido, maior componente, proteína, lipídios, cinzas e vitaminas (Tabela 1). Entretanto, ao ser separado em frações durante o beneficiamento, a composição de cada uma delas é diferenciada e afetada por variáveis abióticas do ambiente, de manejo, de processamento e de armazenamento (ZHOU et al., 2002), além de variáveis bióticas que resultam em grãos com características nutricionais diferenciadas, dependendo da fração em que estão. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido. A forma mais usual de consumo é o endosperma amiláceo cujo polimento resulta em redução no teor de nutrientes, exceto de amido, originando as diferenças na composição entre o arroz integral, o polido e o parboilizado (STORCK, 2004).

Tabela 1: Composição centesimal média (g.100g<sup>-1</sup> matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido.

<b>Constituinte</b>	<b>Arroz integral</b>	<b>Arroz branco polido</b>	<b>Arroz parboilizado polido</b>
Amido total	74,1	87,6	85,1
Proteínas	10,5	8,9	9,4
Lipídios	2,5	0,4	0,7
Cinzas	1,2	0,3	0,7
Fibra total	11,7	2,9	4,1
Fibra insolúvel	8,9	1,1	1,6
Fibra solúvel	2,8	1,8	2,5

Fonte: Adaptado de STORCK (2004).

De acordo com Hosenev, (1991) e Lam-Sanchez et al., (1994), em relação aos constituintes do grão de arroz, pode-se simplificar a composição do grão em seus constituintes e distribuição. Os carboidratos são representados basicamente pelo amido, que se encontra presente na forma de amilose e amilopectina. Os lipídios estão concentrados no farelo (80%), sendo que 1/3 desta fração está concentrada no germe. As vitaminas do complexo B estão distribuídas uniformemente no farelo e germe.

As proteínas estão distribuídas em todos os tecidos do grão, apresentando maior concentração no germe e no farelo, e no endosperma a sua concentração diminui da periferia para o centro. Apesar de o conteúdo de proteínas no arroz ser considerado baixo, em média 7%, esses valores podem variar entre 4,5 e 11,0% dependendo principalmente das características genótípicas, adubação nitrogenada, radiação solar e temperatura durante o desenvolvimento do grão (WALTER, et al., 2008). Da mesma forma, também existem diferenças na composição de aminoácidos das proteínas entre o arroz integral e o polido. A qualidade da proteína depende da digestibilidade e do conteúdo em aminoácidos e no arroz a lisina é o aminoácido limitante, embora comparado a outros cereais está em maiores concentrações nele, resultando em balanço de aminoácidos mais completo que outros (JULIANO, 1993). Além dos aminoácidos protéicos, o arroz também apresenta pequena quantidade de aminoácidos livres, localizados principalmente no gérmen (594,9mg.100g<sup>-1</sup>) e no farelo (361,4mg.100g<sup>-1</sup>), com pequena concentração no endosperma (52,7mg.100g<sup>-1</sup>). Entre os aminoácidos livres, predominam aspartato e glutamato, que correspondem a aproximadamente 60% do total (SAIKUSA, et al., 1994).

O teor de digestibilidade em um tecido vegetal pode ser medido através da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado absorvível nas condições do trato digestório. Trata-se portanto de um determinante da qualidade protéica da dieta. Estudos sobre a digestibilidade de fontes protéicas vegetais como o arroz, indicaram valores entre 67 a 89% para a amostra crua e 93% após a cocção (CINTRA, et al., 2007; MARCHINI, et al., 1994).

Além destes constituintes, estão as enzimas amilase, lipase, peroxidase e a lipoxigenase que são as principais responsáveis pela deterioração do grão. Com relação aos minerais, o teor médio de cinzas pode variar de 1,22% no arroz descascado para 0,36% no arroz branco polido. Fósforo, cálcio e potássio correspondem a mais de 50% das cinzas do arroz. A distribuição das cinzas nas frações de beneficiamento são em média 10% no germe, 28% no endosperma e 62% no pericarpo, no tegumento e na aleurona (AKAZAMA, 1972 e LECLERC, 1952, citados por NESS 1998).

### 3.1.3 Classificação do arroz

De acordo com a Instrução Normativa nº 6, de 16 de Fevereiro de 2009, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) o arroz é classificado em grupos, subgrupos, classes e tipos.

“Grupos: O arroz, segundo a forma de apresentação, será classificado nos seguintes grupos:

- arroz em casca;
- arroz beneficiado.

Subgrupos: O arroz em casca e o arroz beneficiado, de acordo com o processo de beneficiamento, serão classificados nos seguintes subgrupos:

- subgrupos do arroz em casca:
  - a) arroz natural; e
  - b) arroz parboilizado;
- subgrupos do arroz beneficiado:
  - a) arroz integral;
  - b) arroz polido;
  - c) arroz parboilizado integral; e
  - d) arroz parboilizado polido”.



O arroz integral e parboilizado integral resultam da retirada apenas das cascas e, apesar de mais nutritivos correspondem às formas menos consumidas no Brasil. As razões que levam ao seu menor consumo se devem principalmente a sua reduzida vida útil e sabor pouco aceitável para o hábito alimentar brasileiro (SLOAN, 2005).

Para a produção de arroz polido são retirados além da casca, o pericarpo, camada de aleurona e o embrião, conhecidos como farelo de arroz, restando o endosperma que basicamente contém amido. Durante o polimento são removidos grande parte dos lipídeos, minerais e principalmente vitaminas hidrossolúveis (AMATO et al., 2002).

O processo de parboilização tem como principais etapas a imersão do arroz em água potável a uma temperatura superior a 58°C, seguido de gelatinização total ou parcial do amido e secagem. Após a parboilização o arroz pode ser submetido a dois processos: retirada das cascas, denominado então de arroz parboilizado integral e polimento após o descasque, sendo chamado de arroz parboilizado polido (BRASIL, 1988).

Ainda de acordo com a IN 6 do MAPA (2009) o arroz pode ser classificado pelas diferentes classes, e tipos:

“Classes: O arroz em casca, o arroz beneficiado, o arroz das variedades especiais em casca ou beneficiado e o arroz com premix, de acordo com as dimensões do grão, serão classificados nas seguintes classes:

- longo fino: é o produto que contém, no mínimo, 80% (oitenta por cento) do peso dos grãos inteiros medindo 6,00 mm (seis milímetros) ou mais no comprimento, a espessura menor ou igual a 1,90 mm (um vírgula noventa milímetros) e a relação comprimento/ largura maior ou igual a 2,75 (dois vírgula setenta e cinco), após o polimento dos grãos;

- longo: é o produto que contém, no mínimo, 80% (oitenta por cento) do peso dos grãos inteiros medindo 6,00 mm (seis milímetros) ou mais no comprimento, após o polimento dos grãos;

- médio: é o produto que contém, no mínimo, 80% (oitenta por cento) do peso dos grãos inteiros, medindo de 5,00 mm (cinco milímetros) a menos de 6,00 mm (seis milímetros) no comprimento, após o polimento dos grãos;

- curto: é o produto que contém, no mínimo, 80% (oitenta por cento) do peso dos grãos inteiros medindo menos de 5,00 mm (cinco milímetros) de comprimento, após o polimento dos grãos; e

- misturado: é o produto que não se enquadra em nenhuma das classes anteriores.

Tipos: O arroz em casca e o arroz beneficiado serão classificados em cinco tipos, de acordo com a sua qualidade.

Este regulamento visa também definir o padrão oficial de classificação do arroz, considerando seus requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem, nos aspectos referentes à classificação do produto”.

Pode-se observar que a legislação não considera para classificação os aspectos composição química, disponibilidade de nutrientes ou aspecto toxicológico, embora estas sejam características importantes para a segurança alimentar.

#### 3.1.4 Produção e consumo do arroz

Cultivado em todo mundo, o arroz desempenha papel importante, como alimento básico da população mundial, principalmente no continente asiático. Entre os principais grãos cultivados no mundo apresenta-se como o segundo em volume produzido e área cultivada, perdendo apenas para o milho. De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) a produção mundial de arroz em 2011 pode ter alcançado um número recorde, com aumento de 21,4 milhões de toneladas, podendo o valor ser 3% maior que o registrado em 2010 (AZAMBUJA et al., 2002; MISSIONÁRIA, 2012; AGOSTINI e VIEIRA, 2011).

O arroz, além de ser um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico, também é considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, como a Ásia e Oceania. Faz parte da alimentação básica de cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população (EMBRAPA, 2005).

O arroz é uma gramínea adaptada ao meio ambiente aquático. Esta adaptação é possível devido ao parênquima, especial no colmo da planta que possibilita a passagem do oxigênio do ar para a camada rizosfera (sistema radicular). Isto torna possível o plantio em ecossistema de várzeas (irrigado), também conhecido como taipas de nível. Esta gramínea cresce nas mais variadas condições: de 50° de latitude norte a 40° de latitude sul, e em altitudes inferiores ao nível do mar ou superiores a 3000 metros (COUNCE et al. 2000; EMPRAPA, 2010).

A média do consumo mundial per capita/ano de arroz, segundo a FAO, é de 58 Kg/hab/ano, com demanda crescente nos últimos seis decênios. O consumo per capita atinge 80 kg/hab/ano em países como China, Birmânia e Indonésia, que são os maiores consumidores mundiais desse cereal. O Brasil, juntamente com a Colômbia e o Senegal tem um consumo em nível intermediário, oscilando entre 40 e 60 kg/hab/ano, enquanto que os Estados Unidos, a Espanha e a França consomem menos de 10 kg/hab/ano, considerados assim, baixo consumo (AGOSTINI e VIEIRA, 2011).

O arroz é cultivado em todos os continentes, sendo que o asiático tem a maior concentração, com destaque para China, Índia, Indonésia, Vietnã e Tailândia, responsáveis por 30,2%, 21,3%, 8,2%, 5,6% e 4,5% da produção mundial, respectivamente. O Brasil alcança o sétimo lugar no *ranking* mundial de produção de arroz beneficiado, com aproximadamente 7,9 milhões de toneladas produzidas no ano de 2011 (RAMOS, 2011).

De acordo com as estimativas da USDA, na próxima safra (2011/12) a produção mundial de arroz beneficiado será de 456,39 milhões de toneladas. Houve um ligeiro recuo no estoque final em relação ao da safra anterior, de 96,48 milhões para 94,9 milhões de toneladas de arroz beneficiado. Contribuíram para esse recuo do estoque final o aumento no consumo, que superou ligeiramente a produção, e o aumento das exportações, que superaram as importações em mais de 10%, as quais caíram ligeiramente em relação à safra anterior (AGOSTINI e VIEIRA, 2011).

Entre os estados brasileiros, o Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz, seguido dos Estados de Santa Catarina e Maranhão (Figura 2) (EMBRAPA, 2010).

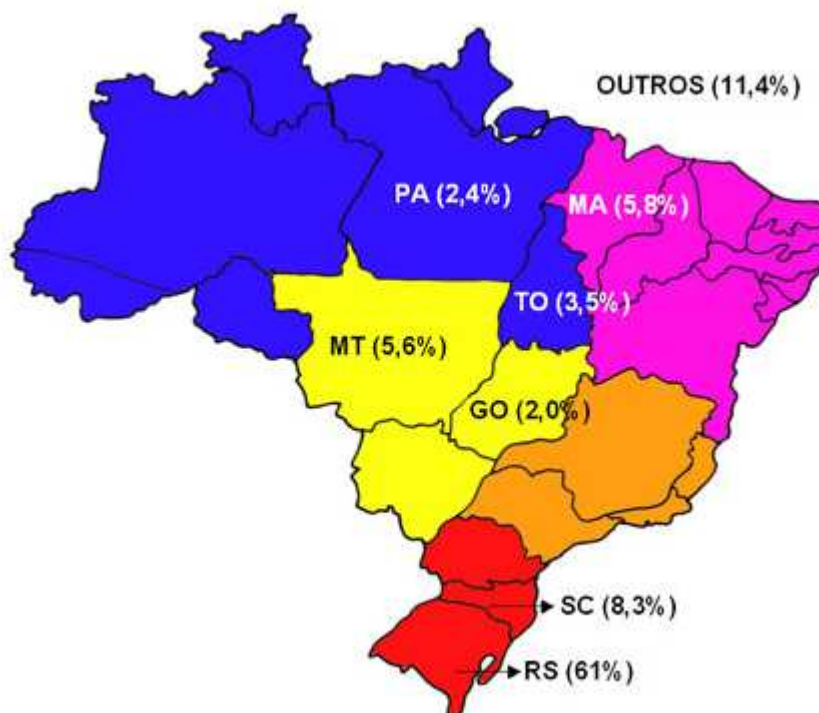


Figura 2: Participação (%) dos principais estados produtores de arroz do Brasil em 2008

Fonte: IBGE, (2008).

Para a produção do Rio Grande do Sul no ano de 2011, a Conab estimou um crescimento de 8,8 milhões de toneladas para 8,9 milhões de toneladas de arroz em casca colhidos. A produtividade média estimada para o estado ficou em 7.600 kg/ha. Cabe destacar que o Instituto Rio Grandense de Arroz - IRGA estima uma produção de 9,03 milhões de toneladas e uma produtividade média de 7.679 kg/ha. Com relação ao quadro de oferta e demanda de arroz (base casca) para o ano comercial 2011/12 (março de 2011 a fevereiro de 2012) houve pouca alteração em comparação ao levantamento anterior. As projeções de exportações de arroz permanecem em 1,3 milhão de toneladas (de março a julho de 2011 já foram exportadas 693,8 milhões de toneladas, mais de 53% da meta da Conab). As importações, por sua vez, continuam projetadas em 500 mil t (52,1% a menos do que em 2010/11, quando foram importadas mais de 1 milhão de t de arroz) (IRGA, 2011).

Mesmo tendo aumentado 7,5% no principal estado produtor (Rio Grande do Sul), a área de arroz no Brasil permaneceu praticamente estável na safra 2010/11 em relação à safra anterior, uma vez que, dentre os principais estados produtores, ela diminuiu em todos, a exceção do Rio Grande do Sul. A combinação de aumento da

produtividade e da área proporcionou ao estado gaúcho um aumento de sua produção em 27,6%, colhendo 66% de toda a produção brasileira que, sofreu um aumento de 18% em relação à safra anterior. A produção do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, somadas, representa 73,5% da produção do País, mas alcança apenas 47,5% da área. O cultivo nestes dois estados é feito quase que exclusivamente na forma irrigada, justificando a maior produtividade comparada ao sequeiro (AGOSTINI e VIEIRA, 2011). Fato que também requer cuidados com o manejo da cultura, visto que o risco de perdas por contaminação biológica ou química é elevado.

### 3.2 Contaminação de alimentos

#### 3.2.1 Contaminação fúngica de alimentos

Os alimentos, independente da sua origem, apresentam uma microbiota natural extremamente variável, concentrada principalmente na região superficial. Os fungos são os micro-organismos de maior destaque, pois podem se desenvolver em ambientes com distintas atividade de água e com nutrientes altamente complexos. Eles podem contaminar as matérias primas e alimentos nas diversas etapas de processamento e inclusive facilitar a contaminação por diversos outros micro-organismos que não fazem parte dessa microbiota natural (LEITÃO, 1988, citado por ATAYDE, 2009).

Fungos são micro-organismos aeróbios, altamente disseminados no meio ambiente, podendo ser encontrados no solo, na água e no ar. Todos os fungos são heterotróficos, precisando de compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono. Entre as suas vantagens sobre outros organismos está a capacidade de esporulação que confere resistência e disseminação rápida por diferentes meios (TORTORA, et al., 1993; TANIWAKI e SILVA, 1996).

Em relação ao ambiente onde vivem, os fungos foram divididos por Burgess et al. (1981), em fungos do solo, que habitam áreas subterrâneas, porções inferiores e fragmentos de vegetais e compostos orgânicos depositados no solo; fungos do ar, encontrados nas partes superiores das plantas; além dos fungos do solo e do ar que colonizam ambos os ambientes.

A disseminação facilitada, a multiplicação em amplas faixas de temperatura e a capacidade de degradar materiais orgânicos complexos, torna os fungos os principais agentes de deterioração de alimentos. Além disso, algumas espécies são toxigênicas

e produzem metabólitos secundários tóxicos, as micotoxinas. As micotoxinas são produzidas durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor. Em geral, esses metabólitos parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumuladas (USHA, et al., 1993; JAY, 2005).

Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários constituídos de pigmentos, antibióticos, fitotoxinas e micotoxinas. Quando produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, estes metabólitos tóxicos ingeridos pelo homem e animais, provocam as micotoxicoses (MOSS, 2002). A síntese de micotoxinas representa uma maneira de os fungos reduzirem a quantidade de precursores, os quais não são requeridos para o metabolismo ou em respostas a condições de estresse de outros competidores ambientais (JAY, 2005).

Os fungos toxigênicos podem contaminar os grãos no campo, antes mesmo da colheita ou durante o armazenamento, persistindo em alimentos e rações destinados ao consumo humano e de animais (RUPOLLO et al. 2006).

As espécies fúngicas toxigênicas associadas com mais freqüência a alimentos pertencem aos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Tabela 2). Enquanto as espécies de *Fusarium* são patógenas destrutivas das plantas produzindo micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita, as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são mais comumente encontradas como contaminantes de equipamentos e alimentos durante a secagem e posterior estocagem, embora algumas espécies de *Aspergillus* possam ser encontrados no solo e por conseqüência contaminar as porções externas de plantas que sofreram danos físicos (SWEENEY e DOBSON, 1998).

A FAO-WHO ("Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization") estima que, em todo o mundo, cerca de 25% das colheitas de alimentos estão afectadas por micotoxinas (FAO, 2004). No entanto, as atuais variações nas condições climáticas permitem estimar percentuais menores para este risco.

Tabela 2: Principais espécies de fungos toxigênicos e suas micotoxinas

<b>Espécie Fúngica</b>	<b>Micotoxinas</b>
<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas
<i>A. flavus</i>	Ácido Ciclopiazônico
<i>A. ochraceus</i> ; <i>Penicillium viridicatum</i> ; <i>P. cyclopium</i>	Ocratoxina A
<i>P. expansum</i>	Patulina
<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Desoxinivalenol
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. poae</i>	Toxina T <sub>2</sub>
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. poae</i>	Diacetoxiscirpenol
<i>F. culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Zearalenona
<i>F. moniliforme</i>	Fumonisina

Fonte: Adaptado de D'MELLO e MACDONALD, 1997.

### 3.2.2 Micotoxinas

Há muitos séculos se conhece a toxicidade de certos fungos macroscópicos, entretanto, somente no ano de 1850, foi relacionada esta possibilidade a fungos microscópicos, quando a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* com as características clínicas do ergotismo, foi relacionado com uma doença humana conhecida desde a idade média como “fogo de Santo Antonio”. A identificação das propriedades hepatotóxicas e hepatocarcinogênicas de algumas linhagens de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, no início da década de 1960, seguida pela elucidação da estrutura de seus metabólitos tóxicos, as aflatoxinas, deu novo enfoque e prioridade para a pesquisa sobre micotoxinas, tornando-as foco de cuidados para evitar danos a saúde de humanos e animais de criação visto seus efeitos agudos e crônicos (LAZZARI, 1997; SANTURIO, 2000).

Algumas micotoxinas possuem capacidade mutagênica e carcinogênica, enquanto outras apresentam toxicidade a um órgão alvo ou são tóxicas por outros mecanismos bioquímicos mais específicos. Mesmo que a verdadeira toxicidade de muitas micotoxinas ainda não tenha sido demonstrada para humanos, o efeito desses compostos em animais de laboratório e em ensaio *in vitro* deixa poucas dúvidas a respeito de sua toxicidade potencial. Ao menos 14 micotoxinas são demonstradas como carcinogênicas e, como regra, aceita-se que 93% dos compostos mutagênicos também são carcinogênicos (STARK, 1980; KIESSLING, 1986).

A contaminação de alimentos por micotoxinas é questão de saúde pública no mundo todo, pois além de oferecer risco a humanos através da ingestão de alimentos contaminados, ainda representa perdas significativas no agronegócio, pois afeta diretamente o comércio de grãos e cereais destinados a alimentação humana e animal. Indiretamente representa danos a saúde com conseqüentes impactos no sistema produtivo e de saúde (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

A entrada das micotoxinas na cadeia alimentar humana pode ocorrer de forma direta ou indireta. A forma direta é caracterizada pelo consumo dos cereais, oleaginosas e derivados contaminados e a forma indireta ocorre quando animais se alimentam com rações previamente contaminadas, podendo excretar micotoxinas no leite, carne e ovos, e conseqüentemente constituir-se fonte de contaminação para humanos (MAZIERO e BERSOT, 2010).

A ingestão de alimentos contaminados com níveis suficientes de micotoxinas pode levar a um quadro clínico grave denominado micotoxicose. As micotoxicoses são enfermidades caracterizadas pela alteração patológica e/ou funcional no organismo, animal ou humano, causada pelas micotoxinas. Os quadros tóxicos variam de acordo com a micotoxina, seu efeito dose-dependente, espécie animal e até mesmo alimentação, não é contagiosa, nem infecciosa e é sempre causada pelas toxinas produzidas por fungos (SANTURIO, 2000; HUSSEIN e BRASEL, 2001).

A Tabela 3 apresenta as principais micotoxinas, fungos produtores, produtos onde podem ocorrer e os efeitos biológicos ao homem e a animais.



Tabela 3: Micotoxinas, seus principais fungos produtores, material contaminado e efeitos biológicos no homem e animais.

Micotoxinas	Fungos produtores	Material contaminado	Efeitos Biológicos	
			Animais	Humanos
Aflatoxina (B1, B2, G1, G2 e M1)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Amendoim, pistachio, milho amêndoa, leite e seus derivados	Hepatotoxicidade, Hepatocarcinoma e hemorragia	Hepatocarcinôgenos e, cirrose em crianças, síndrome de Reye, degeneração da gordura de vísceras
Ocratoxina A	<i>Aspergillus alutaceus</i> <i>Penicillium Verrucosum</i>	Grãos de café, arroz, cevada, produto animal (rins, carne)	Nefrotóxicidade e Hepatotoxicidade	Nefropatia de Balkan, tumor renal
Patulina	<i>Penicillium Expansum</i>	Maçã, suco de maçã	Hepatotóxico, afeta rins, baço e cérebro	Provável ação carcinogênica, mutagênica, teratogênica e fetotóxica
Tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2)	<i>Fusarium Graminearum</i>	Trigo, cevada, arroz, sorgo	Vômito, diarreia, perda de peso, descamação da pele e hemorragia,	ATA (aleucia tóxica alimentar)
Zearalenona	<i>Fusarium Graminearum</i>	Milho, sorgo, Trigo	estrogenismo, infertilidade LEME	Câncer cervical
Fumonisinias (B1, B2 e B3)	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium Proliferatum</i>	Milho e seus Derivados	(leucoencefalomalácia eqüina), edema pulmonar em suínos	Câncer de esôfago
Alcalóides do Ergot	<i>Claviceps Purpúrea</i>	Centeio, milho, Grama	Gangrena nas extremidades, convulsões	Ergotismo (gangrena nos membros)

Fonte: Adaptado de GONÇALEZ *et. al*, 2001.

O isolamento de fungos toxigênicos a partir de grãos, estocados em condições recomendadas, não significa obrigatoriamente risco de contaminação imediata com micotoxinas, mas provavelmente ocorra perda de valor nutricional e propriedades tecnológicas. No entanto, a ausência de fungos toxigênicos, não significa ausência de micotoxinas, ou seja, o fungo pode estar ausente, mas a toxina pode estar presente e

ativa, visto que o micro-organismo em determinados níveis pode ser eliminado, mas as estruturas químicas são estáveis mesmo sob condições drásticas (PITT e HOCKING, 1997; OSBORNE, 1982).

### 3.2.3 Contaminação micotoxicológica do arroz

Grãos sofrem alterações na qualidade desde o estágio de maturação no campo, até o momento de consumo. As alterações na qualidade de grãos ocorridas no início da cadeia produtiva manifestam-se no produto final, afetando as características sensoriais e segurança de todos os alimentos que têm esta matéria-prima como ingrediente (SWEENEY e DOBSON, 1998). Dentre as causas de alteração da qualidade está a contaminação fúngica (LAZZARI, 1997).

A produtividade da cultura do arroz pode ser afetada por diversos fatores, sendo que as doenças fúngicas são responsáveis por danos variáveis entre 20 e 50% na produtividade das lavouras de arroz no Rio Grande do Sul (BALARDIN e BORIN, 2001).

As variações da temperatura do ar e da radiação solar, durante as fases críticas da planta, são os principais elementos climáticos relacionados com a variabilidade dos níveis de produtividade, além de propiciarem a incidência de micro-organismos nas fases de pré e pós-colheita. As espécies que podem predominar quando a umidade do arroz é elevada (maior que 20-22%) e a temperatura baixa (10-18°C), são as pertencentes ao gênero *Fusarium*. No entanto, quando a temperatura é mais elevada (acima de 20°C), as espécies predominantes geralmente pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que podem se desenvolver no arroz com umidades acima de 15% e 18-20%, respectivamente, para o arroz polido e para o parboilizado (FURLONG, et al. 2003; HACKBART, et al., 2011; HEIDTMANN-BEMVENUTTI, et al., 2012a).

As micotoxicoses mais importantes associadas ao arroz têm sido referidas como “toxicoses do arroz amarelo” e estão associadas a várias doenças, tais como as renais (degenerativas), circulatórias (Beribéri cardíaco), hepáticas (cirrose, hepatoma) e nervosas, além de levar à teratogênese e carcinogênese (quando exposição às toxinas por longo período) (SCUSSEL, et al., 2010).

As micotoxinas que podem ser encontradas no arroz no campo, durante sua colheita e na armazenagem, são as produzidas principalmente por fungos do gênero *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo que, destas as mais importantes são a

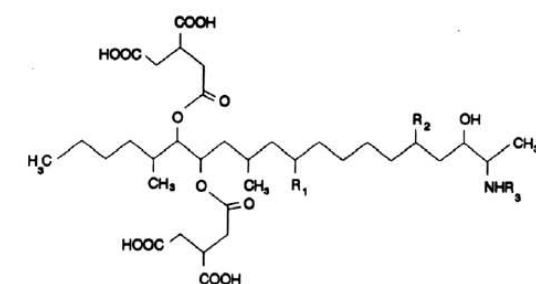
citrinina, citreoviridina e luteoskirina. Outras toxinas também já foram relatadas no arroz tais como a ocratoxina A (OTA) (HACKBART, et al., 2011; NUNES, et al., 2003, DORS, et al., 2011), aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) (BANDARA, et al., 1991; DORS, et al., 2011; NUNES, et al., 2003), zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) (HEIDTMANN-BEMVENUTTI, et al., 2012a, DORS, et al., 2011, NUNES, et al., 2003), porém, poucos estudos relatam contaminação por FB<sub>1</sub>, micotoxina esta proveniente do *Fusarium*, através de contaminação no campo, tão pouco em amostras de arroz após sofrer tratamento térmico (cocção) para posterior ingestão humana.

### 3.2.4 Fumonisinias

As fumonisinias foram primeiramente isoladas de culturas de *F. moniliforme*, entretanto outras espécies de *Fusarium spp* já foram identificadas como produtoras desta micotoxina (DIAZ; BOERMANS, 1994). As espécies produtoras de fumonisinias incluem *F. anthropilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. nygami*, *F. moniforme* e *F. proliferatum*. As últimas são produtoras de grandes quantidades de fumonisinias, embora o *F. moniliforme* tenha sido a primeira espécie associada com essas micotoxinas. Esta espécie, pela sua frequência de ocorrência, é a mais estudada dentre as produtoras de fumonisinias (NELSON, et al. 1992). Como no caso dos demais fungos toxigênicos os fatores ambientais no campo, durante o transporte e armazenamento afetam a multiplicação e a produção de um ou mais tipos de fumonisinias (GAMANYA, 2001).

Dezoito diferentes tipos de fumonisinias já foram isolados e identificados diferindo quanto aos grupos hidroxil (Figura 3), porém a forma molecular predominante e mais tóxica produzida pelo *Fusarium moniliforme* é a fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) a mais tóxica (SEO; LEE, 1999).

A estrutura básica, bem como seus substituintes, não conferem às fumonisinias a capacidade de interação com a radiação eletromagnética absorvendo ou fluorescendo sem prévia derivação para quantificação por estas técnicas. A FB<sub>1</sub> e a FB<sub>2</sub> apresentam uma fluorescência verde amarelada após sua derivação (DIAZ e BOERMANS, 1994; SHEPARD, 1998).



Fumonisina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
B <sub>1</sub>	OH	OH	H
B <sub>2</sub>	H	OH	H
B <sub>3</sub>	OH	H	H
B <sub>4</sub>	H	H	H
A <sub>1</sub>	OH	OH	CH <sub>2</sub> CO
A <sub>2</sub>	H	OH	CH <sub>2</sub> CO

Figura 3: Estrutura química das principais fumonisinas.

Fonte: DIAZ e BOERMANS (1994).

A estrutura química da FB<sub>1</sub> (Figura 4), um diéster de ácido tricarbálico e álcool polihidrico, é a mais tóxica micotoxina dentre as demais, que não apresentam estruturas cíclicas ou anéis de difícil metabolização e expressão pelo organismo contaminado. Todas as fumonisinas são estáveis ao calor como muitas outras micotoxinas, mas quanto à polaridade são solúveis em água e acetonitrila e insolúveis em solventes orgânicos (POZZI et al., 2002; ALBERTS, et al. 1990).

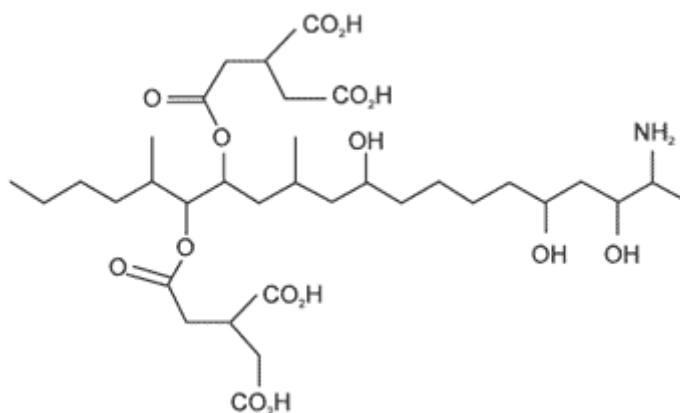


Figura 4: Estrutura química da Fumonisina B<sub>1</sub>

Fonte: SMITH e SEDDON (2007).

O primeiro relato sobre a ocorrência de fumonisinas em alimentação animal no Brasil foi feita por Sydenhan, et al. (1992), onde, de 22 amostras de ração associadas a surtos confirmados de micotoxicoses em diversas espécies animais, como cavalos, porcos, coelhos e frangos, de fazendas do Estado do Paraná, 20 foram positivas para a presença de FB<sub>1</sub>, na concentração de 0,2 – 38,5 µg/g e 18 foram positivas para a presença de FB<sub>2</sub>, na concentração de 0,1 – 12 µg/g.

A ocorrência de fumonisinas em alimentos, tem sido relacionada à doenças fatais em animais e possível relação com doenças em humanos. Seu efeito tóxico mais importante é o câncer de esôfago que tem sido relacionado a casos ocorridos em humanos em regiões onde há grande consumo de milho e derivados, como a África do Sul e China (RHEEDER, et al., 1992; NORRED e VOSS, 1994). Em ratos contaminados foram observados casos de câncer hepático (CETIN e BULLERMAN, 2005). Em eqüinos a FB<sub>1</sub> é responsável pela ocorrência de leucoencefalomalácia (LEM), uma síndrome que atinge o sistema nervoso central dos cavalos e que leva à liquefação da substância branca do cérebro (KIM, et al., 2003). Em suínos a ingestão de FB<sub>1</sub> pode causar edema pulmonar e hidrotórax (DILKIN, et al., 2003). Além disso, estudos têm demonstrado que a exposição à FB<sub>1</sub> resulta em nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em todas as espécies animais estudadas (ratos, camundongos, coelhos, eqüinos, suínos e macacos), aliadas à hipercolesterolemia em determinadas espécies (suínos e macacos), incluindo alguns primatas (LINO, et al., 2004).

Em todas as espécies animais estudadas observou-se que a absorção das fumonisinas no tubo digestivo ocorre de forma diminuta, sendo rapidamente eliminadas. Assim a maior parte das fumonisinas são retidas pelo fígado e o rim (FAO/WHO, 2001; WILLIAMS, et al., 2003). O modo de ação destas micotoxinas está relacionado com a sua interferência com o metabolismo da esfingosina – esfinganina (So/Sa), prejudicando assim o metabolismo dos esfingolipídeos, responsáveis pela regulação celular e controle de proteínas membranares, regulando o crescimento, diferenciação e morte das células (CIRILLO, et al., 2003; TURNER, et al., 1999).

A avaliação do grau de exposição de populações às fumonisinas é realizada de duas formas. A primeira consiste na avaliação dos níveis de FB<sub>1</sub> ou de biomarcadores adequados, como a proporção esfinganina/esfingosina (So/Sa), nos fluídos biológicos, como urina e soro, e tecidos. Apesar de oferecerem resultados exatos da exposição do indivíduo a esta micotoxina, esta é uma área em que o Brasil não tem investido, quando comparado com outros continentes como europeu (PIÑERO, et al., 1997) e asiático (CHU e LI, 1994; SHEPARD, et al., 2000).

A outra forma de avaliar esta exposição consiste em calcular a respectiva digestão diária admissível (DDA), através dos níveis de fumonisinas ingeridos na alimentação. Para este dado, foram propostos valores de 800 ng/kg peso corporal para a FB<sub>1</sub>. A OMS (WHO, 2002) considera que a ingestão diária máxima tolerável provisória (PMTDI) para humanos é de 2 µg.kg p.c./dia para a FB<sub>1</sub>. A União Europeia (2005) também regulamentou valores de 2 µg.kg p.c./dia para a FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> em combinação ou separadas. De acordo com esta recomendação, uma criança com peso corporal de 20 kg não deverá exceder uma dose diária de 40 µg de FB<sub>1</sub> (MOLINIÉ, et al., 2005).

As fumonisinas têm sido as micotoxinas mais estudadas nos últimos anos devido sua recente descoberta, em 1988. Porém o número de estudos envolvendo amostras de arroz e seus derivados ainda são escassos se comparados com outros cereais como milho (KASHIMIRA E SOARES, 2006; BERND, et al., 2011).

### 3.2.5 Legislação

Até o momento, não existe uma legislação vigente para regulamentar os níveis de contaminação por FB<sub>1</sub> e outras fumonisinas em amostras de arroz, porém, vários países apresentam regulamentação própria ou níveis máximos para estas micotoxinas em outros produtos de origem cereal que podem incluir os derivados de arroz.

De acordo com a Resolução nº 7 da ANVISA (2011), no Brasil os níveis tolerados de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> estão sendo implantados para milho e derivados, destinados a alimentação humana, e até 2016 vários alimentos serão regulamentados quanto a este contaminante (Tabela 4).

Tabela 4: Limites Máximos Toleráveis para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em alimentos, segundo RDC ANVISA, 2011.

<b>Alimento</b>	<b>LMT* (µg.kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>2011</b>	
Milho de pipoca	2000
Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
<b>2012</b>	
Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000
<b>2014</b>	
Milho em grão para posterior processamento	5000
<b>2016</b>	
Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
Amido de milho e outros produtos à base de milho	1000

\*LMT: Limite Máximo Tolerável

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2011.

De acordo com dados do Jornal Oficial da União Européia (2005), que regulamenta os níveis máximos toleráveis de toxinas do *Fusarium* em alimentos, foram estipulados níveis de 2000 µg.kg<sup>-1</sup> para amostras de milho não transformado e 1000 µg.kg<sup>-1</sup> para sêmola de milho e farinha de milho. Para outros alimentos a base de milho para consumo humano direto e alimentos destinados a alimentação infantil (lactentes, bebês e crianças jovens) os limites máximos toleráveis são de 400 e 200 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Com relação à contaminação de arroz por outras micotoxinas, a ANVISA recomenda limites máximos toleráveis de 5, 10 e 750 µg.kg<sup>-1</sup> para Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, OTA e DON, respectivamente. A União Européia estabelece, para este alimento, níveis máximos de 2 µg.kg<sup>-1</sup> para AFB<sub>1</sub> e 4 µg.kg<sup>-1</sup> para aflatoxinas totais, 1250 µg.kg<sup>-1</sup> para DON e 100 µg.kg<sup>-1</sup> para ZEA (ANVISA, 2011; JORNAL, 2005). Cabe salientar que, a ausência de uma legislação específica para determinados contaminantes pode resultar da falta de dados de ocorrência ou de metodologias confiáveis, entre outros aspectos.

O desenvolvimento de uma legislação uniforme, a nível mundial, para a contaminação dos alimentos por micotoxinas já vêm sendo discutido em eventos deste

porte. Os principais objetivos serão a identificação das nações que seriam sujeitas a um maior impacto, caso se estabelecesse legislação mais rígida, e a avaliação dos benefícios para a saúde humana, bem como os prejuízos a nível econômico, caso se optasse por tal (WU, 2004).

Tendo em vista o alto nível de produção de arroz no Brasil, a preocupação com a contaminação deste alimento por fumonisinas associado ao fato com doenças tanto em animais quanto em humanos, bem como os baixos níveis toleráveis para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> destinados a alimentação humana, principalmente infantil, o estudo de ocorrência e análise de alimentos de diferentes origens, como o arroz, vem acrescentar futuras legislações, que englobem um maior número de toxinas e alimentos possivelmente contaminados, além de possibilitar as providências necessárias para diminuir os riscos e danos.

### 3.2.6 Métodos para detecção de FB<sub>1</sub> em alimentos

O desenvolvimento de técnicas analíticas para detecção e quantificação de FB<sub>1</sub> em alimentos é imprescindível, devido sua importância quando relacionadas a perdas econômicas e segurança alimentar. Estes métodos, além de serem eficientes, devem ser viáveis, visto que, a contaminação deve ser monitorada desde a matéria prima até o produto final, incluindo o preparo doméstico. As etapas envolvidas neste processo são: extração, detecção, quantificação e confirmação (LINO, et al., 2006; SHEPARD, et al., 1998).

O preparo da amostra para detecção e quantificação de FB<sub>1</sub> consiste na extração da micotoxina e purificação seguida de secagem do extrato. A FB<sub>1</sub> é um composto fortemente polar, e por isso são utilizadas misturas de solventes polares como metanol-água (FANDOHAN, et al., 2005), acetonitrila-água (MOLLER, et al., 2000) ou acetonitrila-metanol-água (VISCANTI, et al., 2001). Após a extração com solventes prossegue a etapa de limpeza, ou *clean up*, que é realizada através de partição líquido-líquido, utilizando n-hexano como solvente para retirada de possíveis interferentes (DESMACHELIER, et al., 2010) ou pela utilização de colunas de fase sólida ou fase reversa (C<sub>18</sub>) (MALMANN, et al., 2001), imunoafinidade (FANDOHANA, et al., 2005) e troca aniônica (BERND, 2010). A seleção do procedimento de purificação dos extratos das amostras depende do limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) que se pretende atingir (LINO, et al., 2006). A última etapa do preparo da amostra consiste na redução do volume por evaporação do solvente em



rotaevaporadores sob pressão reduzida ou banho aquecido com fluxo de nitrogênio (MACHINSKI JUNIOR, 2000).

Os métodos cromatográficos são as técnicas mais utilizadas para detecção e quantificação de fumonisinas. As primeiras metodologias analíticas foram realizadas com cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas GC-FID (SYNDENHAM, 1990). Também foram reportadas análises utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), para detecção, quantificação e confirmação (JACKSON, BENNET, 1990). A cromatografia de camada delgada (CCD) foi utilizada por vários autores, porém os limites de detecção obtidos apresentaram valores muito altos, sendo aplicados somente para amostras de milho contaminadas (CAWOOD, et al., 1991; SYDENHAM, et al., 1990; SHEPARD, 1998).

Como as fumonisinas são solúveis em solventes polares, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica mais utilizada para esta análise além de ser oficialmente aceita pela "Association of Official Analytical Chemistry" para análises de FB<sub>1</sub> em alimentos (AOAC 995.15). A detecção através da fluorescência (FL) é amplamente utilizada, podendo ser utilizado um detector de massas para confirmação (PARK, et al., 2005, BERND, 2010).

A fase estacionária da etapa cromatográfica de uma determinação é selecionada conforme as propriedades físico-químicas do analito em estudo e conseqüentemente, baseado no mecanismo de separação. A diponibilização de fases menos polares como C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> representaram um avanço para a determinação de compostos polares como as fumonisinas porque diminui os riscos de interação irreversível do analito com os grupos silanois das fases de sílica convencional (SILVA, et al., 2003; TONHI, et al., 2002).

Em HPLC a eluição das fumonisinas ocorre através da utilização de fase móvel constituída de misturas de solventes polares (metanol, água, acetonitrila e solução de fosfato de sódio), sendo necessário a acidificação do meio através da adição de ácido acético ou fórmico à fase móvel (PLATTNER, 1999). Porém, a FB<sub>1</sub> não apresenta cromóforos interativos na região do espectro visível ou ultravioleta, sendo necessário proceder a derivatização no grupamento amina primário da molécula, para torná-la fluorescente (SYNDENHAM, et al., 1990).

Vários reagentes foram utilizados para derivatização de FB<sub>1</sub>, porém o o-ftaldialdeído (OPA) juntamente com o 2-mercaptoetanol (MCE) é o que produz melhores resultados, apresentando alto teor de fluorescência e separação dos compostos formados na derivatização. O OPA reage com a amina primária da

fumonisina sob condições alcalinas (pH 9,0 – 10,0) na presença de MCE à temperatura ambiente em tampão borato (MYHARA, et al., 1996). A desvantagem desta derivatização é a instabilidade do composto fluorescente e formação de interferentes que apresentam fluorescência oriundos da reação com os componentes da matriz (LINO, et al., 2006; SHEPARD, 1998).

Além dos métodos cromatográficos, também são utilizados os métodos imunoenzimáticos, representando uma alternativa promissora para o setor produtivo, por apresentarem alta sensibilidade, reprodutibilidade e sensibilidade, permitindo análises rápidas e viáveis no controle de qualidade desde o campo até a indústria, porém os riscos de falsos positivos e validade restrita dos *kits* comerciais são um desafio para a confiabilidade da técnica (ONO, et al., 2000).

As escolhas das melhores condições de metodologia devem ser realizadas levando-se em consideração diversos fatores como caracterização da matéria prima, características do analito e condições laboratoriais para desenvolvimento do método. A fim de garantir um novo método analítico que gere informações confiáveis e reprodutíveis este deve ser validado. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica, através da padronização das condições instrumentais, e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência entre laboratórios. Através de estudos experimentais, deve-se garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados através da estimativa dos seguintes indicativos: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão adequados à análise. Estes indicativos devem ser avaliados tanto no instrumento quanto no método que será utilizado (BRASIL, 2003; BRITO, et al., 2003; RIBANI, et al., 2004).

### 3.2.7 Efeito do tratamento térmico na redução de FB<sub>1</sub> em alimentos

As fumonisinas são termicamente estáveis no entanto, temperaturas superiores a 150 °C tem se mostrado capazes de diminuir os níveis destas toxinas das matrizes contaminadas, mas sempre em função da relação tempo - temperatura (SORIANO e DRAGACCI, 2004). Estes processos térmicos apesar de diminuir os níveis da forma química original podem resultar na conversão de fumonisinas intactas em fumonisinas hidrolisadas (POLLING e PLATTNER, 1999) que são mais citotóxicas que as FB<sub>1</sub> (SEEFELDER et al., 2003).

Dentre os processos envolvendo tempo e temperatura estudados para eliminação de FB<sub>1</sub> de alimentos estão: cozimento, fritura, extrusão, forneamento, forneamento com fermentação química (alcalina), processo de esterilização de amostras em conservas (enlatamento), fabricação de tortilha, entre outros (BULLERMAN e BIANCHINI, 2010).

Em um dos primeiros estudos sobre estabilidade das fumonisinas Alberts et al., (1990), verificaram que, a fervura do material da cultura de *Fusarium verticillioides* por 30 minutos não reduziu a concentração de FB<sub>1</sub>, sugerindo que a presença de água poderia ter conferido estabilidade a estrutura química da micotoxina. No entanto, em uma versão mais recente do estudo, pode ser observada uma redução moderada nos níveis de fumonisina, em condições semelhantes, especificamente, a preparação de mingau de milho na África do Sul, usando uma receita tradicional (farinha de milho salgada fervente por 20 min em água) que resultou em uma redução de 23% em sua concentração, o que correlata com a anterior, pois a gelatinização do amido diminui a disponibilidade de água (SHEPARD, et al., 2002).

Outro processo importante para a diminuição dos níveis de fumonisinas é o cozimento alcalino. Usado para produzir *snacks* e tortillas, consiste em cozinhar o milho primeiramente em água alcalina, por um curto período de tempo e então efetuar maceração durante a noite. Em condições alcalinas, as fumonisinas em milho contaminado são convertidos para as chamados fumonisinas hidrolisadas (HFB<sub>x</sub>), metade de uma amino-pentol (AP<sub>x</sub>), formada pela remoção hidroliticamente de duas cadeias laterais de ácidos tricarbálico do carbono 20 da “espinha dorsal” da fumonisina (Fig. 5, reação A) (HUMPF e VOSS 2004).

Os teores de redução da contaminação por fumonisinas a partir de aplicação do tratamento térmico, no entanto são variáveis e influenciados por condições de cozimento, como temperatura, tempo, teor de água, teor de açúcar e pH. Teoricamente, a perda de fumonisinas durante o processamento pode indicar que elas são extraídas ou de outra forma removidas dos produtos, destruídas, modificadas para formar uma nova fumonisina (Figura 5), tornam-se ligadas a componentes da matriz ou caso contrário tornam-se menos extratáveis (HUMPF e VOSS, 2004).

Não estão disponíveis informações sobre a degradação de fumonisinas em outros cereais de amplo consumo como o arroz e o trigo.

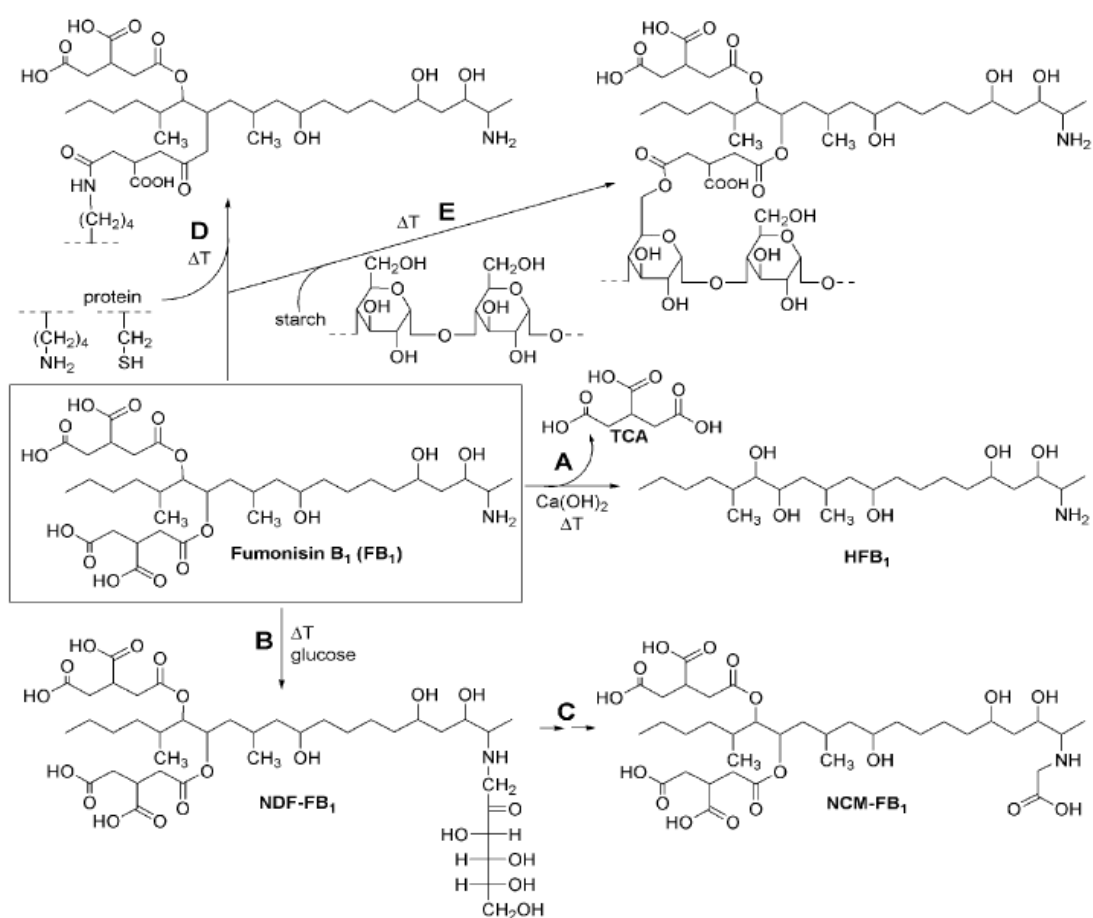


Figura 5: Estrutura dos produtos de degradação da FB<sub>1</sub> formados sob condições de tratamento térmico.

Fonte : HUMPF e VOSS (2004)

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Solventes e reagentes

Os reagentes e solventes utilizados foram

Acetonitrila grau HPLC (Baker®)

Ácido acético glacial P.A. (Merck)

Acido clorídrico P.A. (Vetec)

Ácido sulfúrico P.A. (Isotar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda.)

Ácido tricloroacético P.A. (Vetec)

Água Ultra-Pura MilliQ

Borato de sódio P.A. (LabSynth®)

Cloreto de sódio P.A. (Vetec)

Coluna C<sub>18</sub> (3 mL / 500 mg) (Chromabond®)

Éter de petróleo P.A (LabSynth®)

Fenoltaleína P.A. (LabSynth®)

Hexano P.A. (LabSynth®)

Hidróxido de sódio P.A. (Vetec)

Mercaptoetanol (Merck®)

Metanol grau HPLC (Baker®)

Nitrogênio comprimido (White Martins®)

o-phtaldialdeído (Merck®)

Padrão de Fumonisina B<sub>1</sub> (Sigma®)

Pancreatina (Sigma®)

Pepsina (Sigma®)

Peróxido de hidrogênio P.A. (LabSynth®)

Placas para cromatografia em camada delgada sílica gel 60 HPTLC (Merck) (superfície específica ~500 m<sup>2</sup>/g, diâmetro médio dos poros de 60 Å, volume específico dos poros de 0,75 mL/g, partículas de 5-17 mm e 0,25 mm de espessura)

Reagente de Folin 2N (Proton Química)

Selênio metálico P.A. (Carlo Erba do Brasil Ltda.)

Sulfato de magnésio P.A. (LabSynth®)

Sulfato de potássio P.A. (LabSynth®)

#### 4.1.1 Padrão de Fumonisina B<sub>1</sub>

Os padrões de Fumonisina B<sub>1</sub> foram adquiridos da Sigma Aldrich Brasil. As soluções padrões utilizadas foram preparadas a partir da diluição de aproximadamente 1 mg (massa original contida no frasco do padrão) de FB<sub>1</sub> em 50 mL de solução metanol:acetonitrila (1:1). A solução estoque foi dividida em 5 frascos âmbar previamente higienizados através de lavagem com detergente e água corrente e posterior enxágüe com água destilada e metanol. As soluções foram secas por evaporação do solvente sob N<sub>2</sub> a 40°C restando em cada frasco aproximadamente 200 µg de FB<sub>1</sub> que foram armazenados sob refrigeração (aproximadamente 4°C) e devidamente identificados para posterior ressuspensão e uso como solução de trabalho para fins analíticos.

A estimativa da concentração da solução de trabalho foi realizado com base na massa inicial do padrão considerando as diluições realizadas para o seu preparo.

#### 4.2 Equipamentos

Agitador de Tubos Phenix – AP56

Balança analítica BioPrecisa Eletronic Balance - FA2104N

Banho Ultrasônico Unique - Ultra Cleaner 1600

Bloco digestor Oxylab

Centrífuga Cientec – CT-5000R

Coluna de adsorção C-18 Kromasil (5µm, 150 x 4,6 mm) Supelco

Concentrador Tecnal – TE-019

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) composto por bomba LC-AT, degaseificador DGU, controlador CBM-20A, detector SPD-20A, injetor manual 7725i com injetor de 20 µL, detector FL-10AXL

Destilador Tecnal – TE-036/1

Digestor Gerhardt Kjeldatherm

Espectrofotômetro Varian® - Cary 100 Conc

Estufa de secagem com circulação de ar Quimis® - Q314M222

Extrator de Soxhlet Quimis® - Q308-26B

Lâmpada ultravioleta de alta intensidade. Mineral Light – UVGL58 (254-366 nm)

Mesa Agitadora Orbital Tecnal – TE-141 (sem T°C) Marconi – MA410 (com T°C)

Mufla Quimis® – D24

Peneiras - Bertel Indústria Metalúrgica Ltda.

pHmetro Quimis® – Hanna Instruments pH200

Software LC Solution - Shimadzu

#### 4.3 Amostras

##### 4.3.1 Área de estudo e abrangência

A coleta das amostras foi realizada no mês de agosto de 2011, no comércio local da cidade de Rio Grande, localizada na região sul do Rio Grande do Sul.

A unidade amostral foi constituída por embalagens originais fechadas contendo, no mínimo 500 g de amostra, tomando-se 10% do volume total do produto disponível para venda, para comporem a amostra bruta (IAL, 1985). Cada unidade amostral era proveniente de um lote de fabricação, conforme indicado no rótulo do produto, evitando-se a coleta de lotes repetidos. As marcas foram escolhidas considerando a disponibilidade de lotes (pesquisa realizada durante um mês nos maiores supermercados da cidade) e o valor comercial do produto, sendo escolhidas marcas de alto, médio e baixo preço.

Foram coletados três diferentes tipos de arroz, classificados, de acordo com IN da ANVISA (2009) como: arroz branco (grupo beneficiado, subgrupo polido, classe longo, Tipo I), arroz parboilizado (grupo beneficiado, subgrupo parboilizado polido, classe longo, Tipo I) e arroz integral (grupo beneficiado, subgrupo integral, classe longo, Tipo I). Para representação dos diferentes tipos, foram adquiridas 9 amostras de quatro diferentes marcas, sendo que três delas compunham amostragem dos três tipos (arroz branco, parboilizado e integral) e uma marca correspondia à uma amostra de arroz integral (devido a ausência de arroz integral da marca B). As amostras foram acondicionadas a temperatura ambiente no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande.

As amostras foram devidamente identificadas e codificadas: Arroz branco (amostras 01, 02 e 03) arroz parboilizado (amostras 04, 05 e 06) e arroz integral (amostras 07, 08 e 09), conforme é apresentado na Tabela 5:

Tabela 5: Constituição da unidade amostral e identificação das amostras.

Arroz	Marca	Quantidade (g)	Identificação
Branco	Marca A	3000	01
Branco	Marca B	3000	02
Branco	Marca C	3000	03
Parboilizado	Marca A	3000	04
Parboilizado	Marca B	3000	05
Parboilizado	Marca C	3000	06
Integral	Marca A	2000	07
Integral	Marca D	3000	08
Integral	Marca C	3000	09

#### 4.3.2 Preparo da amostra

Após identificação, as amostras foram homogeneizadas, através da mistura dos lotes para cada tipo de arroz, e submetidas a quarteamento manual. Para tanto, foram colocadas sobre superfície plana e homogeneizada até formação de um quadrado, este foi dividido em quatro quadrados menores ABCD, conforme a Figura 56. Os quadrados C e B foram rejeitados, enquanto os quadrados A e D foram misturados e novamente espalhados formando um novo quadrado EFGH, os quadrados E e H foram então desprezados, misturando-se o F e G, repetindo-se o procedimento até obtenção de aproximadamente 200 g de amostra, divididas em 2 alíquotas de 100 g, sendo uma destinada a moagem e a outra mantida em sua forma *in natura* para posterior aplicação de tratamento térmico (IAL, 1985).

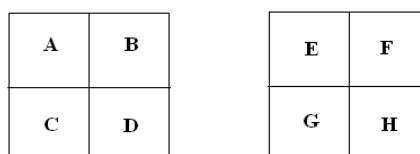


Figura 6: Procedimento para quarteamento de amostra sólida.

As amostras quarteadas foram acondicionadas em recipientes plásticos e distintamente identificadas como: amostras moídas (numeração + **M**) e inteiras (numeração + **I**), sendo que as inteiras foram mantidas em seu estado original, para posteriores experimentos, e as amostras identificadas como moídas (**M**) submetidas à moagem em moinho de facas e peneiradas em peneiras de 35 mesh.



Após preparo, acondicionamento e identificação, as amostras foram armazenadas sob temperatura ambiente (25°C) em armário arejado, sob proteção de luz e calor.

#### 4.4 Padronização da determinação de fumonisina B<sub>1</sub>

##### 4.4.1 Confirmação da fluorescência de FB<sub>1</sub>:OPA-MCE por HPTLC

A fim de confirmar a eficácia do reagente de derivatização e fluorescência da FB<sub>1</sub> foi realizada eluição da micotoxina em placas para cromatografia em camada delgada sílica gel 60 HPTLC (Merck®).

Para tanto foram utilizados padrões com concentração de 10 e 20 µg.mL<sup>-1</sup>, fase móvel composta por metanol:água (MetOH:H<sub>2</sub>O, 3:1, v:v) e reagente derivatizante OPA-MCE (LINO, et al., 2006). Foram utilizadas micro seringas, efetuando-se aplicação de 1 e 2 µg de FB<sub>1</sub> na placa, com uma margem de 1 cm de distância da borda inferior e 1 cm entre os pontos de aplicação de padrões nas placas. As cubas cromatográficas foram previamente saturadas e conservadas fechadas para diminuir a variabilidade do fator de retardamento (Rf).

As placas foram eluídas em cuba de vidro com a mistura dos solventes MetOH:H<sub>2</sub>O (3:1, v:v). Após a eluição e secagem os cromatogramas foram visualizados através de pulverização das placas com solução derivatizante OPA-MCE e exposição a luz ultravioleta de ondas curtas e longas (254 e 366 nm).

#### 4.5 Estabelecimento das condições cromatográficas

##### 4.5.1 Condições para determinação por HPLC-FL

A Fumonisina B<sub>1</sub> foi determinada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) composto por bomba LC-10 AT, degaseificador DGU, controlador CBM-20A, detector de fluorescência RF 535, injetor manual 7725i com injetor de 20 µL e *Software* LC Solution-Shimadzu. Para eluição da FB<sub>1</sub> foi utilizada coluna Kromasil 100-5C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm), com diâmetro de partícula de 5µm.

Os testes de composição, vazão da fase móvel e tempo de corrida cromatográfica foram avaliados em detector de fluorescência (FL) empregando método isocrático de eluição com diferentes fases móveis (Tabela 6) e comprimento

de onda de excitação e emissão de 335 e 450 nm (BERND, 2010). Para tanto foram injetados padrões de FB<sub>1</sub> com concentração 10 e 20 µg.mL<sup>-1</sup> nas diferentes fases móveis estudadas.

Tabela 6: Testes de composição da fase móvel

<b>Solvente</b>	<b>Proporção (v:v:v)</b>	<b>Referência</b>
MetOH:Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1M	80:20 (pH 3,3 - ác.o-fosfórico)	BERND, 2010
ACN:H <sub>2</sub> O	50:50 (pH 2,45 – ác. acético)	MALMANN, et al.,2001
H <sub>2</sub> O:ACN:MetOH	60:30:10	Teste autor
ACN:H <sub>2</sub> O	70:30 (pH 2,45 – ác. acético)	Teste autor

Após definição da composição da fase móvel, foram injetadas 3 concentrações crescentes de padrão de FB<sub>1</sub> para confirmar o tempo de retenção (tr) da mesma pelo aumento do sinal nos comprimentos de onda de excitação (335 nm) e emissão (450 nm) previamente estabelecidos a partir da literatura (BERND, 2010).

#### 4.5.2 Limite de detecção e quantificação do instrumento

Para a determinação do limite de detecção (LOD<sub>i</sub>) e do limite de quantificação (LOQ<sub>i</sub>) do instrumento foram realizadas injeções de soluções padrão em ordem decrescente (1,0; 0,5; 0,15 e 0,075 µg.mL<sup>-1</sup>) até obtenção de pico com área três vezes superior ao sinal/ruído do branco (solução derivatizante OPA-MCE+solvente de ressuspensão do padrão), no tempo de retenção do pico de interesse, estimando-se assim o LOD<sub>i</sub>. Para obtenção do LOQ<sub>i</sub> adotou-se três vezes o LOD<sub>i</sub> (RIBANI, et al., 2004).

#### 4.5.3 Linearidade e Faixa de Aplicação

A linearidade do sinal do instrumento foi avaliada a partir da construção da curva analítica empregando padronização externa com soluções analíticas nas concentrações: 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,35; 0,5; 0,75 e 1,0 µg.mL<sup>-1</sup>, sendo o último ponto aproximadamente 13 vezes maior que o primeiro.

Os dados de regressão linear foram gerados com auxílio do *software* do equipamento, que estimou o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e o coeficiente de correlação linear (r).

#### 4.5.4 Precisão do instrumento

##### 4.5.4.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída)

Para avaliação da repetibilidade do método, foram realizadas injeções em triplicata de 3 concentrações conhecidas, contemplando o intervalo linear do método, consideradas de baixa ( $0,075 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), média ( $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e alta ( $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) concentração.

Os resultados da repetibilidade foram expressos através da estimativa do desvio padrão relativo porcentual (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%) (Equações 1 e 2):

Equação 1:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

Equação 2:

$$RSD(\%) = \frac{s * 100}{\bar{x}}$$

Em que:

$s$  = estimativa do desvio padrão absoluto;

$x$  = média das áreas (réplicas);

$\bar{x}$  = média da área;

$n$  = número de repetições;

$RSD(\%)$  = desvio padrão relativo porcentual.

##### 4.5.4.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas)

Para avaliação da precisão intermediária do método, foram realizadas injeções em triplicata de três concentrações conhecidas, contemplando o intervalo linear do método, consideradas de baixa ( $0,075 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), média ( $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e alta ( $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) concentração. Este procedimento foi realizado por dois analistas diferentes e em períodos diferenciados.

A precisão foi calculada a partir da estimativa do desvio padrão relativo porcentual (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%), (Equação 1 e 2, item 4.5.4.1):

#### 4.5.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir das injeções realizadas no estudo de precisão (intra e inter-corrída) e calculada conforme Equação 3:

Equação 3:

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} * 100$$

#### 4.5.6 Robustez

Para avaliação da robustez do sinal do instrumento foram avaliados os seguintes parâmetros: pH da fase móvel, condições de derivatização (proporção padrão FB<sub>1</sub>:OPA-MCE) e tempo de derivatização do padrão.

##### 4.5.6.1 pH da fase móvel

Para avaliação da robustez através da mudança de pH da fase móvel, foi construída uma nova curva (Curva de Robustez) alterando o pH da fase móvel para 2,79 com ácido acético.

Após construção da curva, esta foi comparada com a curva analítica do padrão com fase móvel ACN:H<sub>2</sub>O (50:50, v:v, ajustado o pH para 2,45 com ácido acético) avaliando os seguintes parâmetros: coeficiente de determinação ( $r^2$ ), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e coeficiente de correlação linear (r).

Utilizando a curva de robustez, foram realizadas injeções de 3 concentrações diferentes de padrão de FB<sub>1</sub>, consideradas baixa, média e alta (0,075; 0,5 e 1,0 µg.mL<sup>-1</sup>) em triplicata, e avaliadas a repetibilidade (RSD<sub>r</sub>) e exatidão (%) destas através das equações 2 e 3, citadas anteriormente nos itens 4.5.4.1 e 4.5.5, respectivamente.

#### 4.5.6.2 Condições e tempo de derivatização do padrão

Foi avaliado o efeito da derivatização na determinação de fumonisina B1 com o reagente o-ftaldialdeído (OPA) e 2-mercaptoetanol (MCE) como agente redutor, seguindo metodologia descrita por Bernd, (2010). O reagente de derivatização OPA-MCE foi preparado a partir da diluição de 40 mg de o-ftaldialdeído em 1 mL de metanol e 5 mL de borato de sódio 0,1 M seguido de adição de 50 µL de 2-mercaptoetanol. O reagente possui validade de 24 h, portanto era preparado no dia da determinação.

A fim de definir as melhores condições de derivatização e assegurar a robustez, foram realizados testes de proporção do padrão e do reagente de derivatização (FB<sub>1</sub>:OPA-MCE) a partir de diluições 1:1 (v:v) e 1:2 (v:v). Para tanto, 100 µL de solução de trabalho com concentrações de 10 µg e 20 µg de FB<sub>1</sub> ressuspendidas em solvente acetonitrila:água (ACN:H<sub>2</sub>O, 1:1, v:v), foram submetidos a derivatização com alíquotas de 100 ou 200 µL de OPA-MCE. Visando estabelecer as melhores condições de repetibilidade, os padrões já derivatizados foram armazenados sobre refrigeração (aproximadamente 4 °C) e decorridos 18 h de armazenamento, foram injetados novamente em HPLC, utilizando como fase móvel ACN:H<sub>2</sub>O (50:50, v:v, ajustado o pH a 2,45 com ácido acético) e vazão da fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, avaliando-se as características e as áreas dos picos cromatográficos.

#### 4.6 Estabelecimento das condições de extração

A extração da FB<sub>1</sub> foi realizada através dos métodos de QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”) proposto por Anastassiades, et al. (2003), para pesticidas e modificado por Desmarchelier, et al. (2010), para fumonsinas e método de Binkerd, et al. (1993), modificado por Malmann, et al. (2001). Foram avaliadas as porcentagens de recuperação (%R) de cada método.

Para tanto uma amostra de arroz branco, foi fortificada com a FB<sub>1</sub> e submetida à extração, a fim de se obter os seguintes níveis de recuperação: 1,0 X LOD<sub>m</sub> (30 µg.kg<sup>-1</sup>); 1,5 x LOD<sub>m</sub> (45 µg.kg<sup>-1</sup>); 2,0 X LOD<sub>m</sub> (60 µg.kg<sup>-1</sup>).

#### 4.6.1 Método de Binkerd

O método de Binkerd, et al. (1993), modificado por Malmann, et al. (2001), tem como principal diferencial a extração em fase sólida usando colunas de sílica C<sub>18</sub> (500 mg). As amostras destinadas a extração foram pesadas (10 g) em erlenmeyer de 125 mL, fortificadas com três diferentes níveis de FB<sub>1</sub>: 12; 20 e 25 µg.kg<sup>-1</sup> e mantidas em repouso por 24 horas para total evaporação do solvente. Para a primeira etapa da extração foram adicionados 30 mL de ACN:H<sub>2</sub>O (1:1, v:v) e submetidas a agitação em mesa agitadora orbital (300 rpm/1 hora/temperatura ambiente). Após homogeneização a mistura foi submetida à centrifugação (3220 g/15 min/20°C) e filtração. O filtrado foi recolhido em funil de separação e efetuada lavagem com n-Hexano como etapa de “clean up”. A fase contendo ACN:H<sub>2</sub>O foi recolhida e aplicada em coluna C<sub>18</sub> (500 mg) previamente acondicionada com 3 mL de ACN e 3 mL de H<sub>2</sub>O. A FB<sub>1</sub> foi eluída com 10 mL de MetOH acidificado com 0,5% de ácido acético. O eluato foi recolhido em frasco âmbar e submetido à secagem sob atmosfera de Nitrogênio a 40°C. O extrato seco foi ressuspenso em 800 µL de ACN, dos quais foram coletados 100 µL e derivatizados com 100 µL de OPA-MCE, 20 µL do derivatizado foram injetados dentro de 1 min em HPLC-FL nas condições cromatográficas estabelecidas no item 5.2.

#### 4.6.2 Método de QuEChERS

O método de QuEChERS proposto por Anastassiades, et al. (2003), para pesticidas e modificado por Desmarchelier, et al. (2010), para fumonsinas, é rápido e faz uso de pequenos volumes de solvente, gerando menores quantidades de resíduos. As amostras destinadas a extração foram pesadas (5 g) em tubos de centrífuga de 50 mL, e fortificadas com três níveis de FB<sub>1</sub>: 30; 45 e 60 µg.kg<sup>-1</sup>. Foram mantidas em repouso em temperatura ambiente por 24 horas para total evaporação do solvente. Para a primeira etapa da extração, foram adicionados 10 mL de água destilada e 10 mL de ACN acidificada com 0,5% de ácido acético. A mistura foi agitada manualmente após adição de cada solvente. Após verificação de ausência de grumos na amostra, esta foi submetida à agitação em mesa agitadora orbital (300 rpm/30 min/temperatura ambiente). O “clean up” ou concentração do extrato, consistiu na adição da mistura de sais MgSO<sub>4</sub>:NaCl (4:1, v:v) (5,0±0,2 g) e homogeneização através de agitação manual e posterior centrifugação (3220 g/15 min/20°C). Após centrifugação, 5 mL do sobrenadante (fase ACN) foram transferidos para tubo de centrífuga de 15 mL e

submetido à segunda etapa de “clean up” através da adição de 5 mL de n-hexano e posterior agitação, utilizando agitador automático (Vortex) (200 rpm/1 min/temperatura ambiente) e centrifugação (3220 g/1 min/20°C). Decorrida a etapa de limpeza, a fase ACN (5 mL) foi removida, transferida para frasco âmbar e submetida a secagem sob atmosfera de Nitrogênio a 40°C. O extrato seco foi ressuspensionado em 500 µL de ACN:H<sub>2</sub>O (1:1, v:v), dos quais foram coletados 100 µL e derivatizados com 100 µL de OPA-MCE. As injeções foram realizadas dentro de 1 min em HPLC-FL nas condições cromatográficas estabelecidas no item 5.2.

#### 4.6.3 Limite de detecção e quantificação do método

Para a determinação do limite de detecção (LOD<sub>m</sub>) e do limite de quantificação (LOQ<sub>m</sub>) do método foram realizadas injeções de extrações de amostras fortificadas com padrão de FB<sub>1</sub> em ordem decrescente, de acordo com o LOD e LOQ do instrumento, tendo-se de tal forma concentrações de 30, 45, 60 e 150 µg.kg<sup>-1</sup> até obtenção de pico com área três vezes superior ao sinal/ruído do branco (solução derivatizante OPA-MCE+solvente de ressuspensão do padrão), no tempo de retenção do pico de interesse, estimando-se assim o LOD<sub>m</sub>. Para obtenção do LOQ<sub>m</sub> adotou-se três vezes o LOD<sub>m</sub> (RIBANI, et al., 2004).

#### 4.6.4 Ensaio de recuperação

Para avaliação da porcentagem de recuperação (%R) do método, alíquotas de uma amostra de arroz branco, foram pesadas (5 g) e fortificadas (em triplicata) com 4 diferentes níveis FB<sub>1</sub>: 1,0 X LOD<sub>m</sub> (30 µg.kg<sup>-1</sup>); 1,5 x LOD<sub>m</sub> (45 µg.kg<sup>-1</sup>); 2,0 X LOD<sub>m</sub> (60 µg.kg<sup>-1</sup>) e 5,0 X LOD<sub>m</sub> (150 µg.kg<sup>-1</sup>).

Após fortificação, as amostras permaneceram em repouso sob temperatura ambiente (25°C), por 24 horas e foram submetidas à extração pelo método de QuEChERS (descrito no item 4.6.2) e posterior injeção em HPLC-FL para identificação e quantificação. Decorrida a quantificação, a %R foi calculada através da Equação 4:

Equação 4:

$$\%R = \frac{C1-C2}{C3} * 100$$

Em que:

%R = porcentagem de recuperação

C1= concentração determinada na amostra fortificada;

C2= concentração determinada na amostra não fortificada;

C3= concentração do padrão utilizado para a fortificação.

Também foram estimados o desvio padrão relativo percentual (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%) dos ensaios de recuperação através de aplicação da Equação 2 (item 4.5.4.1):

#### 4.6.5 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação entre uma curva analítica de FB<sub>1</sub> com o extrato da matriz (Curva de Efeito da Matriz) e uma curva analítica sem a presença de matriz.

Para a construção da Curva de Efeito da Matriz, primeiramente foi realizada a extração de uma amostra de arroz (isenta de FB<sub>1</sub>) empregando o método de QuEChERS (Anastassiades et al., 2003). O extrato em frasco âmbar, foi evaporado em Nitrogênio a 40°C, e a este foi adicionado a solução estoque de FB<sub>1</sub>, com concentração de 20 µg.mL<sup>-1</sup> utilizada para a construção da curva.

A curva de efeito de matriz foi construída através de injeção de 6 pontos em triplicata nas seguintes concentrações: 1,0; 2,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 µg.mL<sup>-1</sup>. A curva com padrão foi construída através da injeção de 9 pontos em triplicata nas seguintes concentrações: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

A seletividade foi estimada a partir do cálculo de fator de matriz das curvas, usando a relação entre os coeficientes angular de ambas.



#### 4.6.6 Precisão do método

##### 4.6.6.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída)

A repetibilidade do método, foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo porcentual (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%) dos ensaios de recuperação (%R) (Equação 1 e 2, item 4.5.4.1):

##### 4.6.6.2 Exatidão do método

A exatidão foi avaliada a partir das quantificações realizadas no estudo de precisão intermediária (intra-corrída) e calculada conforme Equação 3 (item 4.5.5):

#### 4.6.7 Aplicação do método cromatográfico

O método cromatográfico adaptado neste trabalho foi aplicado para extração e quantificação de FB<sub>1</sub> em amostras de arroz branco, parboilizado e integral (Tabela 5) cru e após aplicação de diferentes tratamentos térmicos.

#### 4.7 Efeito do tratamento térmico sobre os níveis de FB<sub>1</sub> em arroz

Foram realizados três tratamentos térmicos visando avaliar o efeito destes sobre os níveis de contaminação por FB<sub>1</sub>. Nos experimentos de tratamento hidrotérmico com evaporação foram utilizadas amostras de arroz do tipo branco, parboilizado e integral, que apresentaram o maior teor de contaminação natural por FB<sub>1</sub>, totalizando 3 amostras. Para avaliação do tratamento hidrotérmico com autoclavagem e tratamento térmico seco, foi utilizada uma amostra de arroz integral, naturalmente isenta de contaminação por FB<sub>1</sub> e fortificada com níveis conhecidos desta micotoxina. Foram utilizadas amostras de arroz integral devido ao fato desta conter a maior porção de constituintes naturais do grão, quando comparadas com as amostras de arroz branco e parboilizado, que além de não possuírem a porção de farelo, ainda são submetidas a polimento durante o beneficiamento.

#### 4.7.1 Tratamento hidrotérmico com evaporação da água

O tratamento hidrotérmico com evaporação da água (cocção) visou simular o cozimento doméstico, e para isso foram utilizadas três amostras (inteiras), sendo uma de arroz branco, uma de arroz parboilizado e uma de arroz integral, naturalmente contaminadas pela micotoxina (130; 100 e 170  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente) e empregadas as seguintes condições para cocção: 10 g de amostra, 0,1 g de NaCl, 0,2 g de óleo de soja comercial e 30 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Após homogeneização das amostras com os componentes da cocção, estas foram submetidas a aquecimento em chapa elétrica, a temperatura aproximada de 100 °C por 10 min, ou até total evaporação da água residual do cozimento.

Após cocção, as amostras foram submetidas à maceração em grau de porcelana, até obtenção de pasta sem presença de grãos inteiros, seguido de procedimento de extração da micotoxina ou de preparo para determinação de composição química.

#### 4.7.2 Tratamento hidrotérmico com autoclavagem

A amostra de arroz integral (isenta de contaminação) previamente moída, foi fortificada com três níveis conhecidos de  $\text{FB}_1$ : 400, 800 e 1200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . A fortificação foi realizada através da contaminação da amostra (10 g) com quantidades conhecidas da solução de trabalho, contendo padrão de  $\text{FB}_1$  diluído em solvente ACN: $\text{H}_2\text{O}$ , submetidas à secagem do solvente sob temperatura ambiente por 24 horas, afim de assegurar as concentrações pré estabelecidas para os tratamento.

O efeito do tratamento hidrotérmico com autoclavagem foi avaliado através de planejamento fatorial completo  $2^3$  (Delineamento Composto Central - DCC) com triplicata de pontos centrais, totalizando 11 experimentos, sendo as variáveis independentes: tempo de encharcamento, na proporção de 1:2 (arroz:água) em banho maria a 60°C, tempo de autoclavagem a pressão constante de trabalho de 1,0 atm e nível de contaminação por  $\text{FB}_1$  e tendo como resposta a redução ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) da micotoxina após tratamento térmico, e variável dependente, ou resposta, a redução (%) da micotoxina.

Na Tabela 7 estão expostos os valores reais e codificados das variáveis independentes.

Tabela 7: Valores reais e codificados das variáveis do DCC: tratamento hidrotérmico com autoclavagem.

<b>Níveis codificados</b>	<b>Nível de contaminação (<math>\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Tempo de encharcamento (horas)</b>	<b>Tempo de autoclavagem (min)</b>
-1	400	4	15
0	800	5	22,5
+1	1200	6	30

#### 4.7.3 Tratamento térmico seco

A amostra de arroz integral (isenta de contaminação) previamente moída, utilizada para o experimento de aplicação de aquecimento a seco (tratamento térmico seco) foi fortificada com cinco níveis conhecidos de  $\text{FB}_1$ : 60; 200; 600; 1000 e 1200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , seguindo procedimento citado no item anterior.

O experimento para avaliação do efeito foi conduzido sob planejamento fatorial completo  $2^3$  com três pontos centrais e dois pontos axiais (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR) totalizando 17 experimentos, sendo as variáveis independentes: tempo, temperatura e nível de contaminação por  $\text{FB}_1$  e tendo como variável independente ou resposta a redução (%) da micotoxina após tratamento térmico.

Na Tabela 8 estão descritos os valores reais e codificados das variáveis independentes.

Tabela 8: Valores reais e codificados das variáveis independentes do DCCR: tratamento térmico seco

<b>Níveis codificados</b>	<b>Nível contaminação (<math>\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Tempo (min)</b>
-1,68	60	50	5
1	200	100	15
0	600	125	22,5
+1	1000	150	30
+1,68	1200	200	40

#### 4.8 Determinação da Fumonisina B<sub>1</sub>

A determinação da FB<sub>1</sub> nas amostras de arroz cru e após tratamento térmico (tratamento hidrotérmico com evaporação, com autoclavagem e tratamento térmico seco) foi realizada através do método validado neste trabalho (item 4.6).

#### 4.9 Estimativa de redução de FB<sub>1</sub>

A estimativa da redução (%) da FB<sub>1</sub> nas amostras submetidas a tratamento térmicos foi calculada através da Equação 5.

Equação 5:

$$\%Red = 100 - \%R$$

Em que:

%Red = porcentagem de redução da FB<sub>1</sub>

%R = porcentagem de recuperação da FB<sub>1</sub>

#### 4.10 Caracterização química

As amostras de arroz cru e após tratamento hidrotérmico com evaporação foram analisadas quanto a sua composição química, teor de tirosina e degeestibilidade *in vitro*. Todos os cálculos dos componentes foram realizados em base seca.

##### 4.10.1 Composição química

A composição química foi realizada por meio da determinação do teor de umidade, cinzas, proteína bruta e extrato etéreo, seguindo os métodos recomendados e descritos pela “Association of Official Analytical Chemist International” – AOAC (2000).

A umidade foi determinada empregando o método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C, segundo o método n°935.29 da AOAC (2000).

A determinação de cinzas foi realizada por método gravimétrico através de incineração das amostras em forno mufla a 560 °C, até obtenção de cinzas claras, conforme método n°923.03 da AOAC (2000).

O teor de lipídios foi determinado pela extração com solvente éter de petróleo de acordo com o método 920.85 da AOAC (2000).

Os níveis protéicos foram determinados pelo método de micro-kjeldahl, nº920.87 da AOAC (2000), empregando fator de conversão para proteínas de 5,95.

#### 4.10.2 Teor de tirosina

Para determinação dos teores de tirosina disponíveis nas amostras foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu que consistiu em determinar tirosina naturalmente livre na amostra crua ou tratada termicamente (tratamento térmico com evaporação). Após a extração com solução de NaCl 0,9%, os aminoácidos foram quantificados com o reagente de Folin-Ciocalteu e os teores calculados a partir da curva padrão de tirosina (concentração 0,01 a 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) (LOWRY, et al., 1951).

#### 4.10.3 Digestibilidade *in vitro*

A digestibilidade *in vitro* das amostras foi determinada segundo adaptações do método descrito por Sgarbieri, (1996). As amostras foram submetidas à hidrólise enzimática empregando primeiramente pepsina (1,5 mg.mL<sup>-1</sup> em HCl 0,1M) (atividade específica 18,3 µg tir/min.mg prot.<sup>-1</sup>) por 3 horas, e posteriormente pancreatina (22,5 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 8,0) (atividade específica 2,3 µg tir/min.mg prot.<sup>-1</sup>) por 24 horas em agitador orbital a 37°C. A hidrólise foi interrompida com adição de ácido tricloroacético seguindo-se a separação do resíduo não digerido por centrifugação (3000 g/ 15 min/ 20°C). Os peptídeos e aminoácidos liberados foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e calculados a partir da curva padrão de tirosina (0,01 a 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) (LOWRY, et al., 1951).

#### 4.11 Análise estatística

Para analisar a influência das variáveis nos diferentes níveis de redução da FB<sub>1</sub> foi utilizado o *software Statistica 7.0*, no seu modo *experimental design* a partir de uma análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 95% e posterior construção das curvas de contorno e respectivas superfícies de resposta.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o *software Statistica v. 7.0*. Foram avaliadas as médias dos experimentos realizados em triplicata,

e a significância de suas diferenças, empregando o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Padronização da determinação de Fumonisina B<sub>1</sub>

As fumonisinas são micotoxinas produzidas principalmente pelo fungo *Fusarium verticillioides*, e na sua grande maioria, tem sua estrutura relacionada com as 16 fumonisinas já identificadas: B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, AK<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, PH<sub>1A</sub>, PH<sub>1B</sub>, sendo que a FB<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> são os mais importantes e constituem até 70% dos relatos de contaminação em alimentos e rações. Além de estar entre as mais estudadas, a FB<sub>1</sub> também tem o maior teor de toxicidade, como citado anteriormente. Os estudos de contaminação por FB<sub>1</sub> são mais comumente relacionados à amostras de milho, porém, ainda que escassos, existem relatos de contaminação por esta micotoxina em outros cereais como trigo e arroz (PARK, et. al., 2005; HEIDTMANN-BEMVENUTI, et al., 2012b). Aliando o alto consumo do arroz e a toxicidade da FB<sub>1</sub> torna-se evidente a importância do estudo dos níveis de incidência deste contaminante em amostras de arroz, e também os possíveis efeitos de tratamentos convencionais, utilizados no preparo deste cereal, nos níveis de redução da FB<sub>1</sub>.

No presente trabalho, foi escolhida a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pois, além de ser o método mais utilizado para detecção e quantificação de FB<sub>1</sub>, esta técnica possui elevada sensibilidade, permite determinações precisas pela eficiente separação de interferentes e ainda possui uma grande aplicabilidade para a investigação científica e controle de qualidade, dentre outros (LINO, et al. 2006).

#### 5.1.1 Confirmação da fluorescência por HPTLC

A cromatografia em camada fina (TLC) foi utilizada para confirmar a fluorescência da FB<sub>1</sub> quando utilizado o reagente de derivatização OPA-MCE, bem como o poder de eluição da fase móvel MetOH:H<sub>2</sub>O (3:1).

Após a eluição, secagem e pulverização da placa com OPA-MCE, foi possível visualizar os cromatogramas sob luz ultravioleta de ondas curtas e longas (254 e 366 nm) comprovando assim a derivatização e a eluição nas condições pré estabelecidas, porém não foram avaliados os fatores de retardamento, limites de detecção e quantificação, curva analítica e linearidade do método, devido ao fato de,

segundo recomendações do fabricante o reagente de derivatização OPA-MCE não ser adequado para esse tipo de procedimento, por representar risco ao analista quando pulverizado, aumentando de tal forma as chances de inalação e consequente contaminação.

Outros estudos foram reportados utilizando cromatografia de camada delgada para determinação de fumonisinas e diferentes reagentes para pulverização e visualização da fluorescência (ninhidrina;  $\beta$ -anisaldeído) porém, os limites de detecção na ordem de  $0,5 \text{ mg.g}^{-1}$  não permitiam sua aplicação. A utilização de fluorescamina como reagente revelador para visualizar as fumonisinas com luz UV, proporcionou a redução do LOD do método para  $0,1 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$  possibilitando assim, seu uso na análise de milho naturalmente contaminado (CAWOOD, et al., 1991; SYDENHAM, et al., 1990; SHEPARD, 1998). No entanto as técnicas de camada delgada, embora econômicas e rápidas, por suas características semi-quantitativas dificultam a avaliação correta de tratamentos diversos, sendo por isso neste trabalho empregada apenas para avaliar o potencial do reagente derivatizante.

## 5.2 Estabelecimento das condições cromatográficas HPLC

### 5.2.1 Condições para determinação por HPLC-FL

As fumonisinas são moléculas não voláteis, polares, solúveis em água e solventes polares, sendo assim, ideais para detecção e quantificação em HPLC. Para tanto, dois tipos de eluição são usados, isocrática e gradiente, uma vez que na maioria dos casos utiliza-se cromatografia de fase reversa para separar as fumonisinas, sendo a fase estacionária apolar e a fase móvel polar, por isso em ambas as eluições os solventes mais utilizados são metanol, acetonitrila, água, ácido acético e dihidrogenofosfato de sódio, com diferentes misturas e proporções (BERND, 2010; MALMANN, et al., 2001; LINO, et al. 2006). As fases móveis utilizadas em HPLC devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgaseificadas antes do uso (DEGANI, et al., 1998). Estas condições foram garantidas empregando solvente de grau HPLC e água ultrapura previamente submetidos a banho ultrasônico por 30 min.

A fim de estabelecer a melhor fase móvel, foram testados quatro diferentes misturas e proporções de solventes (Tabela 6). Os resultados podem ser observados nos respectivos cromatogramas destas injeções (Figura 7).



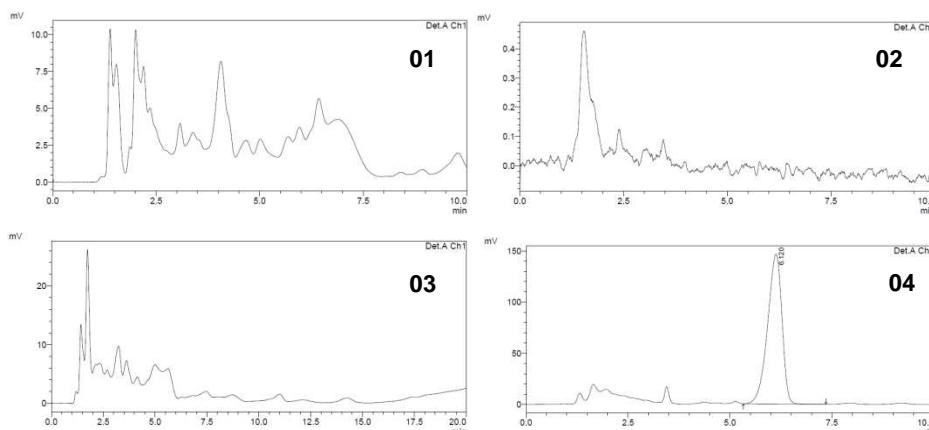


Figura 7: Cromatogramas de eluição de  $FB_1$  em HPLC utilizando quatro diferentes fases móveis.

**01**= ACN:H<sub>2</sub>O (70:30, v:v) ajustado pH a 2,45 com ác.acético; **02**= MetOH:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (80:20, v:v) ajustado pH a 3,3 com ác.o-fosforico; **03**= H<sub>2</sub>O:ACN:MetOH (60:30:10, v:v:v) e **04**= ACN:H<sub>2</sub>O (50:50) ajustado pH a 2,45 com ác.acético.

\*as escalas estão diferenciadas pela intensidade do sinal (em mv) para melhor visualização dos cromatogramas.

Como pode ser observado, nos cromatogramas 01, 02 e 03 não houve estabilização da linha de base, e por isso não foi possível observar a presença da  $FB_1$  no tempo de retenção (tr) de 6,3 min. De acordo com Plattner (1999), as fumonisinas podem ter apresentado um comportamento iônico em solução, e por isso, as separações em colunas de fase reversa são baseadas numa mistura de mecanismos de fase reversa e de troca iônica. As fumonisinas não eluem convenientemente da maior parte das colunas de fase reversa quando são injetadas com sistemas de solventes neutros e não tamponados.

Para se conseguirem melhores resultados a fase móvel deve ser acidificada, obtida pela adição de ácido acético ou fórmico à fase móvel ou pelo uso de um tampão volátil como o acetato de amônio ou formato de amônio. No caso deste estudo, observou-se que a acidificação da fase móvel apresentou resultado satisfatório quando utilizada a mistura de solventes ACN:H<sub>2</sub>O (50:50) com pH ajustado a 2,45 através do emprego de ácido acético (Cromatograma 04). Neste caso, houve estabilização da linha de base e eluição isolada e completa da  $FB_1$  dos resíduos de derivatização, sendo que esta foi eluída no tr observado no ensaio de derivatização (item 5.1.1), que foi de 6,3 min.

Após definição das condições de derivação (FB<sub>1</sub>:OPA-MCE, 1:1, v:v) e fase móvel (ACN:H<sub>2</sub>O, 50:50, v:v, ajustado pH para 2,45 com ácido acético) foram realizadas três injeções de padrão em concentração crescente (0,5; 0,75, e 1,0 µg.mL<sup>-1</sup>), a fim de confirmar o tempo de retenção da FB<sub>1</sub>. O tr da FB<sub>1</sub> foi confirmado em 6,3 minutos, e a partir deste resultado, foram padronizadas as condições cromatográficas para posterior validação do método de separação de FB<sub>1</sub> (Tabela ):

Tabela 9: Condições cromatográficas para separação de Fumonisina B<sub>1</sub>.

Parâmetros	HPLC-FL
Coluna	C-18 Kromasil (5µm, 150 x 4,6 mm)
Fase Móvel	ACN:H <sub>2</sub> O (50:50) ajustado a pH 2,45 com ác.acético
Vazão da fase móvel	1,0 mL.min <sup>-1</sup>
Alça de injeção	20 µL
Tempo de corrida	10 minutos
Detector Fluorescência	335 nm (excitação), 450 nm (emissão)
Tempo de retenção	6,3 minutos
Condições derivatização	FB <sub>1</sub> :OPA 1:1 (v:v)

### 5.2.2 Limites de detecção e quantificação, linearidade e faixa de aplicação do instrumento

Os dados obtidos variando as concentrações do padrão (Tabela ) foram ajustados em modelo de regressão linear para ser empregado na quantificação da micotoxina. O coeficiente de correlação (r) foi maior que 0,999, estando de acordo com orientações da ANVISA e do INMETRO, que recomendam, respectivamente,  $r \geq 0,99$  e  $r \geq 0,90$  (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

Tabela 10: Indicativos de eficiência para determinação de FB<sub>1</sub> por HPLC-FL

Indicativos	Curva analítica FB <sub>1</sub>
Curva analítica do solvente	$y = 7000485323 x - 76321,39$
Intervalo (µg.mL <sup>-1</sup> )	0,075 – 1,0
Coeficiente de correlação linear ( r )	0,999
Limite de detecção LOD <sub>i</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	0,075
Limite de quantificação LOQ <sub>i</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	0,225

Para construção da curva foram utilizados nove níveis de concentração, abrangendo desde o  $LOD_i$  até o valor de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo o último ponto em torno de 13 vezes maior que o primeiro. Esses valores estão de acordo com as diretrizes da ICH (“International Conference on Harmonisation”), (1995), e da ANVISA, (2003), que especificam um mínimo de cinco níveis de concentração. O GARP (Grupo Associação de Analistas de Resíduos de Pesticidas) também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (RSD%) entre as injeções inferior a 5%. A IUPAC recomenda seis ou mais concentrações (THOMPSON et al., 2002).

Considerando o intervalo de  $0,075-1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  da curva analítica de  $FB_1$ , o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) foi de  $0,9995866$ , ficou demonstrada a linearidade do sinal do instrumento para este analito. Ribani (2004) também mencionou que um coeficiente de correlação maior que  $0,999$  é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

### 5.2.3 Precisão – Repetibilidade (precisão inter-corrída) e precisão intermediária (precisão intra-corrída) do sinal do instrumento

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Em métodos para extração de micotoxinas, este dado é avaliado através dos estudos de repetibilidade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) (RIBANI, et al. 2004; ANVISA, 2003). A precisão e a exatidão do instrumento foram avaliadas dos estudos de repetibilidade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ). Estes valores estão apresentados nas Tabela , Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 11: Repetibilidade ou precisão intra-corrída e exatidão ( $RSD_r$ ) do instrumento

<b>Conc. teórica (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Média Conc. real (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Média Área</b>	<b><math>RSD_r</math> (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
0,075	0,077	503474,3	2,4	103
0,5	0,46	3358536	0,8	92
1,0	0,93	6898434	0,6	93

O  $RSD_r$  do sinal do instrumento ficou entre 0,6 e 2,4 %, sendo que, quanto maior a concentração do padrão de  $FB_1$  estudado, menor o  $RSD_r$  e

consequentemente a exatidão. Esses valores foram obtidos a partir de 9 injeções (3 concentrações em triplicata), conforme sugerido pelo INMETRO (2003) que recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, e pela ICH (1995) e ANVISA (2003) que sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

Tabela 12: Precisão intermediária ou precisão inter-corrída ( $RSD_{pi}$ ) do instrumento.

<b>Conc.FB<sub>1</sub></b> <b>(<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Área<sub>1</sub>*</b> <b>(1ºdia)</b>	<b>RSD<sub>pi</sub></b> <b>(%)</b>	<b>Área<sub>2</sub>**</b> <b>(1ºdia)</b>	<b>RSD<sub>pi</sub></b> <b>(%)</b>	<b>Área<sub>1</sub></b> <b>(2ºdia)</b>	<b>RSD<sub>pi</sub></b> <b>(%)</b>	<b>Área<sub>2</sub></b> <b>(2ºdia)</b>	<b>RSD<sub>pi</sub></b> <b>(%)</b>
<b>0,075</b>	503474	2,4	568262	2,0	533838	1,5	618976	9,6
<b>0,5</b>	3358536	0,8	3448537	1,1	3314125	0,9	3450447	0,5
<b>1,0</b>	6898434	0,6	6752788	2,0	7039186	2,9	6897327	3,6

\*Área: área do pico de FB<sub>1</sub> correspondente à injeção do padrão; \*\*1 e 2: Analista 1 e 2.

A precisão intermediária ou precisão inter-corrídas é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003). Os valores de  $RSD_{pi}$  variaram entre 0,5 e 9,6%, sendo que os teores mais altos foram apresentados pelo analista 2 e no segundo dia de ensaios.

Tabela 13: Valores de exatidão para Precisão intermediária ou precisão inter-corrída ( $RSD_{pi}$ ) do instrumento.

<b>Conc. teórica</b> <b>(<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Exat. RSD<sub>pi 1</sub>**</b> <b>(1ºdia)</b>	<b>Exat. RSD<sub>pi 2</sub></b> <b>(2ºdia)</b>	<b>Exat. RSD<sub>pi 1</sub></b> <b>(1ºdia)</b>	<b>Exat. RSD<sub>pi 2</sub></b> <b>(2ºdia)</b>
<b>0,075</b>	103	109	115	124
<b>0,5</b>	92	91	94	94
<b>1,0</b>	93	95	91	93

\*\*1 e 2: Analista 1 e 2.

Os níveis de exatidão estão dentro da faixa determinada pela legislação vigente para instrumentos de análise contínua, com exceção da exatidão correspondente ao nível baixo ( $0,075 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) analisada pelo analista 2 no segundo

dia do estudo, que excedeu em 4 % o valor máximo sugerido pela ANVISA (2003) que é de 120%.

#### 5.2.4 Robustez

##### 5.2.4.1 pH da fase móvel

De acordo com o INMETRO, (2003) a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Em HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em  $\pm 2\%$ , o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em  $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ . Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão e precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI, et al., 2004).

Os valores obtidos através da construção da Curva de Robustez estão expressos na Tabela , onde também são dados os valores da Curva Padrão, para posterior comparação:

Tabela 14: Indicativos de eficiência das curvas padrão e de robustez

<b>Indicativos</b>	<b>Curva padrão</b>	<b>Curva robustez</b>
Concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0,075 - 1,0	0,075 - 1,0
Coef. de determinação ( $r^2$ )	0.9991733	0.9985436
Coef. de correlação linear (r)	0.9995866	0.9992715
Equação	$y = 7.485323 x - 76321,39$	$y = 7.31481x - 47988.3$
Fase móvel (pH)	2,45	2,70
CV%	5,76733	5.75917

A seletividade foi confirmada a partir da relação entre os coeficientes angulares das duas curvas, que foi igual a 0,98, indicando valor próximo a 1,0, que de acordo com a literatura é um indicativo de ausência de interferentes que possam causar efeito no instrumento (KRUIVE, et al., 2009).

Após construção da curva, foram injetados padrões de FB<sub>1</sub> em três diferentes níveis de concentração (0,075, 0,5 e 1,0 µg.mL<sup>-1</sup>) para avaliação da repetibilidade (RSD<sub>r</sub>) e exatidão quando determinados na curva de robustez (Tabela ).

Tabela 15: Repetibilidade e exatidão da curva de robustez.

<b>Conc. Teórica (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média conc. Real (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média área</b>	<b>RSD<sub>r</sub> (CV%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
0,075	0,0893	590707	1,9	119
0,5	0,483	3539611	1,0	97
1,0	1,20	9232935	1,9	120

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4 e Tabela , pode-se observar que a alteração no e pH da fase móvel (ACN:H<sub>2</sub>O (47:53, v:v) e vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>) não influenciou nos parâmetros de linearidade da curva de FB<sub>1</sub>, apresentando através da injeção do padrão, valores de RSD<sub>r</sub> (entre 1,0 e 1,9%) e exatidão (entre 97 e 120%) dentro dos limites estipulados pela ANVISA, (2003) confirmando assim a robustez do equipamento.

#### 5.2.4.2 Condições e tempo de derivatização

A reação de derivatização ocorre entre o reagente derivatizante e a amina primária das fumonisinas (LINO, et al., 2006). O o-ftaldialdeído (OPA) é o reagente mais usado nesta reação utilizando o 2-mercaptoetanol (MCE) como agente redutor. A reação de derivatização com OPA-MCE é rápida e reprodutível à temperatura ambiente em tampão borato (pH 9-10) e, quando armazenada a temperatura de 4°C os resultados podem ser reprodutíveis por até 24 h após a derivatização (WILLIAMS, et al., 2004). Além do OPA e MCE, outros reagentes também são utilizados na derivatização de fumonisinas, como por exemplo o naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA) usado com cianeto de potássio (SCOTT e LAWRENCE, 1995; LOMBAERT, et al., 2003; DOMBRINK-KURTZMAN e DVORAK, 1999) e o 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F) (SCOTT e LAWRENCE, 1992) porém, ambos apresentam maior instabilidade e menor intensidade de fluorescência da fumonisina após derivatização, sendo assim, o OPA-MCE foi o escolhido para este trabalho.

Os resultados dos testes de derivatização estão expressos na Tabela 16 e Figura 8.

Tabela 16: Áreas dos picos referentes a quantificação de  $FB_1$  sob diferentes proporções de padrão:OPA-MCE.

Concentração Padrão $FB_1$	Área do pico			
	1:1	1:1/ 18 h	1:2	1:2 / 18 h
$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$	5181414	4191886	3781992	690133
$20 \mu\text{g.mL}^{-1}$	10788428	9169982	7048888	1207263

1:1= proporção de padrão  $FB_1$ :OPA-MCE (100  $\mu\text{L}$ :100  $\mu\text{L}$ ); 1:1/18h= proporção de padrão  $FB_1$ :OPA-MCE (100  $\mu\text{L}$ :100  $\mu\text{L}$ ) após 18 horas de armazenagem sob refrigeração.

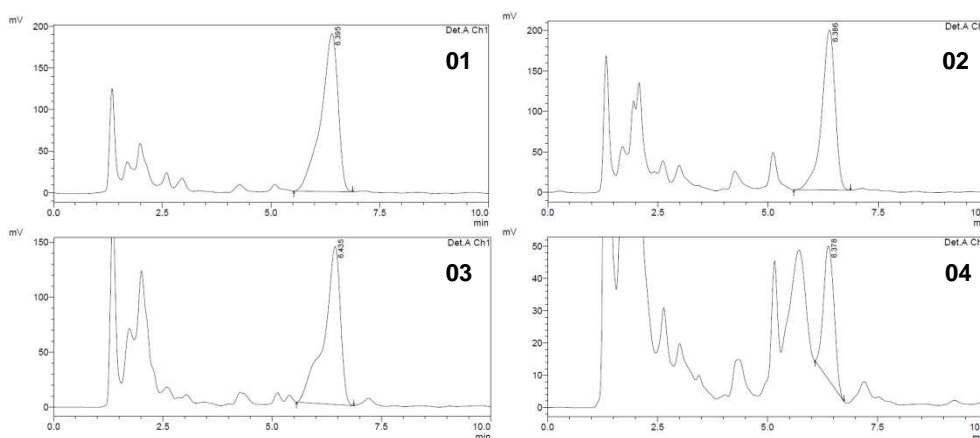


Figura 8: Cromatogramas de separação em fase reversa de derivados de  $FB_1$  OPA-MCE, formados pela derivatização do padrão de  $FB_1$  ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em diferentes proporções de padrão:OPA. **01**=  $FB_1$ :OPA (1:1); **02**=  $FB_1$ :OPA (1:1) 18 horas; **03**=  $FB_1$ :OPA (1:2) e **04**=  $FB_1$ :OPA (1:2) 18 horas.

\*as escalas estão diferenciadas pela intensidade do sinal (em mV) para melhor visualização dos cromatogramas.

De acordo com dados da literatura, quando utilizados ACN:H<sub>2</sub>O (50:50,v:v, ajustado o pH para 2,45 com ácido acético) como fase móvel, com vazão de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ , reagente OPA-MCE como derivatizante e coluna de adsorção C-18 Kromasil ( $5\mu\text{m}$ ,  $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ), o tempo de retenção ( $t_r$ ) da  $FB_1$  deve ser de aproximadamente seis minutos (SHEPHARD, 2001; MALMANN, et al., 2001). Nos testes realizados (Figura 8) foram obtidos  $t_r$  de 6,3 min para  $FB_1$ , independente da proporção  $FB_1$ :OPA-MCE e tempo para injeção.

Os picos cromatográficos eluídos de uma pequena quantidade de amostra em um sistema de separação, devem possuir distribuição gaussiana, e a largura deste é definida pela intersecção das tangentes do ponto de inflexão do pico com a linha de base, sendo assim, a eficiência da separação cromatográfica está diretamente relacionada com o alargamento da banda cromatográfica (COUTINHO e LANÇAS, 2011), características que podem ser visualizadas nos cromatogramas 01 e 02 (Figura 08).

No teste do efeito do tempo de derivatização do padrão (4 °C/18 h) no sinal cromatográfico foram comparadas as áreas de picos obtidas no tempo de 6,3 min, que mostrou 19% e 16% de redução na área após 18 horas, quando empregada a proporção 1:1 (FB<sub>1</sub>:OPA-MCE), e padrões com concentração de 10 e 20 µg, respectivamente. Quando a proporção de reagente derivatizante era 1:2 em padrão com concentração de 10 µg ocorria redução de 82% nas áreas durante 18 horas, quando esta proporção foi aplicada ao padrão contendo 20 µg de FB<sub>1</sub> houve aumento da área do pico após 18 horas. Apesar destes resultados, quando comparadas as áreas dos picos de injeções imediatas com proporção de 1:1 e 1:2 (FB<sub>1</sub>:OPA-MCE), em ambas concentrações de padrão, a segunda proporção resultou em pico aproximadamente 30% menor, o que era esperado, uma vez que a proporção de reagente derivatizante era menor (equivalente a  $\frac{1}{3}$  da mistura). Em decorrência desses resultados, foi confirmada a robustez do método quanto à proporção do padrão e do reagente de derivatização (FB<sub>1</sub>:OPA-MCE) quando aplicada injeção imediata da mistura, e por isso, foi adotada a injeção imediata após a derivatização, com proporção 1:1 visando minizar o volume gasto de reagente de derivatização (OPA-MCE) sem prejudicar a qualidade do sinal detectado.

### 5.3 Estabelecimento das condições de extração

#### 5.3.1 Estudo da recuperação do Método de Binkerd e QuEChERS

A escolha do método de extração que foi utilizado para a validação do método de detecção e quantificação de FB<sub>1</sub> em amostras de arroz cru e com cocção foi realizada a partir dos resultados de R (%) e CV% obtidos com os métodos estudados. Estes valores estão expressos na Tabela 17:



Tabela 17: Recuperação (%R) e CV% dos métodos de extração QuEChERS e Binkerd.

<b>Método de extração</b>	<b>Fortificação (<math>\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Média <math>\pm</math> CV (%)</b>
Binkerd	12	33	
	12	102	64,8 $\pm$ 38,2
	12	59,5	
	20	98	
	20	30	51,3 $\pm$ 60,6
	20	26	
	25	37	
	25	29	30,7 $\pm$ 13,8
	25	26	
QuEChERS	30	116	
	30	136	114,7 $\pm$ 13,9
	30	91	
	45	87	
	45	75	91,0 $\pm$ 15,0
	45	111	
	60	81	
	60	93	95,6 $\pm$ 12,3
	60	113	

O método de Binkerd, et al., (1993) modificado por Malmann, et al., (2001) apresentou valores de recuperação (%R) entre 30,7 e 64,8% para os níveis de contaminação estudados, com coeficientes de variação acima do recomendável para conferir confiabilidade a determinação (máximo 20%). Este fato pode ser atribuído a matriz empregada, que dificulta a interação do analito com o solvente.

O método de QuEChERS, modificado por Desmaschelier et al. (2010), para fumonisinas obteve valores de recuperação entre 91 e 115%, estando todos os CV (%) com valor de no máximo 15,5%. De acordo com resolução da ANVISA (2009), os métodos para determinação e quantificação de Fumonisinas devem ter porcentagem de recuperação entre 60 e 120% com coeficientes de variação não excedendo 20%, portanto atendido pelo método de QuEChERS.

Vários estudos reportaram o uso de colunas na etapa de “clean up” na extração de FB<sub>1</sub>, utilizando extração em fase sólida (SPE), em fase reversa (C<sub>18</sub>), troca aniônica (SAX) ou colunas de imunoafinidade (IAC), com teores de recuperação aceitáveis pela legislação (MALLMAN, et al., 2001; CRUZ, 2010; CAMARGOS et al. 1999) porém, neste estudo, os níveis de recuperação encontrados quando a micotoxina foi extraída de amostras de arroz não se mostraram satisfatórios quando comparados com o método de QuEChERS. Shepard, 1998, observou variações importantes na porcentagem de recuperação com relação à purificação do extrato através do uso de colunas C<sub>18</sub>, e relacionou este fato à interação das fumonisinas com os locais ativos do adsorvente, impedindo assim sua total eluição durante a extração.

O método de QuEChERS que utiliza como etapa de *clean up* uma mistura de sais MgSO<sub>4</sub>:NaCl (4:1, m:m) (5,0±0,2 g) e n-hexano (5mL) apresentou os melhores resultados, sendo estabelecido como método de extração para a extração de FB<sub>1</sub> em amostras de arroz.

### 5.3.2 Limite de detecção e quantificação do método

Os limites de detecção (LOD<sub>m</sub>) e quantificação (LOQ<sub>m</sub>) para o método de extração de QuEChERS para FB<sub>1</sub> em amostras de arroz foram de 30 µg.kg<sup>-1</sup> e 90 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Estes valores estão de acordo com os demais estudos relacionados com estes contaminantes em amostras alimentícias. Bernd, 2010, ao quantificar FB<sub>1</sub> em amostras de milho utilizando OPA-MCE como derivatizante, metanol:fosfato de sódio 0,1 M (80:20, v:v) ajustado com ácido fosfórico a pH 3,3 como fase móvel e detecção em HPLC-FL obteve limite de detecção do método de 27,5 µg.Kg<sup>-1</sup>, enquanto Malmann, et al., 2001, utilizando as mesmas condições de detecção e derivatização, porém ACN:H<sub>2</sub>O:ácido acético (50:49:1, v:v:v) como fase móvel, obteve 40 µg.Kg<sup>-1</sup> como LOD<sub>m</sub>. Desmachelier, et al., 2010, em recente estudo, detectou FB<sub>1</sub> em 9 diferentes tipos de amostras, dentre elas arroz, e utilizando HPLC-ESI-MS/MS para separação e quantificação da micotoxina, atingiu limite de quantificação de 50 µg.Kg<sup>-1</sup>, em uma faixa de linearidade de 0-1000. Esses dados indicam que, os limites de detecção e quantificação para FB<sub>1</sub> (30 µg.Kg<sup>-1</sup> e 90 µg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente) proporcionados pelas condições utilizadas neste trabalho estão de acordo com os estudos citados, proporcionando maiores condições de detecção e quantificação deste composto em

matérias primas com menores níveis de contaminação por FB<sub>1</sub>, como por exemplo o arroz, cujas porções externas são removidas durante o beneficiamento.

### 5.3.3 Ensaio de recuperação

De acordo com os resultados de recuperação (%R) para o método de QuEChERS em amostras de arroz cru e arroz cozido fortificados com níveis conhecidos de FB<sub>1</sub>, apresentados na Tabela 118, é possível verificar que os valores de recuperação e RSD<sub>r</sub> (CV%) se mantiveram dentro do estipulado pela legislação para extração de FB<sub>1</sub> (ANVISA, 2009), apresentando valores de %R entre 60 e 115% para arroz cru, e 70 a 93% para arroz cozido, com CV variando entre 0,25 e 15,0% e 7,4 e 15%, respectivamente.

Tabela 18: Valores de recuperação (%R) e CV% para FB<sub>1</sub> em amostras de arroz.

<b>Nível fortificação (<math>\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b>%R (cru)</b>	<b>CV % (cru)</b>	<b>%R (com cocção)</b>	<b>CV% (com coção)</b>
<b>1,0 x LOD – 30</b>	115	13,9	93	7,4
<b>1,5 x LOD – 45</b>	91	15,0	90	14,4
<b>2,0 x LOD – 60</b>	96	12,3	89	15,0
<b>5,0 x LOD – 150</b>	60	0,25	70	9,1

O método de QuEChERS vem apresentando resultados satisfatórios na extração de compostos em quantidade traço, inclusive de fumonisinas. Desmarchelier, et al., 2010, utilizou este método na extração de várias micotoxinas, entre elas a FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, em diferentes matrizes, obtendo para arroz níveis de recuperação de 78, 79 e 104% para os três níveis de fortificação de FB<sub>1</sub> estudados, 50, 75 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , e 97, 104 e 95% para os mesmos níveis de fortificação de FB<sub>2</sub> nas mesmas amostras e condições.

No trabalho de Bemvenuti (2010) foi utilizado o método de QuEChERS para extração das micotoxinas DON e ZEA em amostras de arroz, e foram obtidos valores de recuperação de 82 e 86 % para estas micotoxinas. Ao confirmar a extração através de quantificação em LC-MS/MS, a autora obteve resultados de 70% para DON e 82,4% para ZEA. Utilizando o mesmo método para extração de ocratoxina A e citrinina de amostras de arroz, Hackbart (2009) obteve valores de repetibilidade (RSD<sub>r</sub>) entre

1,3 e 1,6% para citrinina e 0,9 e 3,2% para ocratoxina A, e recuperação de 70 e 90% respectivamente, confirmando a aplicabilidade da extração para micotoxinas.

O método de QuEChERS originalmente utilizado para extração de agrotóxicos (ANASTASSIADES, et al., 2003), quando utilizado para este propósito por Rodrigues, et al. (2011) apresentou excelentes resultados, com valores de CV na faixa de 3,3 a 20% para repetibilidade e 2,0 a 20% para precisão intermediária, semelhantes valores vem sendo obtidos para micotoxinas.

Além do método de extração de QuEChERS, vários outros métodos são utilizados na extração da FB<sub>1</sub>. Em recente estudo, Cruz (2010) realizou extração de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em amostras de milho, utilizando metanol:água (1:1, v:v) e NaCl, para extração das micotoxinas, e colunas de imunoafinidade (Fumonitest®, Vicam) na etapa de *clean up*, obtendo 93% de recuperação para FB<sub>1</sub> e 87% para FB<sub>2</sub>. Em estudo de contaminação de alimentos e bebidas por FB<sub>1</sub>, utilizando método de extração de Shephard et al. (1990) (AOAC Official Method 995.15 (1997)) com modificações segundo Camargo, et al., (1999), Kamashima e Soares (2006) obtiveram níveis de recuperação de 86±19% com variação entre 60 e 119%, utilizando cartuchos SAX na etapa de limpeza da extração, resultados estes condizentes com os obtidos neste trabalho.

O método de QuEChERS além de apresentar resultados satisfatórios na extração de Fumonisina B<sub>1</sub> em amostras de arroz possibilitando a realização de várias análises em um curto intervalo de tempo, ainda produz um número reduzido de resíduos, quando comparado aos demais métodos, e, além disso, dispensa o uso de colunas na etapa de *clean up*, tornando de tal forma, a análise ainda mais acessível do ponto de vista econômico e operacional. Tendo em vista esses fatores e os indicativos de eficiência do método obtidos neste trabalho, ficou confirmado que método de QuEChERS se mostra promissor quando relacionado à análise e extração de FB<sub>1</sub> em amostras de arroz.

#### 5.3.4 Seletividade

Quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse, faz-se uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Comparam-se então as duas curvas e caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse (ANVISA, 2003).

Os dados de regressão linear gerados a partir da construção da curva de efeito de matriz e da curva do padrão estão apresentados na Tabela

Tabela 19: Indicativos de eficiência para as curvas analíticas da matriz e do padrão

<b>Indicativos</b>	<b>Curva efeito da matriz</b>	<b>Curva do padrão</b>
Concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	1,0 a 12	2,0 a 10
Coef. de determinação ( $r^2$ )	0,9523426	0,9968672
Coef. de correlação linear (r)	0,9758804	0,9937442
Coeficiente angular (a)	422599,3	410742,7

A partir dos resultados obtidos na construção das duas curvas, pode-se observar que estas são paralelas com fator de matriz para  $\text{FB}_1$  de 1,02. Segundo Krueve, et al., (2009) quando a resposta do analito é igual a um, nenhum efeito matriz é observado, demonstrando mais uma vez que o método de extração utilizado não tem efeito de matriz, sendo possível quantificar o composto nas condições estabelecidas.

### 5.3.5 Precisão e exatidão do método

#### 5.3.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída) e exatidão

Os resultados para repetibilidade ( $\text{RSD}_r$ ) e exatidão do método estão expressos na Tabela 0:

Tabela 20:  $\text{RSD}_r$  e exatidão do método QuEChERS para extração de  $\text{FB}_1$  em arroz.

<b>Nível fortificação</b> ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	<b><math>\text{RSD}_r</math></b>	<b>Exatidão</b>
30	13,9	114,7
45	15,0	91,0
60	12,3	95,6
150	0,25	59,6

Os teores de  $RSD_r$  variaram entre 0,25 e 15,0% estando de acordo com o estabelecido pela ANVISA (2009) que sujeta valores de no máximo 20%. Os teores de exatidão diminuíram com o aumento da concentração da  $FB_1$  na amostra. Isso é esperado, pois quanto menores os valores de contaminação, menos exato a determinação, neste caso apresentou teor próximo ao limite máximo estipulado pela legislação (120%) quando foram extraídos teores correspondentes ao LOD do método.

Em estudos anteriores os níveis de repetibilidade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) na detecção e quantificação de  $FB_1$ , foram avaliados por diferentes métodos de extração. Moller e Gustavsson (2000) realizaram testes de repetibilidade a fim de verificar o melhor desempenho na extração empregando colunas na etapa de *clean up*. Para tanto os autores compararam dois métodos de limpeza da amostra durante a extração através do uso de colunas de imunoafinidade (Fumonitest – Vicam) e colunas de SPE (coluna SepPak  $C_{18}$  – Waters e colunas de eluição SAX Bond – Varian), obtendo valores de  $RSD_r$  de 4,9 e 10,5, respectivamente, em amostras de produtos de milho naturalmente contaminadas. Desmaschelier, et al., (2010), empregando procedimento de QuEChERS para extração de Fumonisina  $B_1$  em amostras de arroz, obtiveram precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) de 13, 10 e 10% para amostras com níveis de contaminação de 50, 75 e 100  $\mu g.Kg^{-1}$ , respectivamente.

#### 5.4 Aplicação do método padronizado

##### 5.4.1 Ocorrência de $FB_1$ em amostras de arroz

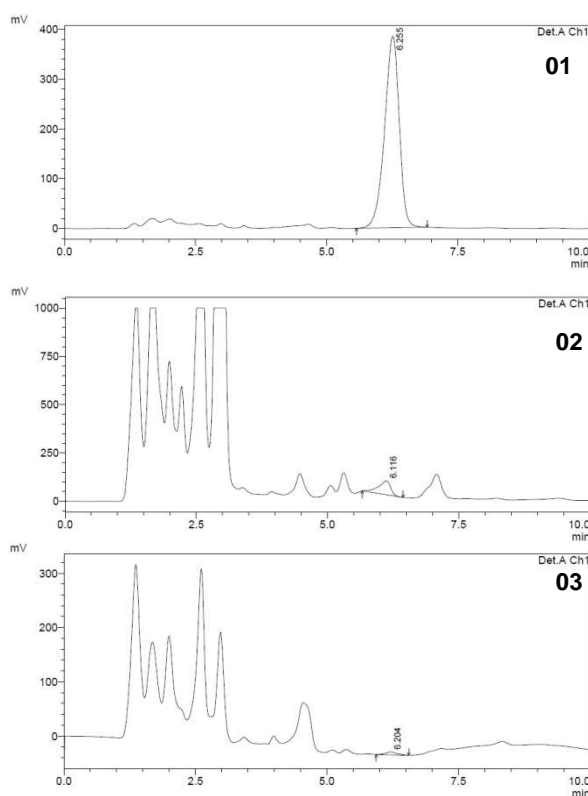
O método para detecção de  $FB_1$  por cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado para quantificação desta micotoxina nas amostras de arroz cru utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho. Os resultados estão expressos na Tabela 1 e Figura 9:

Tabela 21: Quantificação de FB<sub>1</sub> em amostras naturalmente contaminadas.

Amostra	Arroz	Contaminação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	CV%
01	Branco A	130 <sup>b**</sup>	6,7
02	Branco B	< LOD*	-
03	BrancoC	< LOD	-
04	Parboilizado A	100 <sup>c</sup>	4,3
05	Parboilizado B	40 <sup>d</sup>	15,0
06	Parboilizado C	40 <sup>d</sup>	4,9
07	Integral A	170 <sup>a</sup>	1,9
08	Integral D	30 <sup>d</sup>	4,9
09	Integral C	40 <sup>d</sup>	2,4

\*<LOD: nível abaixo do Limite de Detecção do método (LOD = 30  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )

\*\* letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

Figura 9: Cromatogramas de eluição de FB<sub>1</sub>.

**01:** Padrão de FB<sub>1</sub> com concentração de 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; **02:** Amostra naturalmente contaminada com 170  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de FB<sub>1</sub> (amostra 7). **03:** Amostra sem contaminação (amostra 02). \*as escalas estão diferenciadas pela intensidade do sinal (em mv) para melhor visualização dos cromatogramas.

Das amostras analisadas, 78% estavam contaminadas com FB<sub>1</sub>. Os níveis de contaminação foram baixos, sendo que, muitos deles aproximaram-se do limite de detecção do método, porém houve diferença significativa nas detecções, tanto entre amostras de mesma variedade (branco, parboilizado ou integral), quanto para as diferentes ( $p < 0,05$ ). Nas amostras 02 e 03, correspondentes a duas diferentes marcas de arroz branco, não pôde ser estimado o nível de contaminação, uma vez que este ficou abaixo do limite de detecção ( $LOD = 30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

O maior índice de contaminação por FB<sub>1</sub> foi registrado na amostra de arroz integral (amostra número 07) e todas as amostras de arroz parboilizado apresentaram contaminação positiva, sugerindo que a parboilização contribuiu para a migração de micotoxinas para o endosperma amiláceo, como já havia sido demonstrado em pesquisas anteriores para outras micotoxinas menos polares como AFA, OTA e DON (COÊLHO, et al, 1999; DORS, 2009). Quando comparadas as marcas, a marca A foi a que apresentou os maiores índices de contaminação, independente do tipo de arroz analisado.

Os estudos de contaminação de arroz por FB<sub>1</sub> são escassos, devido ao fato de esta micotoxina ser comumente estudada em amostras de milho e derivados, porém, Mallmann, et al., (2001) analisaram 407 amostras de cereais consumidos no Rio Grande do Sul entre janeiro de 1996 e junho de 1998, destas 5 eram arroz, e 4 delas apresentaram contaminação positiva para FB<sub>1</sub>, com níveis entre 1140 e 14210  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Park, et al. (2005), estudou a incidência de micotoxinas em arroz destinado ao consumo humano na Coreia do Sul, e quanto aos relatos de fumonisina B<sub>1</sub> nas amostras, 21% destas apresentaram resultados positivos, com níveis variando de 4,4 a 7,1  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de FB<sub>1</sub>. Dados que são consistentes com os percentuais de ocorrência observados neste levantamento.

Os níveis de contaminação encontrados em amostras de milho e derivados são relativamente maiores, quando comparados com arroz e outros cereais. Kashimira e Soares, (2006) analisaram FB<sub>1</sub> através do método de HPLC, em 74 amostras de produtos à base de milho do comércio de Recife – PE, compreendendo os seguintes tipos: canjica, farinha de milho, farinha e flocos de milho pré-cozido, fubá, milho de pipoca, quirera e quirera fina. A micotoxina foi positiva em 71 das 74 amostras, com concentrações variando de 20 a 8600  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ . As concentrações mais altas foram encontradas em amostras de fubá (média=2700  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  e máximo=8600  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ). Isto pode ser devido a contaminação mais intensa neste grão ou ao fato de que as porções comestíveis são obtidas apenas a partir da moagem do grão.



O arroz pode apresentar também contaminação por outras micotoxinas, como relata Silva, et al., (2006) que em seu estudo detectou a presença de contaminação por AFB<sub>1</sub> em seis (23%) das 26 amostras analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com níveis entre 0,54 e 2,04 µg.kg<sup>-1</sup> e detectou em uma (3,84%) a presença de aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) com 1,84 µg.kg<sup>-1</sup>. O sistema de plantio irrigado empregado nas lavouras de arroz da região sul do Brasil, favorece o crescimento fúngico, bem como a produção de micotoxinas nas amostras desse cereal. Esses índices são relatados por Heidtmann-Bemvenuti, et al., (2012) que analisaram ZEA e DON em amostras de endosperma de arroz submetidos a parboilização, e observaram níveis de contaminação mais elevados (8 µg.kg<sup>-1</sup> ± 17,1% com DON e 111,7 µg.kg<sup>-1</sup> ± 12,5% com ZEA) do que o arroz natural. O estudo de contaminação de 8 diferentes tipos de arroz por OTA e CIT, foi relatado por Hackbart, et.al., (2011), que analisaram um total de 38 amostras, das quais somente uma apresentou resultado positivo para OTA (arroz em casca armazenado em silo/ 560 µg.kg<sup>-1</sup>) e uma amostra de arroz em casca parboilizado apresentou nível de contaminação de 120 µg.kg<sup>-1</sup> para CIT.

Os altos níveis de micotoxinas do *Fusarium* em arroz também foram relatados por Nunes, et al., (2003) que analisaram AFB<sub>1</sub>, OTA, ZEA, DON E Toxina T<sub>2</sub> em 14 diferentes marcas de arroz, sendo 6 de arroz polido e 4 de arroz integral e parboilizado, comercializados na cidade de Pelotas e Rio Grande no RS. Os maiores níveis de contaminação micotoxicológica foram de ZEA, apresentando resultados positivos em duas amostras de arroz parboilizado e uma de arroz branco, com níveis de contaminação variando entre 559 e 1955 µg.kg<sup>-1</sup>. Os autores também reportaram contaminação por DON em uma amostra de arroz branco (266 µg.kg<sup>-1</sup>), e OTA com teores de 104 e 128 µg.kg<sup>-1</sup> para uma amostra de arroz branco e uma de arroz parboilizado, respectivamente. A Toxina T<sub>2</sub> não foi reportada em nenhuma amostra, e as amostras de arroz integral não apresentaram contaminação pelas micotoxinas estudadas.

Os níveis de FB<sub>1</sub> quantificados nas amostras analisadas são relativamente baixos quando comparados com outras matérias primas, porém, levando em consideração que a ingestão *per capita* de arroz é em torno de 58 kg, e que a amostra de arroz integral, por exemplo, apresentou contaminação natural de 170 µg.kg<sup>-1</sup>, estima-se que a ingestão diária de FB<sub>1</sub> de um indivíduo que se alimenta com esse tipo de arroz é de aproximadamente 27,0 µg de FB<sub>1</sub>. Se considerarmos o DDA (digestão diária admissível) de FB<sub>1</sub> sugerida pela WHO (2002), que é de 2 µg/kg p.c., esse índice é alto, pois por exemplo, se uma criança pesando 20 kg utilizar essa matéria

prima na alimentação, o DDA será de 1,35 µg/kg p.c, não considerando os demais alimentos, principalmente a base de milho, que podem ser ingeridos com contaminação positiva, e que vem acrescentar nesse valor.

### 5.5 Efeito dos tratamentos térmicos nos níveis de contaminação por FB<sub>1</sub>

Os efeitos da aplicação dos três diferentes tratamentos térmicos (tratamento hidrotérmico com evaporação (cocção), tratamento hidrotérmico com autoclavagem e tratamento térmico seco) nos níveis de redução da contaminação natural ou artificial de amostras de arroz por FB<sub>1</sub> estão apresentados nos próximos itens, como também a avaliação dos fatores que mais influenciaram nesta redução.

#### 5.5.1 Tratamento hidrotérmico com evaporação

O tratamento hidrotérmico com evaporação da água (cocção) foi realizado para avaliar o efeito do preparo doméstico mais usual do arroz, nos níveis de FB<sub>1</sub>, considerando para isto a ocorrência de contaminação natural em 78% das amostras coletadas.

As amostras que representavam maior contaminação natural foram preparadas com adição de NaCl e óleo de soja (item 4.4.1), submetidas às condições pré estabelecidas de cocção e posteriormente realizada a extração da FB<sub>1</sub> através do método de QuEChERS e detecção e quantificação em HPLC-FL (Tabela 2).

Tabela 22: Níveis de redução (%) de FB<sub>1</sub> em amostras de arroz após cocção.

Amostra	Contaminação	Contaminação	Redução (%)	Média ± CV%
	natural (µg.kg <sup>-1</sup> )	pós cocção (µg.kg <sup>-1</sup> )		
01* a**	140	50	66,6	
01 b	140	40	67,9	67,8 <sup>b</sup> ± 2,4
01 c	120	40	68,9	
04 a	100	20(<LOD <sub>m</sub> )	82,0	
04 b	110	20(<LOD <sub>m</sub> )	79,8	81,4 <sup>a</sup> ± 3,1
04 c	100	20(<LOD <sub>m</sub> )	82,6	
07 a	170	50	71,0	
07 b	180	40	75,6	70,2 <sup>b</sup> ± 11,7
07 c	170	60	64,0	

\*Amostra 01: Arroz branco; amostra 04: Arroz parboilizado; amostra 07: Arroz integral;

\*\*a,b e c: triplicata das extrações e quantificações; <LOD<sub>m</sub>: concentração abaixo do limite de detecção do método.

A amostra de arroz parboilizado teve redução significativamente maior que as demais, apresentando concentrações de FB<sub>1</sub> abaixo do LOD<sub>m</sub>, com teor de redução de aproximadamente 80%. Este fato pode estar relacionado com a pré gelatinização do amido, sofrida durante o processo de parboilização, pois durante este processo o amido gelatinizado torna-se solúvel em água, e a micotoxina pode também migrar para a água de cozimento e ficar aderida às paredes do recipiente. Em recente estudo com amostras de arroz contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub>, Park, et al., (2005) obtiveram redução de 34% da contaminação após aplicação de cozimento comum. Os maiores teores de redução, determinados neste trabalho para FB<sub>1</sub> podem ser atribuídos a sua migração para a H<sub>2</sub>O de cozimento, uma vez que essa micotoxina é solúvel em solventes polares, e possivelmente ficado aderida ao recipiente de cozimento durante a evaporação desta. Outro aspecto que poderia ter contribuído para esta migração é a característica do amido das variedades cultivadas no RS, que propiciam poucos sítios ativos para a interação com a toxina.

### 5.5.2 Tratamento hidrotérmico com autoclavagem

Considerando que os maiores níveis de  $FB_1$  foram encontrados no arroz parboilizado e que este apresentou o maior teor de redução, possivelmente devido à migração da micotoxina para o exterior do grão quando exposto à cocção, foram avaliados os efeitos de tempo de encharcamento e autoclavagem nos níveis da  $FB_1$ , visando propor uma forma de reduzir este risco nas condições de trabalho em ambientes institucionais. Para este estudo, foram considerados os parâmetros de Dors, et al. (2009), especificados no item 4.7.2, que poderiam ser reproduzidos no preparo doméstico com panela de pressão. A Tabela 23 apresenta as variáveis independentes reais e codificadas, bem como a porcentagem (%) de redução de  $FB_1$  obtidas após aplicação dos tratamentos térmicos citados anteriormente.

Tabela 23: Matriz do DCC com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de Redução de  $FB_1$  (%), para o Tratamento térmico com autoclavagem.

Ensaio	Nível de contaminação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )		Tempo de encharcamento (horas)		Tempo de autoclave (min)		$FB_1$ Redução (%)
	$X_1$		$X_2$		$X_3$		
1	-1	400	-1	4	-1	15	70,2
2	+1	1200	-1	4	-1	15	68,9
3	-1	400	+1	6	-1	15	59,1
4	+1	1200	+1	6	-1	15	66,4
5	-1	400	-1	4	+1	30	64,8
6	+1	1200	-1	4	+1	30	72,2
7	-1	400	+1	6	+1	30	64,2
8	+1	1200	+1	6	+1	30	65,5
9	0	800	0	5	0	22,5	66,4
10	0	800	0	5	0	22,5	71,4
11	0	800	0	5	0	22,5	73,8

Os valores de redução de  $FB_1$  variaram de 59,1 a 73,8% e os pontos centrais apresentaram uma pequena variação ( $CV(\%) = \pm 8,6$ ), indicando uma boa repetibilidade do processo. A maior redução foi obtida quando a amostra foi fortificada com concentração de  $800 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  da micotoxina e submetida a 5 horas de

encharcamento seguidos de 22,5 min de tratamento em autoclave. Dors, et al., (2009), ao estudar a migração de AFB<sub>1</sub> para o endosperma amiláceo de amostras de arroz, utilizando as mesmas condições de encharcamento e autoclave, obteve redução de aproximadamente 30% para AFB<sub>1</sub>. Park e Kim (2006), estudaram a redução de AFB<sub>1</sub> em amostras de arroz submetidas a cozimento sob pressão, e obtiveram valores de redução entre 78 e 88%.

O processo de extrusão, tecnologia utilizada na fabricação de diversos alimentos, a qual combina altas temperaturas e pressão, por curtos intervalos de tempo, também já foi estudado no intuito de reduzir a contaminação por FB<sub>1</sub>. O efeito do processamento sobre os níveis de fumonisinas em flocos de milho foi estudada por De Girolamo, et al., (2001) que relataram que 60-70% da quantidade inicial de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foi perdida durante todo o ciclo de processamento de milho em flocos (extrusão e forneamento).

Estes dados mostram que a contaminação pode ser reduzida pela combinação de temperaturas elevadas e pressão. A partir dos dados obtidos foi possível a análise dos efeitos dos fatores tempo de encharcamento, tempo de autoclavagem e nível de contaminação, bem como suas interações para a redução da FB<sub>1</sub>, para um nível de confiança de 95%.

Os dados de normalidade, resultaram em um valor de p 0,82144, sob significância de 95%, para o teste de Shapiro Wilk, indicando assim que os dados são normais, permitindo a análise de variância dos dados. A análise de variância relativa aos efeitos dos fatores estudados e suas interações quanto à porcentagem de redução da FB<sub>1</sub> está na Tabela 4:

Tabela 24: ANOVA do modelo linear para Redução de FB<sub>1</sub> (%) através de tratamento hidrotérmico com autoclavagem.

Fatores	Efeito Redução	Erro padrão	Valor t	Valor P	Estimativa por intervalo (90%)	
					L. Inf.	L.Sup.
<b>Média</b>	<b>67,54</b>	<b>1,45</b>	<b>46,56</b>	<b>0,000001</b>	<b>63,51</b>	<b>71,56</b>
Nível cont. (X <sub>1</sub> )	3,67	1,70	1,08	0,340767	-2,88	6,56
Tempo ench. (X <sub>2</sub> )	-5,23	1,70	-1,54	0,199333	- 7,33	2,11
Tempo autoc. (X <sub>3</sub> )	0,53	1,70	0,15	0,884817	- 4,46	4,98
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,63	1,70	0,18	0,863159	- 4,41	5,03
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,68	1,70	0,20	0,852382	- 4,38	5,06
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1,58	1,70	0,46	0,667423	- 3,93	5,51

\*dados em negrito correspondem às variáveis significativas.

A partir da análise dos efeitos, pode-se observar que, houve redução de em média 67% da contaminação por FB<sub>1</sub> após aplicação do tratamento térmico, porém dentro da faixa estudada nenhum fator apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) quanto à redução de FB<sub>1</sub> nas amostras de arroz após procedimento de encharcamento e secagem sob pressão em autoclave. As interações dos fatores também não apresentaram efeito significativo sobre a resposta, sob nível de 95% de confiança. Porém o fato de que, o planejamento aplicado implica análise de extração de micotoxinas, agregando várias etapas após aplicação do tratamento térmico estudado, foi considerado um nível de confiança de 80% para as respostas, sendo desta forma, a variável Tempo de encharcamento (X<sub>2</sub>) significativa, com valor de  $p = 0,199333$  e efeito negativo de -5,23%, na variável dependente, indicando que, dentro da faixa estudada, quando o nível passou do valor inferior para o superior, houve diminuição de aproximadamente 5% na redução da micotoxina. A partir deste resultado, os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 25.

Tabela 25: ANOVA do modelo linear para Redução de FB<sub>1</sub> (%) considerando os efeitos significativos.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>
Regressão	54,6	1	54,6	3,88
Resíduo	126,8	9	14,1	
Total	181,4	10		
	R <sup>2</sup> : 0,30102			

SQ= Soma quadrática; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; F<sub>tabelado</sub> (0,05;1;9)=5,12, pvalor = 0,080504; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação

A análise de variância indicou que os dados não são preditivos, uma vez que o valor de F<sub>calculado</sub> para a regressão não foi significativo ( $p < 0,05$ ) e, além disso foi menor que o valor de F<sub>tabelado</sub>. O percentual de variação explicado pelo modelo (R<sup>2</sup>) também não foi adequado, pois apresentou valor de 30%, considerado extremamente baixo. Desta forma, podemos concluir que não houve ajuste do modelo aos dados experimentais, impossibilitando a construção da superfície de resposta e da equação para a redução de FB<sub>1</sub> (%).

Esse fator indica que quando utilizados níveis de fortificação entre 400 e 1200 µg.Kg<sup>-1</sup> com posterior encharcamento em diferentes tempos (4 a 6 horas) seguido de autoclavagem (entre 15 e 30 minutos) os níveis de redução não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) e não podem ser previstos pelo modelo estudado. Isso pode ser devido à micotoxina, no momento do procedimento de encharcamento, migrar para o interior do grão, e com a gelatinização do amido deste cereal durante os processamentos hidrotérmicos, a FB<sub>1</sub> ficar retida no interior do mesmo, o que protege a estrutura da degradação. Assim o arroz contaminado permanece com níveis residuais de FB<sub>1</sub> mesmo se preparado em condições de pressão e temperatura simultaneamente aplicados.

### 5.5.3 Tratamento térmico seco

Como pode ser visto anteriormente, o tratamento hidrotérmico com evaporação apresentou resultado significativo somente para as amostras de arroz parboilizado, cuja a gelatinização já havia ocorrido durante o beneficiamento. No entanto a aplicação de nova autoclavagem (tratamento hidrotérmico com autoclavagem) não

apresentou níveis de redução significativos quando testadas diferentes condições para o processo, indicando que, dentro da faixa estudada, a gelatinização do amido e a pressão do tratamento térmico propiciaram a fixação da toxina na matriz e não a sua redução para o ambiente de preparo.

Com o intuito de verificar a ação da temperatura sobre os níveis de contaminação por  $FB_1$  em amostras de arroz, foi realizado um estudo da estabilidade da micotoxina empregando variação de tempo e temperatura, desta vez sem o emprego da água no processo. As variáveis independentes testadas no estudo de redução de  $FB_1$  através de aplicação de altas temperaturas foram aquelas que apresentaram resultados positivos em relatos da literatura para outros grãos (HUMPF e VOSS, 2004; BULLERMAN e BIANCHINI, 2007) e estão apresentadas na Tabela 26, juntamente com a porcentagem de redução da  $FB_1$  após aplicação do tratamento térmico seco.



Tabela 26: Matriz do DCCR com níveis reais e codificados das variáveis, respostas para Redução de FB<sub>1</sub> (%), valores preditos pelo modelo e desvios relativos para o tratamento térmico seco.

Ensaio	Nível de contaminação (µg.kg <sup>-1</sup> )		Temperatura (°C)		Tempo de aquecimento (min)		Redução (%)	Redução Predita (%)	Desvio Relativo (%)
	X <sub>1</sub>		X <sub>2</sub>		X <sub>3</sub>				
1	-1	200	-1	100	-1	15	31,6	16,9	46,3
2	+1	1000	-1	100	-1	15	51,8	41,2	20,5
3	-1	200	+1	150	-1	15	44	30,6	30,3
4	+1	1000	+1	150	-1	15	66,5	54,9	17,5
5	-1	200	-1	100	+1	30	41,7	32,0	23,1
6	+1	1000	-1	100	+1	30	52,3	56,3	-7,6
7	-1	200	+1	150	+1	30	53,1	45,7	13,8
8	+1	1000	+1	150	+1	30	69,2	69,9	-1,0
9	-1,68	60	0	125	0	22,5	3,4	11,9	-252,0
10	+1,68	1140	0	125	0	22,5	60,5	52,7	12,9
11	0	600	-1,68	50	0	22,5	43,9	38,1	13,3
12	0	600	+1,68	200	0	22,5	66,5	61,1	8,1
13	0	600	0	125	-1,68	5	82,8	36,9	55,4
14	0	600	0	125	+1,68	40	58,2	62,2	-6,9
15	0	600	0	125	0	22,5	43,2	49,6	-14,7
16	0	600	0	125	0	22,5	48	49,6	-3,2
17	0	600	0	125	0	22,5	45,6	49,6	-8,6

Os níveis de redução da FB<sub>1</sub> após aplicação de tratamento térmico seco variaram de 3,4 a 82,8%, sendo que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação (CV(%) = ± 10,5), indicando uma boa repetibilidade do processo. O menor nível de redução de FB<sub>1</sub> foi verificado no experimento 9, que continha o menor nível de contaminação (60 µg.kg<sup>-1</sup>). Em contrapartida, o experimento que obteve o maior índice de redução da micotoxina continha contaminação inicial de 600 µg.kg<sup>-1</sup> e foi exposto a temperatura de 125°C por 5 min..

Os dados experimentais permitiram a análise dos efeitos dos fatores nível de contaminação, temperatura e tempo de aquecimento, bem como suas interações para a redução da FB<sub>1</sub>, para um nível de confiança de 95%.

Através do teste de normalidade dos dados, obteve-se valor de p 0,20124, sob significância de 95%, para o teste de Shapiro Wilk, indicando assim que os dados são

normais, procedendo então análise de variância. A análise de variância relativa aos efeitos dos fatores estudados e suas interações quanto à porcentagem de redução da  $FB_1$  está na Tabela 27:

Tabela 27: ANOVA do modelo quadrático para predição da Redução de  $FB_1$  após tratamento térmico seco.

Fatores	Coef. Regressão	Erro padrão	Valor t (7)	Valor p	Estimativa por intervalo (90%)	
					L. Inf.	L. Sup.
<b>Média</b>	<b>45,71</b>	<b>5,29</b>	<b>8,64</b>	<b>0,00005*</b>	<b>33,20</b>	<b>58,23</b>
<b>Nível cont. L (<math>X_1</math>)</b>	<b>12,11</b>	<b>2,49</b>	<b>4,87</b>	<b>0,001809</b>	<b>6,23</b>	<b>17,99</b>
<b>Nível cont. Q</b>	<b>-5,22</b>	<b>2,74</b>	<b>-1,91</b>	<b>0,098385</b>	<b>11,70</b>	<b>1,26</b>
<b>Temperat. L (<math>X_2</math>)</b>	<b>6,85</b>	<b>2,49</b>	<b>2,75</b>	<b>0,028360</b>	<b>0,97</b>	<b>12,72</b>
Temperatura Q	3,02	2,74	1,10	0,306924	-3,46	9,49
Tempo L ( $X_3$ )	-1,39	2,49	-0,56	0,593492	-7,27	4,49
<b>Tempo Q</b>	<b>8,44</b>	<b>2,74</b>	<b>3,08</b>	<b>0,017787</b>	<b>1,96</b>	<b>14,92</b>
$X_1 X_2$	0,98	3,25	0,30	0,771554	-6,70	8,66
$X_1 X_3$	-2,01	3,25	-0,62	0,556443	-9,68	5,67
$X_2 X_3$	0,16	3,24	0,05	0,963259	-7,52	7,83

\*dados em negrito correspondem às variáveis significativas.

Os fatores nível de contaminação (linear e quadrático), temperatura (linear) e tempo e aquecimento (quadrático) apresentaram valores significativos para a redução da  $FB_1$ . Sendo que o efeito na redução com o emprego destes fatores variou de -5,22 a 12,11%, contribuindo significativamente para a média de nível de redução da micotoxina estudada. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 28.

Tabela 28: ANOVA do modelo quadrático para predição da Redução de FB<sub>1</sub> considerando os efeitos significativos.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>
Regressão	4138,2	4	1034,6	16,35
Resíduo	759,2	12	63,3	
Total	4897,4	16		
	R <sup>2</sup> : 0,84498			

SQ= Soma quadrática; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; F<sub>tabelado (0,05;4;12)</sub>= 3,26, pvalor = 8,42319E-05 ; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação

Considerando-se os parâmetros significativos ( $p \leq 0,1$ ) obteve-se a Equação 6, que representa o modelo quadrático da redução de FB<sub>1</sub> em função das variáveis estudadas.

Equação 6:

$$\% \text{ Redução FB1} = 49,56 + 12,11x_1 - 6,11x_1^2 + 6,85x_2 + 7,55x_3$$

Como o F<sub>calculado</sub> para a regressão foi altamente significativo ( $p=0,00008$ ), sendo 5,0 vezes maior que o F<sub>tabelado</sub>, e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ( $R^2 \approx 85\%$ ), considerando a variabilidade inerente aos processos de descontaminação e extração de micotoxinas, podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir as superfícies de resposta (Figura 10, Figura 11 e Figura 12).

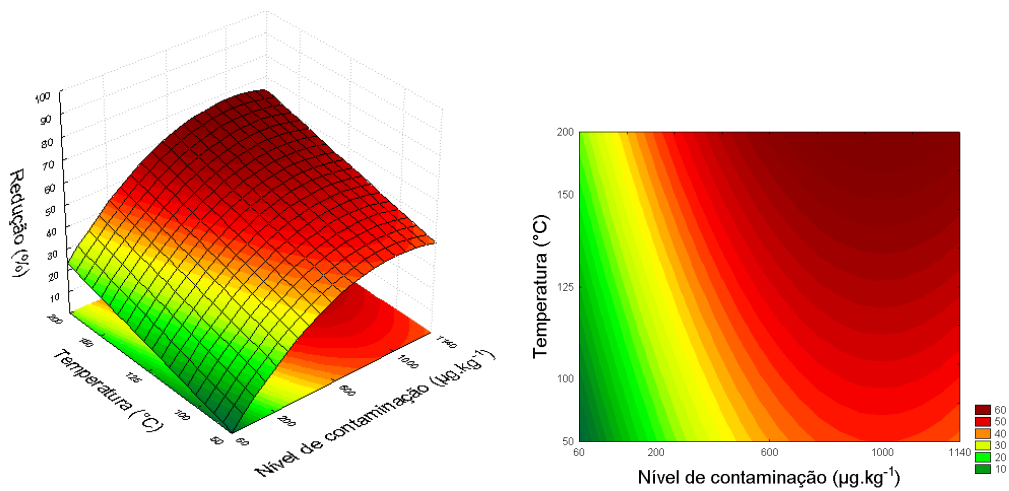


Figura 10: Superfície de resposta e curva de contorno para redução de  $FB_1$  em função do nível de contaminação ( $\mu g.kg^{-1}$ ) e temperatura ( $^{\circ}C$ ).

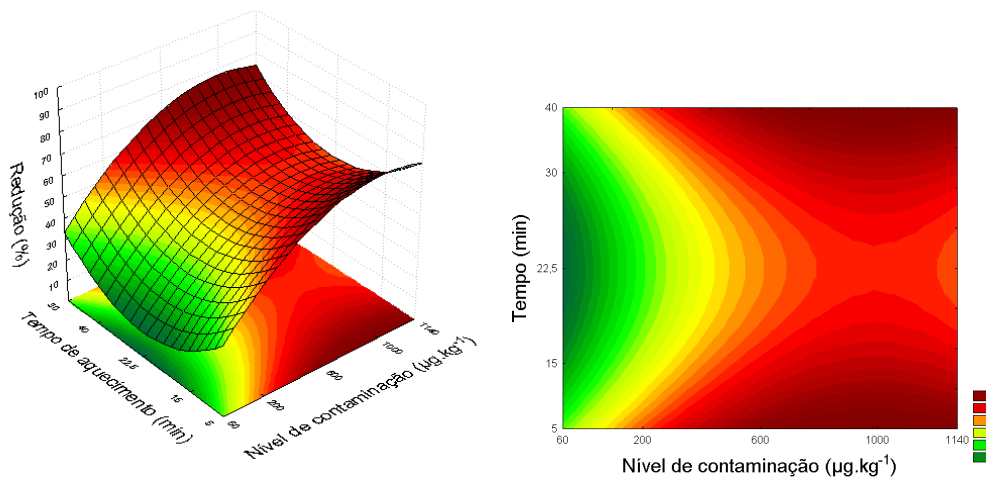


Figura 11: superfície de resposta e curva de contorno para redução de  $FB_1$  em função do nível de contaminação ( $\mu g.kg^{-1}$ ) e tempo de aquecimento (min).

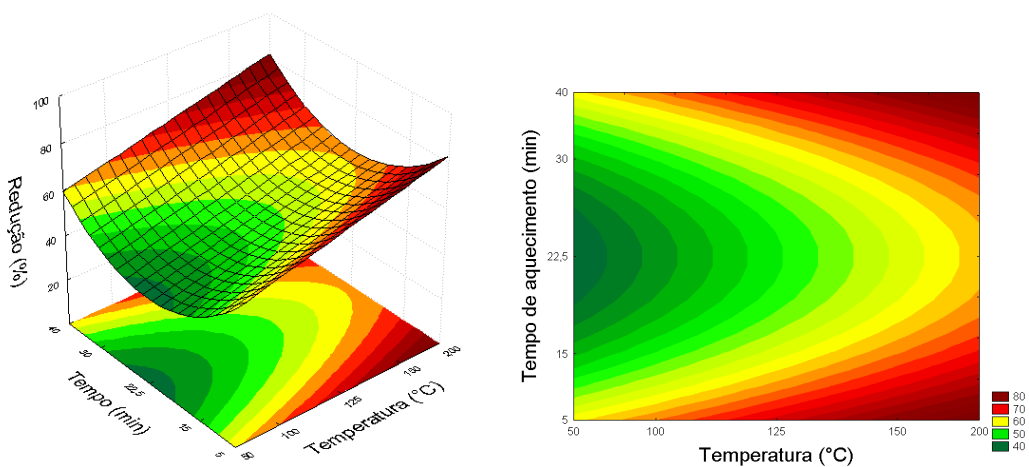


Figura 12: superfície de resposta e curva de contorno para redução de  $FB_1$  em função da temperatura ( $^{\circ}C$ ) e tempo de aquecimento (min).

Há uma região ótima para a maior redução da FB<sub>1</sub> na faixa de combinações de nível de contaminação entre 600 e 1000 µg.Kg<sup>-1</sup> e temperatura entre 150 e 200 °C, confirmando assim o proposto por Scott e Lawrence, (1994), citados anteriormente. Além disto, os desvios relativos (Tabela 26) referentes aos valores preditos pelo modelo para esta faixa de estudo, foram inferiores a 10%, comprovando o ajuste adequado do modelo aos dados experimentais. De acordo com Rodrigues e lemma (2005), a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda, o processo na condição otimizada.

O emprego de altas temperaturas para a redução de FB<sub>1</sub> além de se mostrar eficaz, ainda pode ser combinado com outros processos tecnológicos com o intuito de aumentar os teores de redução. Amra, et al., (2003) estudaram o efeito do processamento de pão, utilizando farinha de milho contaminada, quanto aos níveis de FB<sub>1</sub> e concluíram que, quando combinados altas temperaturas (220 °C/ 20 min) e fermentação química do pão (utilizando hidróxido de cálcio), os níveis de redução alcançaram 90,2%.

A redução de fumonisinas empregando os fatores tempo e temperatura vinha sendo avaliada em diferentes alimentos. Scott e Lawrence (1994) estudaram a redução de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em amostras de farinha de milho, e a aplicação de temperatura de 190°C por 60 min resultaram em 60-80% de redução, e quando aplicado aquecimento de 220 °C houve total redução das micotoxinas na amostra. Temperaturas acima de 175°C são inviáveis para amostras de arroz, uma vez que, haveria a caramelização da amostra, ocasionando perdas nas características sensoriais da mesma, impossibilitando o consumo pós tratamento. Além disso as temperaturas elevadas dificultariam a re-hidratação do arroz durante o processo.

As superfícies de resposta geradas, bem como suas respectivas curvas de contorno, mostram a necessidade de estudos com variação de tempo, pois este fator apresentou efeito positivo quanto a resposta (13,7%), indicando que, dentro da faixa estudada, quando a variável passou do nível inferior para o superior, os níveis de redução aumentaram. Há também a necessidade de estudos de otimização referentes ao tempo de aquecimento, que também apresentou efeito positivo sobre a redução (15%) uma vez que, quando este fator foi exposto às faixas de combinação propostas no estudo, ambos os casos indicaram que maiores níveis de redução foram obtidos ao

expor as amostras aos níveis máximos e mínimos estudados, de 40 e 5 min, respectivamente.

A fim de se obter maiores índices de redução da  $FB_1$ , há também a possibilidade de estudo de outros fatores como adição de agitação (em rpm) nos processos, tratamentos ácidos e alcalinos e utilização de enzimas e/ou micro-organismos, porém estes são pouco aplicáveis ao preparo de arroz quando se emprega as formas comerciais estudadas. Cortez-Rocha (2002), estudaram a redução de  $FB_1$  e  $HFB_1$  no processo de extrusão e cozimento alcalino da farinha de milho utilizando extrusora de rosca dupla (171 °C/ 122 rpm), e obtiveram reduções de  $FB_1$  entre 2 e 99% e valores que variaram de 8 a 67% para a redução de  $HFB_1$ .

Cabe salientar que associado a estes tratamentos, visando reduzir a contaminação, estudos de propriedades nutricionais, funcionais, tecnológicas e sensoriais precisam ser conduzidos.

## 5.6 Caracterização química das amostras

### 5.6.1 Composição química

A Tabela 29 apresenta os resultados da composição química das amostras de arroz cru e após cocção (procedimento similar ao cozimento caseiro), juntamente com o CV% e a significâncias estatísticas das diferenças encontradas.

Tabela 29: Composição química de amostras de arroz cru e com cocção.

Amostra	Umidade /CV (g.100g <sup>-1</sup> )	Cinzas /CV** (g.100g <sup>-1</sup> )	Proteína /CV** (g.100g <sup>-1</sup> )	Lípídeos /CV** (g.100g <sup>-1</sup> )
Amostras cruas				
01	11,8 <sup>b*</sup> ± 3,2	0,40 <sup>d</sup> ± 3,8	8,0 <sup>a</sup> ± 11,4	0,51 <sup>c</sup> ± 15,6
02	11,4 <sup>ab</sup> ± 4,0	0,53 <sup>cde</sup> ± 20,0	8,3 <sup>a</sup> ± 5,9	1,2 <sup>a</sup> ± 13,7
03	11,8 <sup>b</sup> ± 4,2	0,46 <sup>cd</sup> ± 4,2	8,5 <sup>a</sup> ± 10,9	0,3 <sup>c</sup> ± 8,2
04	10,7 <sup>ab</sup> ± 7,6	0,56 <sup>ce</sup> ± 17,6	6,6 <sup>a</sup> ± 1,9	0,4 <sup>c</sup> ± 7,2
05	11,4 <sup>ab</sup> ± 3,9	0,66 <sup>e</sup> ± 5,8	8,8 <sup>a</sup> ± 12,9	0,4 <sup>c</sup> ± 13,6
06	9,8 <sup>a</sup> ± 8,4	0,70 <sup>e</sup> ± 9,1	6,8 <sup>a</sup> ± 12,5	0,5 <sup>c</sup> ± 8,4
07	10,7 <sup>ab</sup> ± 2,3	1,6 <sup>b</sup> ± 1,9	7,5 <sup>a</sup> ± 12,8	3,4 <sup>b</sup> ± 7,0
08	9,9 <sup>ab</sup> ± 2,4	1,5 <sup>b</sup> ± 10,8	7,9 <sup>a</sup> ± 5,9	3,0 <sup>b</sup> ± 3,0
09	10,2 <sup>ab</sup> ± 5,7	1,8 <sup>a</sup> ± 11,3	7,3 <sup>a</sup> ± 1,3	3,2 <sup>b</sup> ± 2,3
Amostras com cocção				
01	68,0 <sup>c</sup> ± 1,8	1,4 <sup>c</sup> ± 6,8	8,6 <sup>a</sup> ± 7,8	0,84 <sup>d</sup> ± 3,2
02	67,8 <sup>c</sup> ± 1,9	1,8 <sup>c</sup> ± 9,1	8,6 <sup>a</sup> ± 2,7	1,3 <sup>cd</sup> ± 7,9
03	65,2 <sup>bc</sup> ± 5,4	2,2 <sup>c</sup> ± 19,9	7,0 <sup>a</sup> ± 13,5	1,1 <sup>cd</sup> ± 18,5
04	67,1 <sup>c</sup> ± 2,3	1,9 <sup>c</sup> ± 2,1	8,1 <sup>a</sup> ± 9,8	0,5 <sup>d</sup> ± 14,8
05	65,0 <sup>bc</sup> ± 1,3	2,4 <sup>bc</sup> ± 6,9	9,0 <sup>a</sup> ± 20,0	1,0 <sup>d</sup> ± 20,1
06	65,6 <sup>bc</sup> ± 0,7	2,5 <sup>bc</sup> ± 2,9	8,4 <sup>a</sup> ± 9,2	2,2 <sup>ab</sup> ± 1,6
07	57,2 <sup>a</sup> ± 4,5	4,0 <sup>a</sup> ± 12,7	8,0 <sup>a</sup> ± 13,2	1,5 <sup>ac</sup> ± 2,7
08	59,4 <sup>ab</sup> ± 4,3	3,9 <sup>a</sup> ± 13,0	6,3 <sup>a</sup> ± 3,	2,3 <sup>b</sup> ± 16,3
09	58,9 <sup>ab</sup> ± 1,3	3,4 <sup>ab</sup> ± 8,1	8,3 <sup>a</sup> ± 5,3	2,2 <sup>b</sup> ± 5,5

\*Letras iguais indicam que não há diferença significativa quanto às diferentes amostras, pela ANOVA seguida de teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada distintamente entre as amostras cruas e com cocção.

\*\* os cálculos foram realizados em base seca.

CV: Coeficiente de Variação

A análise estatística foi realizada distintamente entre as amostras de arroz cru e arroz cozido devido ao fato de que para o processo de cocção das amostras, foram adicionados NaCl, óleo de soja e água nestas, alterando assim sua composição, o que tornaria pouco adequada a comparação.

No arroz cru os valores de umidade não apresentaram diferença significativa entre as diferentes marcas e de mesmo tipo (branco, parboilizado e integral), porém a

amostra número 06 de arroz parboilizado apresentou-se significativamente diferente, com  $9,8 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de umidade, demonstrando variações no processo de secagem após a parboilização. A amostra de arroz branco identificada com número 01 apresentou a maior umidade ( $11,8 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) significativamente diferente das demais ( $p < 0,05$ ), mas ainda aceitável para comercialização. Os teores de umidade em arroz cozido também não diferiram significativamente quanto às marcas, mas pode-se observar que as amostras de arroz integral (07, 08 e 09) apresentaram os menores valores ( $57,2$ ,  $59,4$  e  $58,9 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , respectivamente), demonstrando que este tipo de arroz tem menor absorção de água durante o processo de cocção devido a presença de farelo.

De acordo com a TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, (2006), os teores de umidade para arroz branco e parboilizado devem ser em torno de  $13,2 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  e para arroz integral devem ser de  $12,2 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , enquanto para as amostras de arroz cozido, os valores devem ser em torno de  $69,1$ ,  $68,7$  e  $70,1 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para arroz branco, parboilizado e integral cozido, respectivamente, estando os valores encontrados neste trabalho, ligeiramente abaixo do estipulado, possivelmente para o arroz integral maiores teores de água devessem ser empregados durante o tratamento. Cabe salientar que o tratamento hidrotérmico para cocção é de difícil controle, e variações são esperadas conforme o hábito alimentar de cada região.

Para os teores de cinzas apenas a amostra 09 apresentou diferença significativa das demais amostras de arroz integral, com teor de  $1,8 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , enquanto a amostra de arroz branco (número 01) apresentou o menor teor de cinzas ( $0,4 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), embora não diferisse significativamente das demais amostras de mesmo tipo. Estes resultados estão de acordo com os mencionados em outros trabalhos que avaliaram composição centesimal de arroz (DORS, 2006).

As amostras de arroz cozido obtiveram valores de cinzas relativamente maiores que as de arroz cru, visto que nelas houve a adição de NaCl, para simulação do cozimento doméstico, aumentando assim os teores de cinzas em todos os tipos de arroz. Importante considerar que no arroz integral os teores de cinzas chegaram a  $4 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , o que é prejudicial ao grupo de indivíduos com problemas de controle de pressão arterial.

Os teores de proteína nas amostras de arroz cru não diferiram significativamente entre os tipos e as marcas, apresentando valor mínimo de  $6,6 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  e máximo de  $8,8 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , ambos obtidos em amostras de arroz parboilizado. O mesmo ocorreu nas amostras de arroz cozido, que apresentaram-se



com teores mínimos de  $6,3 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  (arroz integral) e máximo de  $9,0 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  (arroz parboilizado). Os teores mencionados pela TACO (2006) para arroz cru são de  $7,2 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para arroz branco e parboilizado e  $7,3 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para arroz integral porém, a mesma menciona para essas amostras após cocção, teores de  $2,6 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para arroz integral e parboilizado e  $2,5 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para arroz branco, estando os resultados obtidos neste estudo em torno de 5% acima do relatado.

A fração de extrato etéreo foi a que apresentou a maior variação de resultados tanto para as amostras cruas, quanto para as amostras com cocção. A amostra de arroz branco identificada como número 02 apresentou maior valor ( $1,2 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em relação aos demais da ordem de 0,3 e  $0,5 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Os maiores teores foram apresentados nas amostras de arroz integral, onde o valor mínimo foi de  $3,0 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  e máximo de  $3,4 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , estando estes compatíveis com os valores encontrados em estudos anteriores (DORS, 2010).

As amostras de arroz com cocção tiveram acréscimo de óleo de soja para o seu preparo, e por isso, houve maior variação do teor de lipídeos, encontrando-se também valores relativamente maiores quando comparadas amostras de arroz branco e parboilizado, e ao contrário dos minerais o teor de lipídeos incorporado no arroz integral cozido foi menor em todas as amostras.

#### 5.6.2 Teor de tirosina

Os teores de tirosina quantificados nas amostras de arroz cru e pós cocção estão expressos na Tabela 30.

Tabela 30: Teores de tirosina quantificados em amostras de arroz cru e após cocção

<b>Amostra</b>	<b>Arroz</b>	<b>Teor de tirosina* (g.100g<sup>-1</sup>)</b>	<b>CV (%)</b>
<i>Cru**</i>			
01	Branco A	1,4 <sup>b</sup>	3,0
02	Branco B	1,6 <sup>b,d</sup>	13,4
03	Branco C	1,8 <sup>d</sup>	2,7
04	Parboilizado A	1,8 <sup>d</sup>	6,0
05	Parboilizado B	2,0 <sup>a</sup>	6,0
06	Parboilizado C	1,8 <sup>a,d</sup>	7,4
07	Integral A	2,5 <sup>c</sup>	4,9
08	Integral D	2,4 <sup>c</sup>	2,8
09	Integral C	2,4 <sup>c</sup>	8,9
<i>Com cocção**</i>			
01	Branco A	2,2 <sup>b,c</sup>	16,2
02	Branco B	2,2 <sup>b,c</sup>	17,8
03	Branco C	1,8 <sup>c</sup>	17,9
04	Parboilizado A	8,2 <sup>a</sup>	19,5
05	Parboilizado B	4,4 <sup>d</sup>	13,1
06	Parboilizado C	4,9 <sup>d</sup>	6,5
07	Integral A	3,6 <sup>b,d</sup>	14,0
08	Integral D	4,5 <sup>d</sup>	19,4
09	Integral C	4,9 <sup>d</sup>	18,4

\*Letras iguais indicam que não há diferença significativa quanto às diferentes amostras, pela ANOVA seguida de teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada distintamente entre as amostra cruas e sem cocção.

\*\*Cálculos realizados em base seca.

Assim como os demais componentes disponíveis na amostra, os teores de tirosina puderam ser observados em maior prevalência nas amostras de arroz com cocção, porém, nestas amostras houve um índice maior de CV (%) indicando assim a dificuldade em se obter uma amostra homogênea após o tratamento térmico. Dado importante para verificar as afirmativas quando da avaliação dos resultados dos componentes maiores.

Nas amostras de arroz integral cru foram obtidos os maiores teores de tirosina livre, diferindo significativamente das demais, variando de 2,4 a 2,5 g.100g<sup>-1</sup>. Nas amostras de arroz após cocção, os valores significativamente maiores foram obtidos em arroz integral, variando entre 3,6 e 4,9 g.100g<sup>-1</sup>, e parboilizado, sendo que nesta última obteve-se o maior teor de tirosina 8,2 g.100g<sup>-1</sup>, diferindo significativamente de todas as amostras após cocção.

Considerando que, para amostras de arroz os teores de tirosina são em torno de 5,8%, os valores encontrados para as amostras estudadas foram relativamente baixos. Silva, et al., (2007) estudaram os teores de aminoácidos presentes em farinha de quirera de arroz, e obtiveram teores de tirosina em torno de 4,8 g.100g<sup>-1</sup> de amostra, a literatura cita que a diferença entre os constituintes químicos depende de fatores genéticos, tipo de solo, adubação e, principalmente, do tipo de beneficiamento, que implica numa maior ou menor retirada de partes do grão, como pericarpo, tegumento, camada de aleurona e embrião, que contêm as maiores quantidades destes componentes (DENARDI, et al., 2004), justificando os maiores teores encontrados em arroz integral, e, conseqüentemente os teores baixos reportados nas amostras de arroz branco.

### 5.6.3 Digestibilidade protéica *in vitro*

O coeficiente de digestibilidade proteica é definido como a porção de um alimento que, num determinado tempo, é digerida pelas proteases do sistema digestivos de animais. Este valor indica o grau de desdobramento e a proporção de nutrientes que poderão ser disponibilizados biologicamente e, dessa forma permite estimar um índice de qualidade biológica do alimento. Uma vez que os mecanismos das reações enzimáticas *in vitro* processam-se de forma similar *in vivo*, os valores encontrados para o cálculo do coeficiente de digestibilidade refletem satisfatoriamente a eficiência biológica de uma proteína (CHAVAN, et al., 2001; SZE-TAO e SATHE, 2000, SGARBIERI, 1996).

A fim de estudar a disponibilidade das proteínas após a cocção das amostras de arroz (branco, parboilizado e integral), a análise de digestibilidade *in vitro* foi realizada tanto na amostra crua, quanto nesta após a cocção. Os resultados estão expressos na Figura 13:

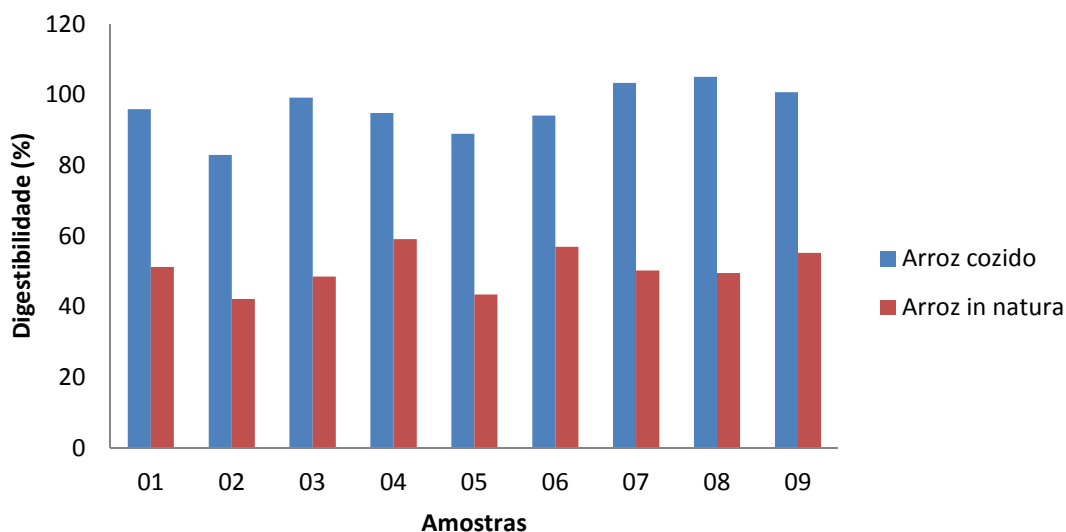


Figura 13: Estimativa da digestibilidade *in vitro* de amostras de arroz cru (barras vermelhas) e arroz com cocção (barras azuis).

Os teores de digestibilidade de proteína *in vitro* para o arroz cru tiveram variação de 42,2 a 59,2% enquanto que as amostras de arroz após cocção obtiveram valores entre 83 e 105 %. Os menores valores para as amostras de arroz cru foram quantificados nas amostras de arroz branco (42,2, 48,5 e 51,3%) enquanto que as taxas mais altas foram observadas no arroz parboilizado, (43,5 a 59,2%). Zhang, et al., (2010) quantificaram a digestibilidade *in vitro* de amostras de cultivares de arroz *indica* e *japônica*, comparando para tanto, a ação combinada de três e quatro enzimas: tripsina, quimotripsina, aminopeptidase e a quarta enzima bacteriana, protease. Não foram observadas diferenças significativas para as diferentes cultivares, com o uso de 3 ou 4 enzimas, obtendo, para as cultivares *indica* e *japônica*, e com o uso de três enzimas, teores de 82,8-85,1% e 82,8-84,3%, respectivamente, e quando utilizadas quatro enzimas na digestão obtiveram valores entre 86,7-89,8% e 87,6-89,4%, respectivamente.

Estudos determinando digestibilidade *in vitro* de proteínas em arroz após cocção são escassos, entretanto estima-se que esta apresente valores superiores quando comparado com a amostra crua, pois o processo de gelatinização do amido durante a cocção e conseqüente entrada de água entre as cadeias facilita a ação das enzimas proteolíticas aumentando a digestibilidade protéica.

A digestibilidade *in vitro* do amido também tem essa característica, sendo que já foram reportados aumento de 35 a 40% na digestibilidade do amido após processos térmicos como cozimento e autoclavagem por exemplo (ROPPA e PREMAVALLI, 2008).

Pagnussat, et al. (2011), estudaram a digestibilidade de proteínas *in vitro* em grãos de arroz, aveia e trigo, afim de verificar a maior disponibilidade da proteína para digestão nestes cereais. Neste estudo o maior valor de digestibilidade foi encontrado para o arroz (85 g.100g<sup>-1</sup>) e o menor para aveia. As três variedades estudadas apresentaram diferentes percentuais de digestibilidade entre si, demonstrando que além de fatores ambientais, os genéticos também afetam o conteúdo protéico e a sua digestibilidade para estes cereais. Esses valores, relativamente maiores que os encontrados neste estudo, são decorrentes do tipo de amostra estudada pois nele foram empregados amostras de arroz *in natura* sem nenhum tipo de beneficiamento, somente descascado, o que significa que estão presentes outras proteínas disponíveis no germe, que naturalmente tendem a ser mais digeríveis que as disponíveis no arroz beneficiado.

Os baixos teores de digestibilidade de proteínas *in vitro* encontrados para as amostras de arroz cru podem ser atribuídos a compostos associados que podem modificar e diminuir a digestibilidade e os carboidratos não digeríveis associados às proteínas presentes nas matrizes vegetais (PEDÓ e SGARBIERI, 1997). Além disso, neste caso as amostras de arroz coletadas sofreram processos de beneficiamento, armazenamento prolongado, além de pertencerem a cultivos distintos que podem ter afetado o resultado de digestibilidade protéica.

Ficou evidenciando a necessidade do estudo da digestibilidade desta micotoxina no organismo humano pois, quando a amostra é submetida a cocção seguido de posterior digestão pode ocorrer acentuado aumento da disponibilidade da micotoxina para absorção.

## 6 Conclusões

O método de QuEChERS para extração de Fumonisina B<sub>1</sub> em amostras de arroz, foi validado, obtendo-se para tanto valores de LOD<sub>m</sub> e LOQ<sub>m</sub> de 30 e 90 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente com linearidade de 30-400 µg.kg<sup>-1</sup>. Os teores de recuperação (%R) do método apresentaram valores entre 60 e 115% para arroz cru, e 70 a 93% para arroz cozido, com CV variando entre 0,25 e 15,0% e 7,4 e 15%, respectivamente. Aplicado a amostras de arroz disponível no comércio foi verificado que 78% deles apresentaram valores positivos para tal contaminação, variando de 30 a 170 µg.kg<sup>-1</sup>, este último valor quantificado em arroz integral.

Dentre os tratamentos térmicos estudados, todos apresentaram eficácia quanto à redução da FB<sub>1</sub> nas amostras de arroz. O tratamento hidrotérmico com evaporação apresentou valores de 67,8 % (arroz branco), aproximadamente 80% (arroz parboilizado) e 70,2% (arroz integral). A autoclavagem resultou em diminuição dos níveis de contaminação, porém nenhuma variável foi significativa dentro da faixa estudada. No entanto, a aplicação do tratamento térmico seco possibilitou a otimização da redução da FB<sub>1</sub> quanto à variável nível de contaminação, sendo que os maiores teores de redução foram observados nas faixas de 600 a 1000 µg.Kg<sup>-1</sup>, sob temperatura entre 150 e 200°C, com desvios relativos abaixo de 10% para os resultados de predição do modelo.

A caracterização química das amostras cruas e após tratamento térmico mostrou que estas apresentaram um aumento médio de 190 % na digestibilidade. Quanto a composição centesimal as variações observadas estão relacionadas com os teores de água, NaCl e óleo de soja absorvidos durante o tratamento térmico.



## 7 Referencias Bibliográficas

AGOSTINI, I.; VIEIRA, L. M. **Arroz – Produção e mercado mundial – Safra 2010/2011. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2010-2011**. Disponível em:[http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese\\_2011/Arroz%20sintese%202011.pdf](http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2011/Arroz%20sintese%202011.pdf); Acesso em : fev. 2012.

ALBERTS, J. F., GELDERBLOM, W. C. A., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., VAN SCHALKWYK, D. J., BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729–1733, 1990.

ALBERTS, J. F., GELDERBLOM, W. C. A., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., VAN SCHALKWYK, D. J., BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729–1733, 1990.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; THIEL, P. G. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme*, 1990. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed., editora Artmed, Porto Alegre, 2005.

ALENCAR, M. L. C. B.; ALVARENGA, M. G. Farelo de arroz: composição química e seu potencial como alimento. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 34, n. 1, p. 95-105, 1991.

AMATO, G. W.; CARVALHO, J. L. V.; SILVEIRA FILHO, S. **Arroz Parboilizado: Tecnologia limpa, produto nobre**. Porto Alegre: Ricardo Lenz Editor, 2002, 240 p.

AMRA, H. A., ENEIN, A. A., RAGAB, A. A., AYESH, A. M. E MOHAMED, M. I. Effect of tortilla processing on fumonisin B1 destruction. **Toxicology Letters**, v. 62, p. 144, 2003.



ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, p. 412–431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, p.412-431, 2003.

AOAC (1997) - Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Edited by CUNNIFF, P. 6<sup>o</sup> ed., 3<sup>rd</sup> rev., 1997.

AOAC (2000) - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the AOAC international**. 15<sup>o</sup> ed., Arlington: AOAC, 1990. p. 1185-1213, 2000.

ATAYDE, D.D. **Microbiota fúngica e determinação de aflatoxinas em cultivar de amendoim plantado em diferentes regiões produtoras no estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, 2009.

AZAMBUJA, I. H. V.; MAGALHÃES Jr., A. M. VERNETTI Jr., F. J. Situação da cultura do arroz no mundo e no Brasil. Série Culturas Arroz. **Comissão de Agricultura, Pecuária e Cooperativismo da Assembléia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul**. Junho, 2002.

BADIALE-FURLONG, E. Manejo operacional para micotoxinas em arroz. In: ELIAS, M. C. LORINI, I. Qualidade de arroz na pós-colheita. **Simpósio Sul-Brasileiro de qualidade do arroz**. Pelotas:Abrapós UFPel, 2005.

BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria, UFSM, 48 p., 2001.

BANDARA, J. M. R. S.; VITHANEGE, A. K.; BEAN, G. A. Occurrence of aflatoxins in parboiled rice in Sri Lanka. **Mycopathologia**, v.116, p. 65-70, 1991.

BEMVENUTI, R. H. **Efeito do emprego de fungicidas no desenvolvimento e manifestação do potencial toxigênico de *Fusarium graminearum* em arroz**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande. 2010.

BERND, L. P. ***Fusarium verticillioides* e fumonisina na cadeia produtiva de milho: modelagem matemática e estratégia de controle**. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação de Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina. 2010.

BINKERD, K. A.; SCOTT, D. H.; EVERSON, R. J.; SULLIVAN, J. M.; ROBINSON, F. R. Fumonisin contamination of the 1991 Indiana corn crop and its effects on horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 653-655, 1993.

BRASIL (1988) – Portaria nº 269 de 17 de novembro de 1988. **Norma de identidade, qualidade, embalagem e apresentação do arroz**. Disponível em: <http://padclassif.tripod.com/padrao/arroz.pdf>. Acesso em: out. 2010.

BRASIL (2003) – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). Acesso em: mai. 2011.

BRASIL (2009a) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6 de 16 de fevereiro de 2009. **Regulamento Técnico do Arroz**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=19480>. Acesso em: out. 2010.

BRASIL (2009b) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Consulta Pública nº 100, de 21 de dezembro de 2009. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas em alimentos.** Disponível em: [http://www.anib.com.br/arquivos/consulta\\_publica\\_n100\\_anvisa.pdf](http://www.anib.com.br/arquivos/consulta_publica_n100_anvisa.pdf). Acesso em: out. 2011.

BRASIL (2011) – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.** Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>. Acesso em: set. 2011.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **Internacional Journal of Food Microbiology**. V. 119, p. 140-146, 2007.

BURGES, L. W.; NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; **Laboratory manual of *Fusarium* studies**. Sidney:Univ. Sidney, 1981. 50p.

CAMARGOS, S. M.; MACHINSKI Jr, M.; VALENTE SOARES, L.M. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B1 e B2 em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p. 71-79, 1999.

CAWOOD, M. E.; GELDERBLOM, W. C. A.; VLEGGaar, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. Isolation of the fumonisin mycotoxins – a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.11, p.1958-1962, 1991.

CETIN, Y.; BULLERMAN, L. B. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 755–764, 2005.

CHAVAN, U. D.; MICKENZIE, D. B.; SHAHIDI, F. Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*). **Food Chemistry**, v. 74, p. 177-187, 2001.

CHU, F.S. E LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisinB1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 847-852, 1994.

CINTRA, R. M. G. C.; MAGALHÃES, C. O.; GARCIA, R. R.; MELLO, R.; PADILHA, A.; KUSAI, C.; CAETANO, L. Avaliação da qualidade da proteína de arroz e feijão e de dieta da região sudeste do Brasil. **Alimentos e Nutrição.**, v. 18, n. 3, p. 283-289, jul./set. 2007.

CIRILLO, T., RITIENI, A., GALVANO, F. E COCCHIERI, R.A. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs. **Food Additives and Contaminants.**, v. 20, n. 6, p. 566-571, 2003.

COELHO, C. S.; BADIALE-FURLONG, E.; ALMEIDA, T. L. Migração de Micotoxinas durante o processo de parboilização do arroz. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 2, n. 2, p. 43 - 50, 1999.

COELHO, C. S. P. **Migração de Micotoxinas Durante o Processo de Parboilização do Arroz**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, 1998.

CORTEZ-ROCHA, M. O., TRIGO-STOCKLI, D. M., WETZEL, D. L., REED, C. R., Effect of extrusion processing on fumonisin B1 and hydrolyzed fumonisin B1 in contaminated alkali-cooked corn. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 69, p. 471 – 478, 2002.

COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A uniform, objective, and adaptative system for expressing rice development. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 436-443, 2000.

COUTINHO, L.; LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida capilar: 2. Alargamento das bandas por efeitos extracoluna. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, pg 185-197, 2011.

CRUZ, J. V. S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos a base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, estado de São Paulo**. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. 2010.

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. Animal **Feed Science and Technology**, v. 69, p.155-166, 1997.

DE GIROLAMO, A.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Effect of processing on fumonisin concentration in corn flakes. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 701 –705, 2001.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q. B. ; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DELLA, V. P.; KYHN, I.; HOTZA, D. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**, V. 24, n. 6, pag. 778-782, 2001.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P.; STORCK, C. R.; NÖRNBERG, J. L. Composição mineral de cultivares de arroz integral, parboilizado e branco. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 125-130, 2004

DESMARCHELIER, J. M. O.; TELLA, P.; GREMAUD, W. S.; MOTTIER, P. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Analysis of 17

Mycotoxins in Cereals by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7510-7519, 2010.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicoses em domestic animals: a review. **Vet. Human Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 548-555, 1994.

DILKIN, P., ZORZETE, P., MALLMANN, C. A., GOMES, J. D., UTIYAMA, C. E., OETTING, L. L., CORREA, B., Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 41, p. 1345–1353, 2003.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; DVORAK, T. J. Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 622-627, 1999.

DORS, G. C. **Uso de fungicida no cultivo de arroz irrigado e seus efeitos na composição físico-química, bioquímica e micotoxicológica dos derivados do grão**. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande. 2010.

DORS, G. C. **Arroz parboilizado: situação micotoxicológica e suas relações com as condições de parboilização**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande. 2006.

DORS, G. C.; PINTO, L. A. A.; BADIALE-FURLONG, E. Migration of mycotoxins into rice starchy endosperm during the parboiling Process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 433 - 437, 2009.

DORS, G. C.; BIERHALS, V. S.; BADIALE-FURLONG, E. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31 n.1, p. 172-177, jan./mar. 2011.

EMBRAPA (2005) - Embrapa Clima Temperado. **Cultivo de arroz irrigado no Brasil – Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap01.htm>, Acesso em: Fev. 2012.

EMBRAPA (2010) **Arroz: mercado, comercialização e consumo**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: set. 2010.

FANDOHANA, P.; ZOUMENOUNB, D.; HOUNHOUIGANB, D. J.; MARASASC, W. F. O.; WINGFIELD, M. J.; HELLE, K. Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 249– 259, 2005.

FAO (2003) – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Roma, 2004. Disponível em: <http://fao.org/docrep/007/y5499e00.HTM>. Acesso em: nov. 2010.

FAO (2006) – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Produção mundial de grãos e arroz**. Disponível em: [http://fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/docrep/007/j3877e/j3877e/j3877e05.htm](http://fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/j3877e/j3877e/j3877e05.htm). Acesso em: nov. 2010.

FAO/WHO (2001). **Fifty-sixth meeting, Geneva, Summary and conclusions**. Disponível em: <http://www.who.int/pcs/jecfa/summary56.pdf>. Acesso em: nov. 2011.

FEDDERN, V.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, Out./Dez. 2007.

FURLONG, E.B.; NUNES, I. L.; MAGAGNI, G. “Arroz comercializado na região sul do Brasil: Aspectos Micotoxicológicos e Microscópicos”. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

GAMANYA, R.; SIBANDA, L. Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B<sub>1</sub> in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**. v. 71, p. 145-149, 2001.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D.; Divulgação Técnica: Análise de Micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, v. 63, p. 15-19, jan./dez., 2001.

GRAINS – **Partes constituintes do grão de arroz**. Disponível em: <http://students.ed.uiuc.edu/vpozen/files/grains%20and%20pasta/grains.ppt>. Acesso em: out. 2010.

HACKBART, H. C. S.; PRIETTO, L.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Simultaneous Extraction and Detection of Ochratoxin A and Citrinin in Rice. J. **Brazilian Chemical Society**, (aceito), 2011.

HACKBART, H.C.S.; BADIALE-FURLONG, E. **Ocratoxina A e Citrinina em Arroz: Um Estudo de Metodologia e Ocorrência**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental. Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

HEIDTMANN, R. B. ; HACKBART, H. C. S. ; SOUZA, M. M. ; DORS, G. C. ; FAGUNDES, C. A. ; BADIALE-FURLONG, E. . Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS E HPLC/UV-FL. **Química Nova** (aceito), 2012a.

HEIDTMANN, R. B. ; MENDES, G. L. ; SCAGLIONI, P. T. ; BADIALE-FURLONG, E. ; SOUZA-SOARES, L. A. . Biochemistry and metabolism of mycotoxins A Review. **African Journal of Food Science**, v. 5, p. 861-869, 2012b.

HOSENEY, C. R. **Princípios de ciência y tecnologia de los cereals**. Ed. Acribia. Zaragoza, Espanha, 1991.



HUMPF, H. U.; VOSS, K. A., Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins, **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 48, p. 225–269, 2004.

HUMPF, H. U.; VOSS, K. A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition & Food Research**; v. 48, p. 255-269, 2004.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**; v. 167, n.2; p. 101-134, 2001.

IBGE (2008) – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200803comentarios.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200803comentarios.pdf). Acesso em: out. 2010.

IBGE (2011) – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Em janeiro, IBGE prevê safra de grãos 1,8% menor que a de 2010.** Disponível em: [http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1819&id\\_pagina=1&titulo=Em-janeiro,-IBGE-preve-safra-de-graos-1,8%-menor-que-a-de-2010](http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1819&id_pagina=1&titulo=Em-janeiro,-IBGE-preve-safra-de-graos-1,8%-menor-que-a-de-2010). Acesso em: dez. 2011.

ICH – International Conference on Harmonisation (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INMETRO (2003) – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, 2003.**

IRGA (2011) – Instituto Rio Grandense de Arroz. **Conab divulga resultados da produção brasileira de arroz. 09/08/2011.** Disponível em <http://www.irga.rs.gov.br/index.php?principal=1&secao=1&id=2925>. Acesso em: fev. 2012.

JACKSON, M. A.; BENNET, G. A. Production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2296-2298, 1990.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed., editora Artmed, Porto Alegre, 2005, 711 p.

JORNAL Oficial da União Europeia (2006) - **Regulamento (CE) n. 856/2005 da comissão de 6 de Junho de 2005 no que diz respeito às toxinas Fusarium**. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:143:0003:0008:PT:PDF>. Acesso em: nov. 2011.

JULIANO, B. O.; BECHTEL, D. B. **The rice grain and its gross composition**. In: JULIANO, B. O. (Ed.). Rice: chemistry and technology. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1985. Cap. 2, p. 17-57.

JULIANO, B. O. **Rice in human nutrition**. Rome: FAO, 1993. 168 p. Disponível em: <http://www.fao.org/inpho/content/documents//vlibrary/t0567e/T0567E00.htm>. Acesso em: Jun. 2010.

KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess desing and optimization. **Process Biochemistry**, v.35, p.539-550, 2000.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B<sub>1</sub>, aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 516-521, jul.-set. 2006.

KENNEDY, G., BURLINGAME, B.; NGUYEN, N. Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. **International Rice Commission Newsletter**, v.51, p.33-42, 2002.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on Rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, v. 89, n. 04, p 589-596, 2003.

KIESSLING, K. H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure & Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 327-338, 1986.

KIM, E. K., SCOTT, P. M.; LAU, B. P.Y. Hidden fumonisin in corn-flakes. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 161-169, 2003.

KRUBE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, p. 75–80, 2009.

LAM-SÁNCHEZ, A.; SANTOS, J. E.; TAKAMURA, K.; TREPTOW, R. M. O.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. Estudos nutricionais com arroz (*Oryza sativa L.*) . **Alimentos e Nutrição** , São Paulo, v.5, pg. 37-48, 1994.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2ª ed. Curitiba: ed. do autor, 1997.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias Analíticas para Determinação das Fumonisinias em Milho e Alimentos à Base de Milho. **Química Nova.**, vol. 29, n.2, 293-299, 2006.

LOMBAERT, G. A.; PELLAERS, P.; ROSCOE, V.; MANKOTIA, M.; NEIL, R.; SCOTT, P. M. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 494–504, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHINSKI JUNIOR, M. **Micotoxinas em cultivares de milho (*Zea maiz L.*) e em produtos de milho: avaliação da ocorrência e de fatores que contribuem a**

**produção no campo.** Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2000.

MALMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P. Fumonisin B<sub>1</sub> levels in cereal and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 41-45, 2001.

MARCHINI, J. S.; RODRIGUES, M. M. P.; CUNHA, S. F. C.; FAUSTO, M. A.; VANNUCCHII, H.; OLIVEIRA, J. E. D. Cálculos das recomendações de ingestão protéica: aplicação à pré-escolar, escolar e adulto utilizando alimentos brasileiros. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, p. 146-152, 1994.

MARSHALL, W. E.; WADSWORTH, J. I. **Rice Science and Technology**. New Orleans: Marcel Dekker, 1993. 470p.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, Campina Grande, 2010.

MISSIONÁRIA, F. **Produção mundial de arroz surpreende**. Planeta arroz. Fevereiro, 2012. Disponível em: [http://www.planetaarroz.com.br/site/noticias\\_detalhe.php?idNoticia=10483](http://www.planetaarroz.com.br/site/noticias_detalhe.php?idNoticia=10483). Acesso em: fev. de 2012.

MOLINIÉ, A.; FAUCET, V.; CASTEGNARO, M. E.; PFOHL-LESKOWICZ, A. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B<sub>1</sub>: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. **Food Chemistry**, v. 92, p. 391-400, 2005.

MOLLER, T. E.; GUSTAVSSON, H. F. Determination of Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Various Maize Products by a Combined SAX+C<sub>18</sub> Column and Immunoaffinity Column. **Journal of AOAC International**, v. 83, n.1, p. 99-103, 2000.

MOSS, M. O. Mycotoxin review – 2. *Fusarium*. **Mycologist**, v.16, p. 158-161, 2002.

MYHARA, M.; AKIYAMA, H.; TOYODA, M.; SAITO, Y. New procedure for fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn products by ion pair chromatography with o-phthaldialdeyde postcolumn derivatization and fluorometric detection. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 842-847, 1996.

NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D. Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species, 1992. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed., editora Artmed, Porto Alegre, 2005.

NESS, A. R. R. **Qualidade do arroz em casca, seco e armazenado em silos metálicos com aeração controlada**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, 1998.

NORRED, W. P.; VOSS, K. A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal câncer. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 522-527, 1994.

NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz Comercializado na Região Sul do Brasil: Aspectos Micotoxicológicos e Microscópicos. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 190-194, maio-ago, 2003

ONO, E. Y. S.; KAWAMURA, O.; ONO, M. A.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brasil. **Food and Agricultural Immunology**, v. 12, p. 5-14, 2000.

OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the Cereal Industry - A Review. **Journal of Food Technology**, v. 17, p. 1-9, 1982.

PAGNUSSATT, F. A.; GARDA-BUFFON, J.; GUTKOSKI, L. C.; BADIALE-FURLONG, E. . Propriedade das frações protéicas de cultivares de arroz, aveia e trigo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, p. X-X, 2011.

PARK, J. W., KIM, Y. B. Effect of pressure cooking on aflatoxin B1 in rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2431–2435, 2006.

PARK, J. W.; LEE, C.; KIM, Y. B. Fate of aflatoxin B1 during the cooking of Korean polished rice. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 7, p. 1431–1434, 2005.

PEDÓ, I.; SGARBIERI, V. C. Caracterização química de cultivares de aveia (*Avena sativa* L). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 78-83, 1997.

PIÑEIRO, M. S.; SILVA, G. E.; SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A.; STACK, M. E. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 4, p. 825-828, 1997.

PITT J. L.; HOCKING A. D.; **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic & Professional. 175. 1997.

PLATTNER, R. D.; HPLC/MS Analysis of *Fusarium* Mycotoxins, Fumonisin and Deoxynivalenol. **Natural Toxins**, v. 7, p. 365-370, 1999.

POLING, S. M.; PLATTNER, R.D. Rapid purification of fumonisin and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, 2344-2349, 1999.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JÚNIOR, I. FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisin. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

RAMOS, R. **USDA prevê safra mundial 2011/12 em 461,4 milhões de toneladas de arroz beneficiado.** Disponível em:

[http://www.planetaarroz.com/site/noticias\\_detalhe.php?idNoticia=10183](http://www.planetaarroz.com/site/noticias_detalhe.php?idNoticia=10183). Acesso em: dez. 2011.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; VAN SCHALKWYK, D. J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn related to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 353- 357, 1992.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos**. 1ª ed. Campinas - SP, 2005.

RODRIGUES, S. A., CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G. Otimização de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 780-786, 2011.

ROOPA, S.; K. S. PREMAVALLI. Effect of processing on starch fractions in different varieties of finger millet. **Food Chemistry**, v. 106, p. 875 - 882, 2008.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARTINS, I. R. ELIAS, M. C. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 118-125, 2006.

SAIKUSA, T.; HORINO, T.; MORI, Y. Distribution of free amino acids in the Rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1122-1125, 1994.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. **Postharvest Biotechnology of Cereals**. Florida: CRC Press, 1999.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, São Paulo, v. 2, n. 1, jan/abril, 2000.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A.; J. Analysis of beer for fumonisins. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1379-1382, 1995.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A. Liquid chromatography determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. **Journal of AOAC International**, v. 75, p. 829, 1992.

SCUSSEL, V. M.; MANFIO, D.; SOUZA, K. K. Micotoxinas versus Rações à Base de Cereais e Leguminosas. **Revista Pet Food**, ed.09, ano 2, p. 20-24, 2010.

SEEFELDER, W.; KNECHT, A.; HUMPT, H. U. Bound fumonisin B<sub>1</sub>: analysis of fumonisin-B<sub>1</sub> glyco and amino acid conjugates by Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5567-5573, 2003.

SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisin in mouldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1331-1334, 1999.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos Proteicos: Propriedades, coesadações, modificações**. São Paulo, SP: Livraria Varela, 1996, 517p.

SHEPARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisins mycotoxins **Journal of Chromatographi**, v. 185, n. 1, p.31-39, 1998.

SHEPARD, G. S., LEGGOTT, N. L., STOCKENSTROM, S., SOMDYALA, N. I. M., MARASAS, W. F. O., Preparation of South Africanmaize porridge: Effect on fumonisin mycotoxin levels. **South African Journal of Science**, 98, 393 –396, 2002.

SHEPARD, G.S. **Methods in Molecular Biology**, v. 157: Mycotoxin Protocols. Edited by: M.W. Trucksess and A.E. Pohland. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2001.



SHEPHARD, G. S.; MARASAS, W. F. O.; LEGGOTT, N. L.; YASDANPANA, H.; RAHIMIAN, H.; SAFAVI, N. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1860-1864, 2000.

SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; AIROLDI, C. New generation of setrically protected C<sub>18</sub> stationary phases containing embedded urea groups for use in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 127-138, 2003.

SILVA, J. O.; CÂNDIDO, L. M. B.; NOVELLO, D.; MACHADO, C. Ocorrência De Aflatoxinas Em Arroz Consumido Por Militares Do Exército Brasileiro Por Cromatografia Em Camada Delgada E Cromatografia Líquida De Alta Eficiência. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1238-1244, jul./ago., 2006.

SILVA, R. F.; ASCHERI, J. L. R.; PEREIRA, R. G. F. A. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 325-330, jul./set. 2007

SLOAN, A. E. Wholly grain. **Food Technology**, v. 59, n. 6, p. 16, 2005.

SMITH, T. K.; SEDDON, I. R. Toxicological Synergism between Fusarium Mycotoxins in Feeds, 2007. Disponível em: <http://en.engormix.com/MA-pig-industry/nutrition/articles/toxicological-synergism-between-fusarium-t730/p0.htm>. Acesso em: nov. 2010.

SORIANO, J. M. E DRAGACCI, S. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 367-374, 2004.

STARK, A. A. Mutagenicity and carcinogenicity of mycotoxins: DNA binding as a possible mode of action. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed., editora Artmed, Porto Alegre, 2005.

STORCK, C. R.; **Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141-158, 1998.

SYDENHAM, E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPARD, G. S.; THIEL, P. G.; HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 994-997, 1992.

SYDENHAM, E. W.; GELDERBLOM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 285-290, 1990.

SZE-TAO, K. W. C. e SATHE, S. K. F Functional properties and *in vitro* digestibility of almond (*Prunus dulcis L.*) protein isolate. **Food Chemistry**, v. 69, p. 153-160, 2000.

TACO - **Tabela brasileira de composição de alimentos** / NEPA-UNICAMP. Versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.

TANIWAKI, M.; SILVA, N. **Fungos Deterioradores de Alimentos – Ocorrência e Detecção**. ITAL: Campinas, 1996. 74p.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C. Fases estacionárias para cromatografias líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Introducción a la Microbiología. Zaragoza** (España): Acribia, 1993. 792p.

TURNER, P. C., NIKIEMA, P. E WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v. 443, p. 81-93, 1999.

USHA, C. M.; PATKAR, K. L.; SHETTY, H. S.; KENEDDY, R., LACEY, J. Fungal colonization and mycotoxin contamination of developing rice grain. **Mycological Research**, v. 97, n. 7, p. 795-798, 1993.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L. V. Qualidade Tecnológica do Arroz. In: VIERIA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P.A. A Cultura de Arroz no Brasil. Embrapa Arroz e Feijão. Goiás, 1999.

VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; DE GIROLAMO, A. Determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, p.1828-1837, 2001.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p.1184-1192, jul, 2008.

WHO. (2002). **Evaluation of certain mycotoxins in food**. Report of the 56th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO technic report series 906. Geneva, Switzerland: WHO. 2002.

WHO-IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 56, p. 245; 445, 1993.

WILLIAMS L. D; MEREDITH F. I; RILEY R. T. Fumonisin-ortho-phthalaldehyde derivative is stabilized at low temperature. **Journal of Chromatography B**, v. 806, p. 311–314, 2004.

WILLIAMS, L. D.; BACON, C. W.; MEREDITH, F. I.; FRANZLUEBBERS, A. J.; WYATT, R. D.; SMITH, M. A.; RILEY, R. D. Leaching and binding of fumonisins in soil microcosms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 685-690, 2003.

WU, F. Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. **Environmental Science e Technology**, v. 38, p. 4049-4055, 2004.

ZHANG W.; LIU, S.; WANG, Y.; ZHENG, L.; LIU, F.; HAN, X.; REN, Y.; LONG, Q.; ZHAO, Z.; JIANG, L.; WAN J. A study of the in vitro protein digestibility of indica and japonica cultivars. **Food Chemistry**, v. 122, 1199–1204, 2010.

ZHOU, Z. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food and Technology**, v. 37, p. 849-868, 2002.