



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

**OPERAÇÕES DE PÓS-COLHEITA DO ARROZ E SEUS IMPACTOS NOS NÍVEIS  
DE AFLATOXINAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub>**

LUCIANA PRIETTO

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ELIANA BADIALE FURLONG

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2014

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

**OPERAÇÕES DE PÓS-COLHEITA DO ARROZ E SEUS IMPACTOS NOS NÍVEIS  
DE AFLATOXINAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub>**

LUCIANA PRIETTO

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos 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

2014

**FICHA CATALOGRÁFICA**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Luciana Prietto e aprovada em 27 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Badiale Furlong  
(Universidade Federal do Rio Grande – FURG)

---

Cristiano Gautério Schmidt  
(Universidade Federal do Rio Grande - FURG)

---

Giniani Carla Dors  
(IFC – Campus Concórdia)

---

Maria Isabel Queiroz  
(Universidade Federal do Rio Grande - FURG)

## **AGRADECIMENTOS**

### **À Deus**

Por ter me dado saúde por todos esses anos, ter me colocado no meio de uma família e amigos maravilhosos, e por sempre me acompanhar.

### **Aos meus pais**

Que sempre foram meus grandes referenciais. Obrigada pelo carinho, amor, apoio, compreensão, motivação, paciência e confiança. Amo muito vocês!

### **Ao Leonardo**

Pelo amor, compreensão e companheirismo. Meu incentivador, com quem espero passar o resto dos meus dias.

### **Aos meus familiares**

Pelo carinho, paciência e apoio concedido.

### **À minha orientadora Eliana Badiale Furlong**

Pela incansável orientação desde o início da graduação, por acreditar e confiar na minha capacidade, pela amizade, e sobre tudo pela paciência em todos os momentos.

Muito obrigada!!!

### **À FURG e a CAPES**

Por proporcionar o desenvolvimento deste trabalho.

### **À Renata**

Uma grande amiga! Pessoa especial que vou sempre agradecer por ter tido a oportunidade de conhecer e conviver pelo menos nesse pouco tempo de mestrado. Espero que nossa amizade seja eterna e que possamos nos encontrar no futuro!!!

### **À Adriana**

Obrigada pelos bons momentos, pelas divertidas conversas, e saibas que sempre poderás contar comigo.

### **À Paola, Rosana, Cláudia**

Por toda ajuda experimental, pela amizade e carinho. Muito obrigada!!!

### **À Helen, Michele, Cristiano**

Mesmo não estando mais no laboratório sempre me ajudaram no que precisei, e também por saber que posso contar com vocês.

### **À Jesus**

Pela disponibilidade, amizade, e pelas conversas agradáveis.

**À todos os integrantes do laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos**  
Pela disposição todas as vezes que precisei, e pela amizade. Em especial a Lidi, Anelise,

Murieli, Carolina, Raquel....

**Aos professores do programa da Pós-Graduação**

Pelos ensinamentos desde a graduação e amizade.

**Islanda e Jéssica**

Pelo suporte técnico e disponibilidade.

**Ao IRGA**

Pelo fornecimento das amostras em especial ao Volnei e Fagundes pela amizade.

**À todos aquele que de alguma forma contribuíram com este trabalho!!!**

## RESUMO

Considerando que o arroz é um alimento consumido diariamente pela população e que existem vários relatos de contaminação com micotoxinas, torna-se importante identificar ao longo da cadeia produtiva os pontos que influenciam o teor destes compostos em alimentos. Neste trabalho foi padronizado um método para extração de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (AFLAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) em arroz e suas frações e ainda avaliada a ocorrência delas em amostras submetidas a diferentes condições de secagem, armazenamento e cozimento. O arroz foi cultivado, colhido e submetido a secagem estacionária, intermitente e combinada e após foi armazenado em silos de concreto no Instituto Rio Grandense do Arroz, unidade Cachoeirinha-RS. Os grãos foram secos até teores de umidade entre 12 e 13%, armazenados em intervalos de 90 dias, coletadas as amostras em diferentes pontos do silo e beneficiado tomando as frações endosperma, farelo e casca para estudo da contaminação. Para isto o método de Soares; Rodrigues-Amaya (1969) foi miniaturizado para extração simultânea das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> e validado para quantificação delas por cromatografia de camada delgada de alta performance (HPTLC) e líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FL). A influência do tratamento térmico em micro-ondas, autoclave e chapa elétrica, sobre o teor de aflatoxinas em amostras de arroz polido também foi avaliada. Os limites de quantificação do método foram 2; 0,6; 1,4 e 1 µg/kg, respectivamente para AFLAs B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em HPTLC e de 0,3 µg/kg para as AFLAs B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> e 0,07 µg/kg de AFLAs B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>, em HPLC-FL. O percentual de recuperações ficou entre 51 e 96% para AFLAB<sub>1</sub> em casca e AFLAB<sub>2</sub> no endosperma, respectivamente, em HPTLC. Em HPLC-FL variou entre 56% (AFLAB<sub>1</sub> na casca) e 100% (AFLAG<sub>2</sub> no farelo). Quando avaliado o teor de aflatoxinas nas frações das amostras de arroz armazenadas, as maiores concentrações foram observadas após 6 meses naquelas provenientes de grãos submetidos a secagem estacionária. A fração do arroz mais contaminada foi o farelo com 28,2 µg/kg, seguido de casca com 3,9 µg/kg e endosperma com 1,4 µg/kg para o somatório das AFLAs B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>. Com relação ao tratamento térmico a maior degradação foi observada quando o arroz foi cozido em micro-ondas (média de 80%), seguido do tratamento em chapa elétrica com variação entre 13 e 57% e autoclave com degradação inferior a 30%. Práticas pós-colheita e condições de preparo afetam os níveis de exposição do consumidor as aflatoxinas presentes em arroz.

Palavras-chave: Fungos, micotoxinas, secagem, armazenamento e cocção.

## ABSTRACT

Whereas rice is a food consumed daily by the population and there are several reports of mycotoxin contamination, it becomes important to identify along the production chain points that influence the content of these compounds in foods. This work was standardized a method for the extraction of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> (AFLAs B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>) in rice and its fractions and further evaluated the occurrence of them in samples subjected to different conditions of drying, storage and cooking. The rice was grown, harvested and subjected to stationary, flashing and after was combined and stored in concrete silos in Rio Grandense Institute of Rice, Unit Cachoeirinha RS. The grains were dried to a moisture content between 12 and 13 %, stored at intervals of 90 days, the samples collected at different points of the silo and enjoyed taking the endosperm fractions, bran and husk to study the contamination. For this purpose the method of Soares; Rodriguez - Amaya (1969) has been miniaturized for simultaneous extraction of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> and validated for quantification of them by thin layer chromatography high-performance (HPTLC) and high performance liquid detector flowering (HPLC-FL). The influence of thermal treatment of microwave, autoclave and electric griddle, on the aflatoxin content in milled rice samples was also evaluated. The limits of quantification of the method were 2; 0.6; 1.4 and 1 µg/kg, respectively, for Aflas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> on HPTLC and 0.3 µg/kg for Aflas B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> and 0.07 µg/kg of AFLAs B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub> in HPLC-FL. The percentage of recoveries was between 51 and 96% for AFLAB<sub>1</sub> and AFLAB<sub>2</sub> in shell and endosperm, respectively, in HPTLC. HPLC-FL varied from 56% (in the peel AFLAB<sub>1</sub>) and 100 % (AFLAG<sub>2</sub> the bran). When evaluated the aflatoxin content in fractions of rice samples stored, the highest concentrations were observed after 6 months from those grains subjected to stationary drying. The fraction of rice was more contaminated with 28.2 µg/kg was bran, followed by shell with 3.9 µg/kg and endosperm with 1.4 µg/kg for the sum of Aflas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>. With respect to heat treatment at higher degradation was observed when the rice was cooked in a microwave (mean 80%), followed by treatment with a hot plate at varying between 13 and 57% autoclave and less than 30% degradation. Postharvest practices and preparation conditions affect levels of consumer exposure aflatoxins in rice.

Keywords: Fungi, mycotoxins, drying, storage and cooking.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 2.1</b> - Composição centesimal média (% matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido.....	8
<b>Tabela 2.2</b> - Limites máximos tolerados para micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) em arroz dispostos na RDC n° 7 de 2011.....	20
<b>Tabela 2.3</b> - Legislação internacional para aflatoxinas em alimentos (AFLAB <sub>1</sub> +AFLAB <sub>2</sub> +AFLAG <sub>1</sub> +AFLAG <sub>2</sub> ) em diferentes países.....	21
<b>Tabela 3.1</b> - Curvas analíticas, coeficientes de correlação e linearidade para cada aflatoxina em HPLC-FL e HPTLC.....	34
<b>Tabela 3.2</b> - Limite de detecção e quantificação dos sistemas cromatográfico e do método.....	35
<b>Tabela 3.3</b> - Ensaio de precisão dos instrumentos cromatográficos.....	36
<b>Tabela 3.4</b> - Conteúdo de aflatoxinas em arroz e suas frações ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).....	38
<b>Tabela 4.1</b> - Aflatoxinas nas frações de arroz.....	51
<b>Tabela 5.1</b> - Tratamentos térmicos dos padrões das AFLAB <sub>1</sub> , AFLAB <sub>2</sub> , AFLAG <sub>1</sub> e AFLAG <sub>2</sub> .....	67
<b>Tabela 5.2</b> - Degradação de padrões de aflatoxinas sob diferentes tratamentos térmicos.....	69

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 2.1</b> - Estrutura do grão de arroz.....	7
<b>Figura 2.2</b> - Estruturas químicas das aflatoxinas.....	15
<b>Figura 3.1</b> - Média das recuperações das aflatoxinas determinadas em HPLC-FL e HPTLC.....	37
<b>Figura 4.1</b> - Esquema das etapas de processamento do arroz.....	48
<b>Figura 4.2</b> - Contaminação total com aflatoxinas.....	53
<b>Figura 4.3</b> - Glicosamina das diferentes frações do grãos provenientes de diferentes sistemas de secagens.....	56
<b>Figura 5.1</b> - Influência do tipo de cocção do arroz na degradação de aflatoxinas.....	70

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
CAPITULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
CAPITULO II.....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1 Arroz.....	6
3.2 Operações pós-colheita do arroz .....	9
3.2.1 <i>Secagem</i> .....	9
3.2.2 <i>Armazenamento</i> .....	10
3.3 Contaminação por fungos e micotoxinas .....	12
3.3.3 <i>Aflatoxinas</i> .....	13
3.3.4 <i>Métodos para determinação de aflatoxinas</i> .....	16
3.4 Legislação para micotoxinas.....	18
CAPITULO III.....	21
ARTIGO I - ESTUDO ANÁLITICO PARA A DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM ARROZ E SUAS FRAÇÕES .....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT .....	23
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
2.1 Materiais .....	25
2.2 Preparo dos padrões .....	26
2.3 Amostras .....	26
2.4 Estabelecimento das condições cromatográficas.....	27
2.4.1 <i>HPLC-FL</i> .....	27
2.4.2 <i>HPTLC</i> .....	27
2.5 Extração das Aflatoxinas.....	28
2.5.1 <i>Extração pelo método de Soares; Rodrigues – Amaya (1989) modificado</i> .....	28
2.5.2 <i>Extração pelo método QuEChERS</i> .....	28
2.6 Validação do método HPLC–FL e HPTLC .....	29

2.6.1 Curva analítica e linearidade.....	29
2.6.2 Limite de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ) .....	29
2.6.3 Precisão.....	29
2.6.4 Recuperação .....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
3.1 Condições cromatográficas.....	30
3.2 Método de extração .....	30
3.3 Padronização do método de Soares e Rodrigues–Amaya (1989) para determinação das aflatoxinas (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> ).....	31
3.4 Conteúdo de aflatoxinas no arroz armazenado e suas frações.....	36
4 CONCLUSÃO .....	37
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
CAPITULO IV .....	40
ARTIGO II - OPERAÇÕES DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO E OS TEORES DE AFLATOXINAS EM ARROZ .....	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT .....	41
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
2.1 Materiais .....	43
2.2 Amostras .....	43
2.3 Condições cromatográficas.....	46
2.4 Extração de aflatoxinas (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> ) .....	46
2.5 Determinação do teor de glicosamina.....	46
2.6 Caracterização das amostras.....	47
2.7 Análise estatística dos resultados .....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
3.1 Indicativos do método .....	47
3.2 Aflatoxinas no arroz e suas frações .....	47
3.3 Influência do tipo de secagem e tempo de armazenamento nos níveis de aflatoxinas presentes no arroz.....	50
3.4 Glicosamina como indicativo de contaminação fúngica em arroz.....	52
3.5 Caracterização física das amostras .....	54
4 CONCLUSÃO .....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CAPITULO V .....	59
ARTIGO III - COCÇÃO DO ARROZ E OS TEORES RESIDUAIS DE AFLATOXINAS.....	59

RESUMO.....	60
ABSTRACT .....	60
1 INTRODUÇÃO.....	61
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 Material.....	62
2.3 Preparo dos padrões .....	63
2.4 Estabilidade térmica dos padrões de aflatoxinas .....	63
2.5 Cocção do arroz por diferentes métodos .....	64
2.6 Determinação das aflatoxinas.....	65
2.7 Análise estatística.....	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
4 CONCLUSÃO .....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
CAPITULO VI .....	73
6.1 CONCLUSÃO GERAL.....	74
6.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

---

---

**CAPITULO I**

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o décimo lugar na produção de arroz no mundo, sendo que o Rio Grande do Sul contribui com aproximadamente 60% da produção nacional (EMBRAPA, 2010). Este cereal se destaca dos demais grãos na dieta brasileira apresentando consumo médio *per capita* de aproximadamente 57 kg/ano, o que, por outro lado, o coloca como uma fonte de risco a segurança alimentar em caso de contaminação, como exemplo por fungos produtores de compostos tóxicos (DORS, PINTO; FURLONG, 2009; MAJEED et al. 2013; REITER et al. 2010).

Os fungos são um dos principais responsáveis por perdas na qualidade do arroz, pois além de ocasionar a deterioração e perda do valor nutritivo, podem produzir micotoxinas tornando os grãos inaceitáveis para o consumo. O crescimento fúngico no arroz ocorre sob condições ambientais favoráveis e está associado à umidade, temperatura, tempo e condições físicas do grão, níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, nível de inóculo, prevalência de linhagens toxigênicas, entre outros (RUPOLLO et al. 2006; TANAKA et al. 2007; ZHU et al. 2013).

A micota que contamina o arroz pode ser dividida em dois grupos: os micro-organismos de campo e os de armazenamento. Os fungos de campo contaminam os grãos antes da colheita, porque necessitam de umidade superior a 30%, enquanto os fungos de armazenamento se desenvolvem com umidade entre 13 e 18%. Considerando que o arroz é armazenado por longos períodos, as operações de secagem tornam-se fundamentais para garantir um armazenamento seguro, livre de micro-organismos.

São diversas técnicas de secagem e de armazenamento que podem ser empregadas por indústrias de alimentos, sendo que cada uma influencia nas características do grão e no desenvolvimento fúngico de maneira diferente. No entanto, pesquisas sobre a qualidade micotoxicológica deste cereal durante estas etapas são escassas, cabendo ser avaliada para subsidiar a escolha da técnica a ser empregada para garantir a qualidade dos grãos (ELIAS, 2007; HOELTZ, 2009). Durante o armazenamento predominam os fungos do gênero *Aspergillus* e entre as micotoxinas produzidas por estes fungos destacam-se as aflatoxinas (AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>), que causam uma variedade de efeitos adversos e em alguns casos podem ser letais, a diferentes espécies animais e humanos.

Embora seja menos comum a presença de aflatoxinas em arroz, quando comparado a outros cereais como o trigo e milho, e usualmente quando ocorre contaminação os níveis são inferiores, o consumo diário pode representar um risco de dano que se manifesta de forma crônica em função do consumo contínuo deste cereal e seus derivados (MAZIERO; BERSOT,

2010; NUNES et al. 2003). No entanto, são vários os trabalhos que mencionam a contaminação do arroz com micotoxinas. Os níveis variam desde valores abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira (5 µg/kg) até valores relativamente alto chegando em alguns casos a atingir 20 vezes o limite permitido. Dors, Bierhals; Badiale-Furlong (2011), avaliaram o ocorrência de micotoxinas em arroz parboilizado no sul do Brasil e observaram que a AFLAB<sub>1</sub> estava presente em 9% das amostras analisadas com níveis variando de 11 a 74 µg/kg. Majeed et al (2013) avaliaram a incidência de aflatoxinas em arroz no Paquistão, e observaram que 38 de 68 amostras de arroz apresentavam contaminação com aflatoxinas, com concentrações variando de 8,2 a 19,5 µg/kg.

Importante ressaltar, que a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceu em 2011 a RDC n°7, que dispõe os limites máximos tolerados para micotoxinas em arroz, havendo a necessidade das empresas, que importam, produzem, distribuem e comercializam este cereal e seus produtos, adequarem as etapas de produção (secagem, armazenamento e beneficiamento) para impedir que produto contaminado seja comercializado ou consumido. A contaminação de alimentos por micotoxinas causa grandes preocupações devido sua termorresistência que possibilita que mesmo após o processamento térmico, como a cocção, estas permaneçam intactas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Por isso, se faz necessário o desenvolvimento de medidas práticas que busquem solucionar a contaminação com micotoxinas, principalmente em alimentos de consumo diário, como o arroz. Dessa forma, relacionar a contaminação com etapas do seu processamento, está em busca de fatores que possam influenciar diretamente na contaminação, e assim na minimização ou solução deste problema.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de operações pós-colheita na distribuição de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> nas diferentes frações do grão de arroz.

### 2.2 Objetivos específicos

- Adaptar método para determinação de aflatoxinas (AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>), com menor geração de resíduos químicos;
- Acompanhar os níveis de AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub> durante o armazenamento de arroz em silos de concreto após diferentes técnicas de secagem;
- Avaliar os níveis de AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub> em amostras de arroz após processo de cocção.

---

---

**CAPITULO II**

**REVISÃO DA LITERATURA**

---

---

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Arroz

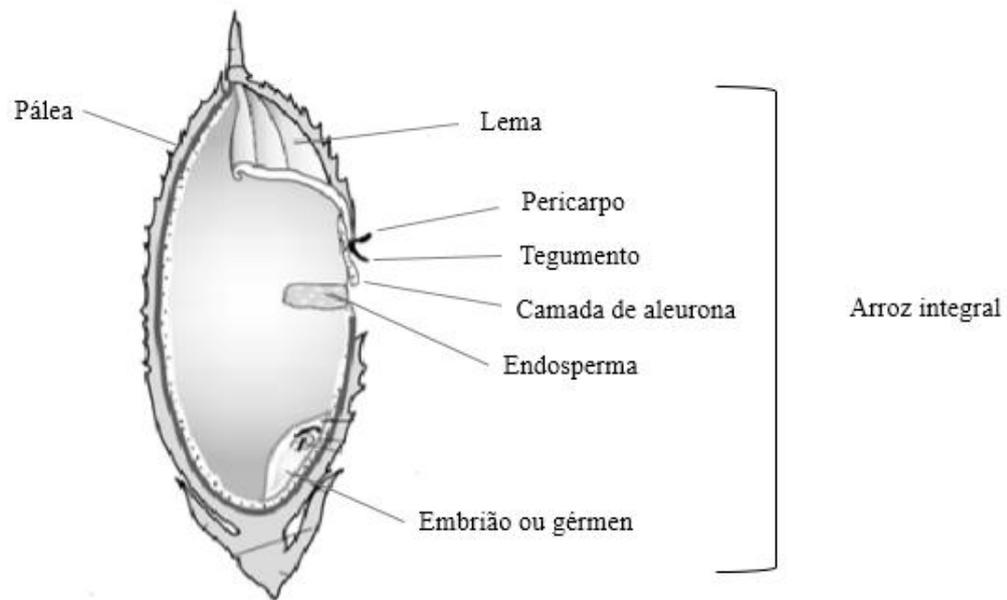
O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento básico na dieta para grande parte da população mundial, e é igualmente importante como produto no comércio internacional (PARK et al. 2012). Segundo dados da FAO (2006), já foram identificadas 140.000 variedades de arroz, sendo que as principais diferenças observadas são quanto a origem genética, dimensões e composição do amido.

O arroz do gênero *Oryza* é constituído por 21 espécies, das quais 7 são as mais produzidas no mundo, *Oryza barthii*, *Oryza glaberrima*, *Oryza latifolia*, *Oryza longistaminata*, *Oryza punctata*, *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* (EMBRAPA, 2007). A espécie *Oryza sativa* L. é a de maior importância comercial no Brasil e esta é dividida em três principais subespécies: índica, japônica e javânica, sendo as duas primeiras mais consumidas. A subespécie “índica” é a mais comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil, e representa cerca de 80% da produção mundial (KENNEDY; BURLINGAME, 2003).

O grão de arroz é constituído morfológicamente por cariópse e casca. A casca é composta de duas folhas modificadas, a pálea e a lema, e corresponde a cerca de 20% do peso do grão. A cariópse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona, que representam de 5 a 8% da massa do arroz integral. O embrião ou gérmen está localizado na base do grão, é rico em proteínas e lipídeos, e representa de 2 a 3% do arroz integral. O endosperma forma a maior parte do grão (89-94% do arroz integral) e consiste de células ricas em grânulos de amido e algumas proteínas (WALTER, MARCHEZAN; AVILA, 2008; ZHOU et al. 2002).

O arroz integral é obtido pela retirada da casca do grão, podendo ser polido com a remoção do farelo (pericarpo, tegumento, camada de aleurona e gérmen), que representa de 8,5 a 14,8% do arroz integral, obtendo-se o arroz branco polido. Os grãos também podem ser submetidos à parboilização, processo hidrotérmico através do qual se obtém o arroz parboilizado, podendo ser consumido na forma integral ou polido (WALTER, MARCHEZAN; AVILA, 2008; ZHOU et al. 2002). A Figura 2.1 ilustra a estrutura de um grão de arroz.

**Figura 2.1** - Estrutura do grão de arroz



Fonte: KENNEDY, BURLINGAME; NGUYENC (2002)

A arroz é constituído principalmente por amido, representando aproximadamente 90% de matéria seca do arroz polido, também encontram-se presentes em menores concentrações açúcares livres e fibras. O endosperma é composto principalmente por amido enquanto o farelo e o gérmen apresentam maiores concentrações de fibras (JULIANO, 2003; ZHOU et al. 2002). Proteínas e lipídeos são encontrados em menores quantidades quando comparado aos carboidratos. No gérmen está a maior concentração da fração lipídica (1/3 do conteúdo total) seguindo-se na camada de aleurona. Os nutrientes de forma geral não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão. As camadas mais externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídeos, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido. A Tabela 2.1 apresenta a composição centesimal do arroz integral, branco polido e parboilizado polido.

**Tabela 2.1** - Composição centesimal média (% 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
Lipídeos	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: STORCK (2004).

O arroz está presente na alimentação humana há pelo menos cinco mil anos, e sua qualidade nutricional afeta diretamente a saúde humana. Segundo Kennedy, Burlingame; Nguyenc (2002) o arroz fornece cerca de 715 kcal *per capita* por dia, 27% dos carboidratos, 20% das proteínas e 3% dos lipídeos da alimentação, nas populações onde este grão é parte da dieta rotineira.

Com origem asiática, o arroz é atualmente produzido e consumido em todos os continentes (FAOSTAT, 2009), sendo a China líder no *ranking* de maior produtor mundial de arroz, detendo mais de 30% do volume total produzido no planeta (INFOCOMM, 2010). O Brasil destaca-se como maior produtor de arroz fora do continente asiático, produzindo 2,5% da produção mundial e 50% da produção da América Latina. A cultura do arroz no Brasil, está atrás apenas da cultura de soja e milho, ocupando o 3º lugar na produção de grãos (CONAB, 2013).

Apesar da cultura do arroz ser comum em quase todo o país, a maior parte da produção se concentra nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, onde predomina o cultivo de arroz irrigado contribuindo com mais de 70% da produção anual nacional (CONAB, 2013). Segundo dados da CONAB (2012) o Rio Grande do Sul cultivou na safra de 2012/2013, 1067 mil ha, representando 52% da área nacional e 67% da produção brasileira, todo irrigado, seguido por Santa Catarina com 150 mil ha e 1 milhão de toneladas de arroz, em terceiro o Maranhão, com 629 mil toneladas de arroz, com o predomínio absoluto do arroz sequeiro. Na safra 2012/13 foram produzidas 11.943 milhões de toneladas, 3% maior do que o volume

colhido na safra anterior. A Região Sul produziu 9.212 milhões de toneladas e as demais regiões produziram, 2.732 milhões de toneladas.

## **3.2 Operações pós-colheita do arroz**

### **3.2.1 Secagem**

A secagem é uma das etapas do pré-processamento dos produtos agrícolas que tem por finalidade retirar a água livre do grão. É definida como uma operação onde ocorre a transferência de calor e massa simultaneamente entre o produto e o ar de secagem (SILVA, 2008), cuja a finalidade é reduzir o teor de água de um produto, visando o controle de micro-organismos, alterações físico-químicas, redução de custos relacionados a embalagens, manipulação, transporte e armazenamento pela redução de seu peso e volume (ATHIÉ et al. 1998; VERGARA et al. 1997). O arroz está entre os produtos agrícolas, na qual a colheita é realizada quando o grão atinge entre 19 e 26% de umidade, e necessita atingir 12% para garantir armazenamento livre do ataque microbiano (LEITE; VILLELA, 2010).

A secagem do arroz pode ser feita por vários métodos (SILVA, AFONSO; DONZELLES, 2000), sendo a secagem intermitente uma das mais utilizadas em indústrias beneficiadoras de arroz, caracterizando-se pela passagem descontínua de ar aquecido pelas camadas do grão. Este sistema exige maiores investimentos para a instalação e o uso de tecnologia mais sofisticada do que o estacionário, porém os resultados podem ser bastante compensadores, obtendo-se grãos mais resistentes a danos mecânicos e choques térmicos (PUTRANTO et al. 2011).

Na secagem intermitente os grãos não são submetidos a ar quente durante todo o processo, ou seja, o material é exposto a temperatura que pode ser de 70 a 110 °C, intercalados com períodos em que não há circulação de ar na câmara de equalização. No último período, ocorre a transferência da umidade pela migração da água do interior para a superfície de grão, tornando mais fácil a evaporação e transferência para o ar no momento da passagem seguinte pela câmara de secagem (ELIAS, 2002; ELIAS; OLIVEIRA, 2009; RAMALLO, LOVERA; SCHMALKO, 2010).

Na secagem estacionária não há movimentação dos grãos que são colocados nos silos-secadores, sofrendo a ação do ar (aproximadamente 30 a 40 °C) que é obtido por aquecimento ou não, movimentando-se mecanicamente em fluxos axial ou radial em direção do eixo principal (altura, em direção vertical a partir do fundo do silo-secador) ou do raio (lateral, em direção horizontal a partir de um tubo central perfurado), respectivamente (CNOSSEN,

JIM\_ENEZ; SIEBENMORGEN, 2003; FRANCO; PETRINI, 2006). A baixa velocidade e a desuniformidade de secagem são características indesejáveis da secagem estacionária. Por outro lado, o investimento é baixo e os grãos sofrem menos danos físicos. Para contornar o problema da velocidade de secagem, pode ser usado calor ou ar forçado que promovem o abaixamento da umidade relativa do ar e, assim, reduzem o tempo necessário para a secagem dos grãos (ELIAS, 2007).

Os combustíveis mais utilizados para fornecimento de calor são sólidos como lenha ou a própria casca do arroz, entretanto esses não garantem a uniformidade na secagem pois causam grandes oscilações de temperatura durante o processo. Há relatos sobre as vantagens de secar com o gás liquefeito de petróleo (GLP), pois confere maior uniformidade (HOELTZ, 2005).

A lenha é um combustível sólido de difícil queima, que libera uma grande quantidade de compostos prejudiciais à saúde como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (PORTELLA; MARTINS, 2001). De acordo com Hutt, Meiering; Oelschlager (1978) combustíveis gasosos produzem muito menos HPAs comparado aos combustíveis sólidos. O GLP é um composto formado pela combinação dos gases propano e butano na proporção 1:1, sendo caracterizado por sua grande aplicabilidade como combustível, facilidade de armazenamento e transporte. O uso do GLP resulta em uma maior qualidade dos grãos, por não deixar resíduos e nem odores. Porém possui como desvantagem o custo ainda elevado, constituindo uma barreira frente ao uso da lenha como combustível (LOPES et al. 2001; PORTELLA; MARTINS, 2001).

Em alguns países, empresas com instalações médias e pequenas estão adotando secagem estacionária, tendo energia solar como fonte de calor, pois para volumes pequenos de produtos esta fonte é eficiente. As grandes quantidades de grãos requerem maiores áreas de coletores solares tornando-se inviável economicamente (WEBER, 2001).

### **3.2.2 Armazenamento**

O armazenamento de cereais por longos períodos é uma prática comum utilizada em todo mundo, e o tipo de técnica de armazenagem é determinada pela quantidade de produto a ser estocado (ELIAS, 2002). Segundo dados das Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2004), 16% da safra anual de arroz é perdida em decorrência de práticas de pós-colheita ineficientes. A falta de Boas Práticas Agrícolas na orizicultura, propiciam o desenvolvimento fúngico, pois o arroz é um ótimo substrato, devido a sua riqueza em carboidratos (ELIAS, 2007).

Conforme a CONAB (2011) a estrutura brasileira de armazenagem de grãos está distribuída da seguinte forma: 15% na propriedade agrícola (fazenda), 79% coletora e intermediária (cooperativa, armazém, indústria, armazéns gerais, comércio, terminais intermodais) e 16% terminal (portos, indústria, comércio). Para o agricultor o armazenamento na própria propriedade pode representar diversas vantagens como: redução ou ausência de custo com transporte ou frete, comercialização do produto em épocas de maior demanda, armazenamento adequado, bem como disponibilidade de produto de melhor qualidade. Porém, também pode representar um baixo percentual com relação a capacidade total de armazenamento a granel no Brasil, levando a comercialização de grãos imediatamente após a colheita (ELIAS, 2002, 2007; FILHO et al. 2000; PUZZI, 2000).

O armazenamento em sacarias, utiliza estruturas relativamente simples, porém possui maior facilidade de contaminação microbiana, ataques por insetos, ácaros, roedores, além de gerar custos com embalagens e permitir a estocagem de vários produtos na mesma estrutura organizacional, limitando a aplicação da técnica (HOELTZ, 2005).

Quando se trata de grandes quantidades (acima de 1200 ton), o armazenamento é normalmente feito em silos metálicos, silos de concreto ou armazéns graneleiros, que poupam tempo, diminuem as perdas, são mais higiênicos aproveitam melhor o espaço disponível além de serem usualmente equipados com controlador de temperatura e umidade, preservando a qualidade e assegurando o produto por períodos mais longos (GREGORI et al. 2013).

Mesmo com sistemas modernos de armazenagem, a interação entre fatores físicos, químicos e biológicos tornam o produto vulnerável a contaminação, que dependendo dos níveis, fatores e grau de interação, pode acelerar o processo de deterioração. Os principais agentes que contaminam e destroem os grãos armazenados são insetos e fungos, sendo que a taxa de reprodução e crescimento destes organismos depende grandemente da temperatura e da umidade (HOELTZ et al. 2009). Portanto, o armazenamento bem conduzido tem grande importância para a qualidade dos grãos.

É importante lembrar que os grãos colhidos e micro-organismos contaminantes estão vivos e respirando lentamente mesmo sob condições de baixa atividade de água. Desta forma, deficiências nas operações de pós-colheita podem levar a uma deterioração rápida afetando a qualidade nutricional do produto. A atividade microbiana pode causar indesejáveis efeitos nos grãos, incluindo a descoloração, contribuindo para o aquecimento, bem como perdas de matéria seca por meio da utilização de hidratos de carbono, lípidos e proteínas, alterando sua digestibilidade, produzindo metabólitos voláteis, resultando em odores indesejáveis, causando

perda do poder de germinação e afetando a utilização do produto na alimentação (MAGAN; ALDRED, 2007).

### 3.3 Contaminação por fungos e micotoxinas

Fungos, também denominados mofos ou bolores, são micro-organismos filamentosos, que ao infestarem a massa de arroz buscam nutrientes do substrato como carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais (SILVA, 2009), podendo a micota ser substituída ao longo deste ciclo por espécies características das condições do ambiente e do substrato (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos no arroz são umidade, temperatura, período de armazenamento, nível inicial de contaminação, impurezas, insetos, concentração de CO<sub>2</sub>, condições físicas e sanitárias dos grãos. Em condições ambientais favoráveis, os esporos dos fungos germinam, formando hifas que se distribuem pelos grãos e outros substratos. Dentre os fungos estão espécies capazes de produzir metabolitos secundários tóxicos, as micotoxinas. (RUPOLLO et al. 2006; TANAKA et al. 2007).

Os fungos toxigênicos que atacam o arroz são divididos em dois grupos: fungos de campo, que incluem as espécies do gênero *Fusarium* e os fungos de armazenamento que são constituídos principalmente por *Aspergillus* e *Penicilium* (PARK et al. 2005; PUZZI, 2000). O gênero *Fusarium* é geralmente dominante no campo, onde a atividade de água (aw) não é um fator limitante, porém o desenvolvimento pode continuar durante o armazenamento quando o arroz não é seco a 12%, valor ideal para não proliferação fúngica. *Aspergillus* e *Penicilium*, pelo contrário se desenvolvem principalmente durante o armazenamento dos grãos devido ao teor de umidade ser baixo (GREGORI et al. 2013). Esses gêneros são os maiores produtores de micotoxinas, reduzindo a qualidade nutritiva e tecnológica do arroz e seu valor de mercado. Estima-se que, no mínimo, 25% dos cereais produzidos no mundo estão contaminados com micotoxinas, incluindo o arroz (LIU, GAO; YU, 2006; PEREIRA, CARVALHO; PRADO, 2002).

A contaminação fúngica dos grãos cultivados no Brasil é frequente, incluindo o arroz, devido as condições climáticas favoráveis para seu desenvolvimento. Durante o processamento podem ocorrer alterações na microbiota, porém as micotoxinas geralmente permanecem no produto devido a estabilidade química que apresentam (NUNES et al. 2003; WEBER, 2001).

As micotoxinas são metabólitos secundários, possuem um amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, termo estabilidade e atuam em baixas concentrações e não desencadeiam

respostas imunológicas (BOK, KELLER; LAE, 2004). Cerca de 400 tipos de micotoxinas já foram isolados e identificados. No entanto, as de maior importância em arroz e derivados são as aflatoxinas e ocratoxinas, produzidas pelos gêneros fúngicos *Penicilium* e *Aspergillus*, e as zearalenona, fumonisinas e tricotecenos, produzidas principalmente por algumas espécies do complexo *Fusarium*. Entre estas micotoxinas, as aflatoxinas destacam-se devido aos efeitos que podem causar sobre a saúde, e no arroz sua síntese ocorre durante as operações de pós-colheita, principalmente durante o armazenamento, devido aos menores percentuais de umidade (FEDDERN, FURLONG; SOARES, 2007; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al. 2012; ROCHA et al. 2014; SILVA, 2009).

### 3.3.3 Aflatoxinas

O termo aflatoxina foi adotado a partir do nome do seu principal agente produtor (*Aspergillus flavus*), podendo ser produzidas também por *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceoroseus* cujos isolados chegam a produzir até 106 µg/kg (EMBRAPA - 1, 2007; FREIRE et al. 2007).

O fígado é o primeiro órgão humano a ser atacado (FDA, 2003). No entanto, o rim, baço e pâncreas também podem ser afetados (FIRMIN et al. 2010; WAGACHA; MUTHOMI, 2008). Em virtude da capacidade de se ligarem ao DNA das células, as aflatoxinas afetam a síntese protéica, além de contribuírem para a ocorrência da aplasia tímica (ausência congênita do timo e das paratireóides, com consequente deficiência da imunidade celular; também conhecida como síndrome de Di George). Aflatoxinas têm propriedades oncogênicas e imunossupressivas, induzindo infecções em pessoas contaminadas com essas substâncias. Também contribuem para patologias em viciados em heroína, bem como em recém-nascidos de mães viciadas. A toxicidade das aflatoxinas decresce na ordem AFLAB<sub>1</sub>>AFLAB<sub>2</sub>>AFLAG<sub>1</sub>>AFLAG<sub>2</sub> (RUPOLLO et al. 2006). A exposição humana a AFLAB<sub>1</sub> é principalmente através da dieta diária, por ser estável durante um tratamento térmico normal (ZHANG, 2011). Pesquisadores têm gerado a hipótese de que o “Kwashiorkor”, infecção que mata milhões de crianças em países em desenvolvimento, pode ser resultado de intoxicação com aflatoxinas. No Brasil, está sendo relatado a presença de aflatoxinas em vários alimentos (Dors, Bierhals; Badiale-Furlong (2011); Mazaheri (2009); PRADO, 1983; Reiter et al. (2010); Silva et al (2008)).

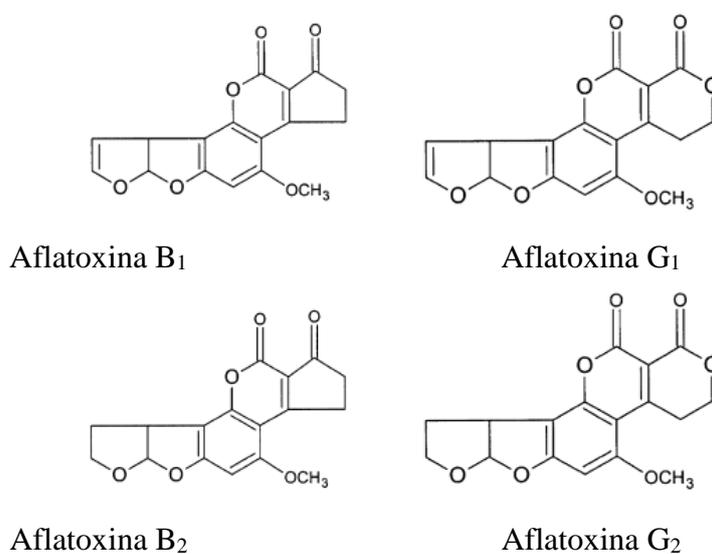
As aflatoxinas são compostos de natureza cristalina, termoestáveis e solúveis em solventes polares, como o clorofórmio e o metanol. Seus pesos moleculares são: AFLAB<sub>1</sub>: 312,3; AFLAB<sub>2</sub>: 314,3; AFLAG<sub>1</sub>: 328,3; AFLAG<sub>2</sub>: 330,3 g mol<sup>-1</sup>. As aflatoxinas absorvem luz

ultravioleta na faixa entre 362 e 363 nm e a emissão de fluorescência para as AFLAs B1 e B2 ocorre em 425 nm e 450 nm para as AFLAs G1 e G2. Os pontos de fusão são de 269, 289, 246, 240 °C, respectivamente, para as AFLAs B1, B2, G1 e G2 (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Quimicamente, as aflatoxinas têm estruturas estreitamente relacionadas umas com as outras, formando um único grupo de compostos heterocíclicos (complexo furocumarinas). As aflatoxinas do grupo G diferem quimicamente do grupo B pela presença de um anel 3-lactona no lugar do anel ciclopentanona. Um dupla ligação 9, 9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas aflatoxinas AFLAB<sub>1</sub> e AFLAG<sub>1</sub> e não em AFLAB<sub>2</sub> e AFLAG<sub>2</sub> (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al. 2011; JAIMEZ et al. 2000).

As aflatoxinas AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>, ilustradas na Figura 2.2, são geralmente encontradas associadas em vários alimentos e rações, em diferentes proporções. Sendo que as iniciais B (*blue*) e G (*green*) devem ao fato destas apresentarem fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta (SILVA, 2009).

**Figura 2.2** - Estruturas químicas das aflatoxinas



Fonte: ZAIN (2011)

A principal reação de ativação da AFLAB<sub>1</sub> ocorre através da epoxidação da dupla ligação de carbonos 8 e 9, pelas enzimas do citocromos P-450, resultando em um intermediário, a AFLAB<sub>1</sub> 8,9- epóxido, que pode interagir com o DNA, RNA e proteínas através de reações de substituição nucleofílicas. Estes adutos são manifestados pelos efeitos mutagênicos e carcinogênicos (CHEECK; SHULL, 1985; YOSHIZAWA, 2001). A excreção da aflatoxina B<sub>1</sub> também envolve reações de substituição nucleofílica de seus epóxidos, um dos caminhos

envolve a abertura do anel epóxido através da substituição nucleofílica com a glutatona, uma molécula relativamente polar que possui um grupo sulfidríla fortemente nucleofílico. O composto derivado dessa reação é consideravelmente mais polar do que o epóxido original sendo facilmente excretado através de caminhos aquosos (SOLOMONS et al. 2005). A reação de hidroxilação, da AFLAB<sub>1</sub> origina as aflatoxinas M<sub>1</sub> e Q<sub>1</sub>, enquanto que a demetilação produz aflatoxina P<sub>1</sub>. Esses metabólitos são conjugados e excretados principalmente através da urina e da bile. A formação desses derivados pode constituir parte do processo de detoxificação da AFLAB<sub>1</sub>, embora alguns compostos, como a AFLAM<sub>1</sub>, também apresentem toxicidade em modelos experimentais (BIEHL; BUCK, 1987).

A aflatoxicose é o termo utilizado para designar o conjunto de efeitos tóxicos das aflatoxinas, na saúde animal e humana. A severidade da aflatoxicose depende da extensão da exposição, idade, estado nutricional e possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos para os quais o indivíduo foi exposto (CARBONE et al. 2007).

Alguns surtos de aflatoxicose foram relatados em diversas partes do mundo, como a morte de 100.000 perus jovens no Reino Unido em 1960, como também de outros animais e até, provavelmente, de humanos (PITT; HOCKING, 1986; RODRICKS et al. 1977). Em dois estados vizinhos, no noroeste da Índia, em 1974, foi confirmado um surto de AFLAB<sub>1</sub> em 397 pessoas, após a ingestão de milho contaminado, cerca de 108 pessoas morreram. Em 2004, foi relatado um surto de aflatoxicose em suínos no Rio Grande do Sul, decorrente de milho produzido na própria granja e utilizado para alimentação dos animais, causando 15 mortes (ZLOTOWSKI et al. 2004).

Nenhum surto até o momento, foi relatado, decorrente de arroz contaminado com aflatoxinas, no entanto a presença destes compostos no arroz foi e está sendo relatada em diversas partes do mundo, e torna-se preocupante devido ao grande consumo de arroz pela população (BIANCHINI, 2003; DORS, BIERHALS; BADIALE-FURLONG, 2011; FURLONG et al. 1999; PARK et al. 2005; TANAKA et al. 2007). Além disso estes compostos podem estar causando efeitos a longo prazo, e possivelmente não estejam sendo diagnosticado por médicos ou profissionais da saúde.

Silva et al (2008) detectaram a ocorrência de AFLAB<sub>1</sub> em arroz consumido por militares do Exército Brasileiro em 6 amostras de um total de 26, com níveis entre 0,54 e 2,04 µg/kg e 1 amostra com 1,84 µg/kg de AFLAB<sub>2</sub>. Contaminação de arroz por aflatoxinas foi detectado também no Irã, em estudos realizados por Mazaheri (2009), na qual 83% das amostras avaliadas apresentaram contaminação com aflatoxinas, apresentando uma média de 1,89 ng/g para AFLAB<sub>1</sub>, sendo que duas amostras apresentaram quantidades acima dos limites estabelecidos

pela legislação do país. Na Áustria, Reiter et al. (2010) fizeram um levantamento através de 81 amostras de arroz e observaram que 24 apresentavam quantidades detectáveis de AFLAB<sub>1</sub> que foi quantificada em 15 amostras e AFLAB<sub>2</sub> em 1 amostra com níveis que variaram entre 0,45 µg/kg a 9,86 µg/kg para a AFLAB<sub>1</sub> e 1,5 µg/kg para AFLAG<sub>2</sub>. Importante ressaltar que três das amostras analisadas apresentaram contaminação acima dos níveis máximos estabelecidos pela União Europeia. Dors, Bierhals; Badiale-Furlong (2011), avaliaram a ocorrência de micotoxinas em arroz parboilizado no sul do Brasil e observaram que a AFLAB<sub>1</sub> estava presente em 9% das amostras analisadas com níveis variando de 11 a 74 µg/kg. Na Índia Zhu et al (2013) avaliaram diversas variedades de arroz e detectaram a presença de AFLAB<sub>1</sub> em arroz vermelho kójico com 2,9 µg/kg. Majeed et al (2013) avaliaram a incidência de aflatoxinas em arroz no Paquistão, e observaram que 38 de 68 amostras de arroz apresentavam contaminação com aflatoxinas, com concentrações variando de 8,2 a 19,5 µg/kg.

Assim como estes casos, diversos outros estudos vem sendo relatado com relação a ocorrência destes compostos em arroz, mostrando que são necessárias medidas práticas para controle, principalmente em alimentos de consumo diário, como o arroz. Considerando que a secagem e armazenamento são possíveis pontos críticos para produção, tornando-se interessante a avaliação da influência dessas operações sobre o nível de aflatoxinas.

### ***3.3.4 Métodos para determinação de aflatoxinas***

A metodologia analítica para a determinação de aflatoxinas em alimentos geralmente é composta pelas etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação (PALMA et al. 2007). A extração de aflatoxinas de amostras requer o uso de solventes ou mistura de água e solventes relativamente polares, como: metanol, acetona, etilacetato entre outros. Os procedimentos de limpeza do extrato envolvem partição líquido-líquido, colunas de extração em fase sólida (sílica gel, C18, silicato de magnésio) (AKIYAMA et al. 2001; CASTRO; VARGAS, 2001) e colunas de imunoafinidade (KRSKA et al. 2005). Também tem sido relatado a utilização de sais como sulfato de cobre, sulfato de amônio, sulfato de magnésio geralmente associados a terra diatomácea (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al. 2012; SOARES; RODRIGUES-AMAYA, 1989).

Nos últimos anos, muitos esforços tem sido feito para desenvolver métodos para determinação de micotoxinas em alimentos. A literatura cita várias técnicas multimicotoxinas para extração e quantificação de aflatoxinas. Göbel; Lusky (2004) desenvolveram um método para a determinação simultânea de AFLAs, ocratoxinas e zearalenona em arroz e centeio usando colunas de imunoafinidades como técnica de purificação e análise HPLC - FL, no entanto, a

validação deste procedimento não foi relatado. Um levantamento de ocorrência de aflatoxinas em arroz beneficiado polido tipo I, destinado ao consumo dos militares do Exército Brasileiro empregaram o procedimento descrito por Soares; Rodrigues – Amaya (1989), quantificando as toxinas em técnicas de cromatografia em camada delgada (HPTLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando detecção por fluorescência.

Segundo Hackbart et al (2012) é necessário além do desenvolvimento de novas tecnologias para análise de micotoxinas, métodos que minimizem o impacto ambiental, tempo de exposição dos analistas a solventes tóxicos e determinem uma ampla faixa de substância em uma única extração. Hackbart (2013) comparou a eficiência de cinco métodos para extração de aflatoxinas (AFLAM<sub>1</sub>, AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub>, AFLAG<sub>2</sub>) do farelo de arroz, sendo estes, o método descrito por Soares e Rodrigues – Amaya (1989) modificado, QuEChERS (Anastassiades et al. 2003), QuEChERS (Anastassiades et al. 2003) utilizando metanol como solvente extrator, QuEChERS modificado (Hackbart et al. 2012), QuEChERS modificado (Hackbart et al. 2012) utilizando metanol como solvente extrator. O procedimento de Soares e Rodrigues – Amaya, apresentou valores de recuperação, repetibilidade, limites de detecção e quantificação obedeceram as regras analíticas em vigência (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003). Este procedimento foi modificado para minimização da utilização de amostra e solvente extrator, tornando-se um procedimento acessível para as análises de rotina gerando menor volume de resíduo (HACKBART, 2013).

Com relação as técnicas para quantificação destes compostos, a cromatografia de camada delgada (HPTLC) é a mais simples e antiga para determinação de aflatoxinas que estas apresentam-se fluorescentes quando observadas sob luz ultravioleta. Porém, novos equipamentos cromatográficos tem sido desenvolvidos, por exemplo, há uma forte tendência para o uso da técnica de HPLC - MS devido sua detecção ser universal, seletivo e sensível (KRSKA; MOLINELLI, 2007). No entanto, a detecção de fluorescência é por natureza muito específica e sensível e o HPLC-FL pode ainda ser superior para determinação quantitativa em que a influência da matriz é negligenciável em comparação com os possíveis problemas que podem surgir com a quantificação em HPLC - MS (CIGIC; PROSEN, 2009). Cromatografia líquida de ultra - alto desempenho (UHPLC), usando colunas cheias com partículas < 2 µm, é uma técnica que mostra melhor sensibilidade, resolução e velocidade em comparação com HPLC – MS ou HPLC – FL, é uma técnica relativamente nova e há poucos estudos publicados para a determinação de micotoxinas em alimentos (FRENICH et al. 2009), pois o custo do aparelho não o torna muito acessível.

Dessa forma, o desenvolvimento de métodos para extração de aflatoxinas deve além de reduzir impactos ambientais, ser rápido, fácil, confiável e acessível a maioria dos laboratórios de análise de alimentos. Para confiabilidade de um método analítico, são recomendados alguns procedimentos conhecido como validação, devendo os instrumentos e métodos serem validados antes do uso de rotina, após manutenção ou em intervalos de tempo (RIBANI et al. 2004). Segundo a ANVISA (2003) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Com relação aos indicativos de desempenho, é necessário desenvolver: curva analítica e linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão, entre outros.

A curva analítica é descrita através de uma equação que estabelece uma relação entre a concentração do composto medido e a resposta do detector que deve representar uma reta linear e crescente (CASSIANO et al. 2009; RIBANI et al. 2004). A fim de indicar o quanto essa reta pode ser considerada adequada como modelo matemático é usado como indicador o coeficiente de correlação, que quanto mais próximo de 1 indica menor variação dos resultados (INMETRO, 2011; RIBANI et al. 2004).

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância capaz de ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância que é capaz de ser quantificada. A recuperação ou exatidão é o indicativo mais utilizado para a validação de métodos analíticos, que é calculado através da comparação do resultado da extração de uma amostra com quantidade conhecida do analito de interesse, com o resultado obtido para o analito em amostras preparadas em solvente. A robustez de um método analítico mede sua suscetibilidade frente a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina (CASSIANO et al. 2009).

### **3.4 Legislação para micotoxinas**

Ao contrário de outros países no Brasil até o ano de 2011 existia legislação apenas para regulação das aflatoxinas, disposta em duas Resoluções. A primeira, RDC n° 274 da Anvisa, de 15 de outubro de 2002, estabelecia limites máximos para alimentos como amendoim, pasta de amendoim, milho em grão e farinha ou sêmolos de milho (ANVISA, 2002). Para os demais produtos direcionado ao consumo humano para a legislação de 1974 do Ministério da saúde (Resolução n° 34/76), publicada no Diário Oficial da União em 19 de janeiro de 1977, que permitia um teor mais elevado de aflatoxinas.

No ano de 2011 foi publicado no Diário Oficial da União a RDC nº 7, de 18 de fevereiro, dispondo de limites máximos tolerados para micotoxinas em diversos alimentos. Foram estabelecidos limites para as aflatoxinas (AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub>, AFLAG<sub>2</sub> e AFLAM<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>), patulina (PAT) e zearalenona (ZEA), tanto para produtos prontos para o consumo, como para matérias-primas utilizadas na fabricação de alimentos. Mencionando que os níveis de micotoxinas deveriam ser baixos (5 µg/kg) a fim de evitar que um produto contaminado seja comercializado ou consumido pela população, devendo assim ser desenvolvido melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem. Os teores de micotoxinas descrito nessa Resolução e seus limites máximos estabelecidos para cereais e produtos de cereais, arroz e derivados estão apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** - Limites máximos tolerados para micotoxinas (µg/Kg) em arroz dispostos na RDC nº 7 de 2011

Micotoxina	Ano			
	2011	2012	2014	2016
<b>Arroz beneficiado</b>				
DON	750	750	750	750
ZEA	-	200	200	100
<b>Arroz integral</b>				
ZEA	-	800	800	400
<b>Farelo de arroz</b>				
DON	-	-	1500	1000
ZEA	-	1000	1000	600
<b>Cereais e produtos de cereais</b>				
AFLAs	5	5	5	5
OTA	10	10	20	20
DON	-	1750	1250	750
ZEA	-	200	200	100

Fonte: ANVISA (2011)

Recentemente, o MAPA publicou a Instrução Normativa Nº 18 de 25 de junho de 2013, definindo para o Ano-Safra 2013/14 limites máximos de contaminantes para diversos alimentos. Entre estes, foi estabelecido para arroz polido e integral limites máximos para o somatório das AFLAs (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) de 5 µg/kg, deoxinivalenol 750 µg/kg e ocratoxina 10 µg/kg. Além disso, a resolução dispõe de previsão da quantidade de amostras a serem analisadas para determinações seguras.

Aproximadamente 99 países possuem legislação para presença de aflatoxinas em alimentos e/ou rações, sendo que, a população total desses países representa aproximadamente

87% da população mundial (VAN EGMOND, 2003). Em uma revisão sobre aflatoxinas e segurança alimentar na América do Sul (SCUSSEL, 2004), ressalta que inversamente ao que é adotado para os alimentos que tem destino a exportação, os alimentos destinados ao consumo interno não recebem a aplicação do mesmo alto padrão de qualidade. A Tabela 2.3, mostra a legislação para aflatoxinas adotada em alguns países.

**Tabela 2.3** - Legislação internacional para aflatoxinas em alimentos para o consumo humano (AFLAB<sub>1</sub>+ AFLAB<sub>2</sub>+AFLAG<sub>1</sub>+AFLAG<sub>2</sub>) em diferentes países

País	Alimentos para consumo humano ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Canadá	15
Cuba	5
Estados Unidos	20
México	20
Suécia	5
	AFB <sub>1</sub> : 2
União Européia	4

Fonte: CAST (2003).

O risco de contaminação de arroz e seus derivados após a colheita com fungos deterioradores e toxigênicos, os impactos da presença de seus metabolitos tóxicos a saúde humana e de animais de criação, além da legislação a ser observada para fins de comercialização interna e externa ao país, são razões extremamente fortes para estudar as operações de pós colheita e seus efeitos nos níveis de aflatoxinas ou outras micotoxinas neste grão.

---

---

**CAPITULO III**

**ARTIGO I - ESTUDO ANÁLITICO PARA A DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS  
EM ARROZ E SUAS FRAÇÕES**

---

---

## ESTUDO ANÁLITICO PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM ARROZ E SUAS FRAÇÕES

### RESUMO

Neste trabalho foi padronizado um método para extração simultânea das aflatoxinas (AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>) em arroz e suas frações a fim de diminuir o gasto com solventes, gerar menor quantidade de resíduos e permitir a quantificação por cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de fluorescência (HPLC-FL). Foram testados dois procedimentos de extração baseando-se na metodologia descrita por Soares; Rodrigues-Amaya (1989) modificado e método de QuEChERS. O método com maior percentual de recuperação, Soares; Rodrigues-Amaya (1989), foi padronizado e aplicado para quantificar aflatoxinas em arroz e suas frações, que foram submetidos a diferentes tipos de secagens e posterior armazenamento por 10 meses em silos de concreto. As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,99. Os limites de quantificação foram, 2 µg/kg; 0,6 µg/kg; 1,4 µg/kg e 1 µg/kg, para a AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub>, AFLAG<sub>2</sub>, respectivamente em HPTLC e 0,3 µg/kg para AFLAB<sub>1</sub> e AFLAG<sub>1</sub>, e 0,07 µg/kg para a AFLAB<sub>2</sub> e AFLAG<sub>2</sub> em HPLC-FL. O percentual de recuperações ficou entre 51 e 96% para AFLAB<sub>1</sub> na casca e AFLAB<sub>2</sub> no endosperma, em HPTLC, e entre 56 e 100% para AFLAB<sub>1</sub> na casca e AFLAG<sub>2</sub> no endosperma, em HPLC-FL, respectivamente. A AFLAG<sub>2</sub> foi encontrada em amostras de farelo (1,3 µg/kg) e casca (0,5 µg/kg), secos em sistema estacionário e na casca seca em sistema combinado (0,2 µg/kg). Todos os níveis detectados ficaram abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira.

Palavras chave: padronização de método, aflatoxinas, cromatografia, arroz.

## ABSTRACT

This work was standardized a method for simultaneous extraction of aflatoxins (AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> and AFLAG<sub>2</sub>) in rice and its fractions in order to reduce spending on solvents, generate less waste and allow quantification by thin layer chromatographyhigh performace (HPTLC) and high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FL). Two extraction procedures were tested based on the method described by Soares; Rodriguez-Amaya (1989) and QuEChERS method. The method with the highest percentage of recovery, Soares; Rodriguez-Amaya (1989), was standardized and applied to quantify aflatoxin in rice and its fractions, which were subjected to different types of drying and subsequent storage for 10 months in concrete silos. The calibration curves showed correlation coefficients above 0.99. The limits of quantification were 2 µg/kg; 0.6 µg/kg; 1.4 µg/kg and 1 µg/kg to AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub>, AFLAG<sub>2</sub>, respectively on HPTLC, and 0.3 µg/kg to AFLAB<sub>1</sub> and AFLAG<sub>1</sub>, and 0.07 µg/kg to AFLAB<sub>2</sub> and AFLAG<sub>2</sub> in HPLC-FL. The percentage of recoveries was between 51 and 96% for AFLAB<sub>1</sub> peel and AFLAB<sub>2</sub> in the endosperm, in HPTLC, and between 56 and 100% for AFLAB<sub>1</sub> peel and AFLAG<sub>2</sub> in the endosperm, HPLC-FL, respectively. The AFLAG<sub>2</sub> was found in the bran samples (1.3 µg/kg) and shell (0,5 µg/kg), and dried in a stationary system in the dry peel combined system (0,2 µg/kg). All levels detected were below the maximum limit established by Brazilian legislation.

Keywords: standardization method, aflatoxins, chromatography, rice.

## 1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFLAs) englobam um conjunto de compostos, de toxicidade decrescente da AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>, produzidos por espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*. Estes compostos ocorrem naturalmente em cereais, oleaginosas e especiarias, previamente contaminados por fungos que as produzem principalmente durante o armazenamento ou processamento. São associados a toxicose em humanos e animais de criação, cujos sintomas se caracterizam por vômitos, diarreia, perda de peso e câncer (ROCHA et al. 2014; SHEIBANI; GHAZIASKAR, 2009; ZAIN, 2011). Vários trabalhos têm relatado a presença dessas micotoxinas no arroz, embora seja em baixas concentrações, têm causado preocupações devido ao fato deste cereal ser um alimento de consumo diário para grande parte da população mundial (DORS, BIERHALS; BADIALE-FURLONG, 2011; MAJEED et al. 2013; REITER et al. 2010; TANAKA et al. 2007; ZHU et al. 2013).

Os procedimentos básicos de análise de aflatoxinas em produtos agrícolas estão fundamentados na solubilidade em diferentes solventes orgânicos, seguido por clarificação com agentes precipitantes e partição líquido – líquido. As técnicas mais usadas para detecção e quantificação dessas micotoxinas são cromatografia em camada delgada (TLC) ou de alta performance (HPTLC) (do inglês high performance thin layer chromatography), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (do inglês high-performance liquid chromatographic) com vários sistemas de detecção e ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) para a determinação de atividade da rho-quinase (FU, HUANG; MIN, 2008; SIRHAN, TAN; WONG, 2011). A determinação por HPLC apresenta vantagens como menor limite de detecção, menor exposição do analista, repetibilidade e possibilidade de automatização. No entanto, necessita de instrumentos caros para o monitoramento do analito e analistas experientes para operar e processar os resultados (DEGANI, CASS; VIEIRA; 1998). Ao contrário a TLC que é acessível e pode ser desenvolvida em laboratórios simples, além disso, vem ganhando eficiência ao dispor de placas comerciais com camadas mais finas e ser associada ao programa ImageJ, que permite quantificação da intensidade de fluorescência gerada por cada micotoxina, registrada em imagem fotográfica (HOELTZ et al. 2010).

A tendência atual na etapa de extração de contaminantes é buscar procedimentos que evitem ao máximo a geração de resíduos, assim muitos pesquisadores adotam o sistema QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) para a extração de diferentes micotoxinas em alimentos, no entanto, poucos são os relatos da sua utilização para extração de aflatoxinas de arroz e seus derivados com indicativos de eficiência (KOESUKWIWAT, SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2014). O procedimento de

Soares e Rodrigues–Amaya (1989), muito adotado para determinação de aflatoxinas em alimentos, apresenta recuperações que atendem aos requisitos de qualidade analítica em diferentes matrizes, garantindo a limpeza da amostra e separação adequada, mesmo empregando a determinação quantitativa em HPTLC (ARROYO-MANZANARES et al. 2014; CARVALHO et al. 2012; HACKBART, 2013).

Para avaliar a contaminação por aflatoxinas na dieta dados confiáveis são necessários, desencadeando uma constante busca por métodos exequíveis e confiáveis que permitam a quantificação simultânea de aflatoxinas em alimentos de consumo diário. Para isso, se faz necessário a padronização dos métodos antes do uso de rotina, o que propicia o cumprimento das leis que estabelecem níveis aceitáveis para o consumo e garantem a inocuidade aos consumidores (ANVISA, 2003, 2011, INMETRO, 2003; RIBANI et al. 2004).

Neste trabalho foi estudado a miniaturização da extração de aflatoxinas em arroz e suas frações, visando a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-FL) e cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) com auxílio do programa ImageJ. Além disso, o método padronizado foi utilizado para determinar aflatoxinas em arroz e suas frações, comparando dois tipos de secagens convencionalmente empregadas em indústrias beneficiadoras de grãos e sua influência ao longo de 10 meses de armazenamento.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Os padrões de AFLAs (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) com pureza  $\geq 98\%$ . A acetoneitrila e metanol (Backer) utilizados como fase móvel do sistema cromatográfico, com pureza superior a 99,9%, foram filtrados em filtro Millipore (Supelco, 58067), com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Todos os componentes da fase móvel foram previamente desgaseificados em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique, 1600 W). A água ultrapura foi obtida através do sistema Direct-Q UV3<sup>®</sup> de resistividade 18,2  $\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ , Millipore, Bedford, USA. O ácido acético glacial (pureza  $\geq 99\%$ ) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Foram utilizados celite (Nuclear), sulfato de amônio, clorofórmio e acetato de etila (Synth), cloreto de potássio e tolueno (Vetec) todos com pureza  $> 99\%$ , e ácido fórmico (Synth) com 85% de pureza.

As placas cromatográficas eram DC- Fertigfolien Alugram Xtra Sil G, 20 x 20 cm. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de fluorescência (HPLC-FL) da marca Shimadzu (Quioto, Japão), constituído por um sistema de bombas

(modelo LC-AT), forno, desgaseificador da fase móvel (modelo DGU), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i) e detector de fluorescência (modelo FL – 10AXL). A coluna cromatográfica empregada era Nucleosil, C18 (10 cm x 4,6 mm, 3 µm, Bellefonte, PA, USA). O controle do equipamento e tratamento dos dados foi feito pelo software LC Solution.

## 2.2 Preparo dos padrões

As soluções padrão de aflatoxinas foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em uma mistura de benzeno:acetonitrila (98:2 v/v). As concentrações teóricas das soluções estoque foram de 0,1 mg/mL para as AFLAs (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), separadamente. Esses padrões foram diluídos para o preparo de soluções trabalho, de forma a obter concentrações 10 µg/mL. As concentrações exatas destas soluções foram determinadas em espectrofotômetro (modelo Cary 100-Varian), em comprimentos de onda de 360 nm para a AFLAB<sub>1</sub> e 362 nm para as demais. Para o cálculo das concentrações (Equação 1) foram utilizados os valores de absorvidade molar (ε) 19800, 20900, 17100, 18200 mol<sup>-1</sup>/cm<sup>-1</sup> das AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>, respectivamente. Todas as soluções foram armazenadas a -18°C (AOAC, 2000).

$$\mu\text{g micotoxina.mL}^{-1} = \text{abs. PM. } 1000. \text{FC. } \varepsilon^{-1}. b^{-1} \quad (1)$$

Em que:

abs = valor da absorbância da solução padrão;

PM = peso molecular da micotoxina em estudo;

FC = fator de correção do instrumento;

ε = absorvidade molar característico da micotoxina em estudo, no comprimento de onda característico.

b = largura da cubeta (cm)

## 2.3 Amostras

Endosperma polido, farelo e casca de arroz foram avaliados nesse trabalho com relação a contaminação com as AFLAs B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. As amostras foram fornecidas pelo Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), localizado no município de Cachoeirinha-RS. Os grãos da classe longo fino foram colhidos na safra 2012, secos até 12% de umidade empregando secagem estacionária (30 dias e temperatura de 40 °C) e combinada (secagem intermitente com

temperatura de 70 °C, por 2h associado a secagem estacionária 16 dias a 40°C), seguindo-se de armazenamento em silos secadores de concreto por 10 meses. As amostras foram coletadas em 3 diferentes pontos do silo, ou seja, na parte inferior, média e superior, e beneficiadas em engenho de provas marca Zaccaria, separando-se as frações de endosperma, farelo e casca. As frações separadas foram acondicionadas em sacos de polietileno e enviadas ao laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da FURG, onde foram trituradas em moinho de martelos e peneiradas para obtenção de granulometria inferior a 32 mesh, com exceção das amostras de farelo que foram apenas peneiradas para tomada da fração com granulometria igual as demais, sendo mantidas sob congelamento até sua utilização.

## **2.4 Estabelecimento das condições cromatográficas**

### **2.4.1 HPLC-FL**

Os solventes empregados na fase móvel foram: água ultrapura acidificada com ácido acético glacial 1%, acetonitrila e metanol na proporção 60:8:32 (v/v/v) desgaseificado em banho ultrassônico. A vazão da fase móvel foi de 0,4 mL/min e a temperatura da coluna de 45°C. Para quantificação das aflatoxinas o resíduo seco resultante da extração foi ressuspensão em 1 mL de fase móvel e injetado manualmente no cromatógrafo. Para controle do equipamento e tratamento dos resultados foi utilizado o software LC Solution (HACKBART, 2013).

### **2.4.2 HPTLC**

A escolha da fase móvel para eluição das micotoxinas em HPTLC baseou-se na natureza química das quatro aflatoxinas e na polaridade da fase móvel, para cromatografia em fase normal. Foram testados as seguintes misturas: tolueno: acetato de etila: ácido fórmico nas proporções 30:6:0,5 e 3:2:1. A identificação das aflatoxinas foi realizada através da visualização da fluorescência em câmara escura sob 360 nm para excitação e do fator de retardamento ( $R_f$ ), estimado por meio da Equação 2 (CARVALHO et al. 2012).

$$R_f = \frac{d_r}{d_m} \quad (2)$$

Em que:

$d_r$  = distância, percorrida pelo analito em cm

$d_m$  = distância percorrida pelo eluente em cm.

Para aplicação das micotoxinas nas placas foram utilizados microseringas da marca Hamilton com capacidade para 25 µL. Nesse trabalho foi utilizado o programa computacional ImageJ para quantificação das aflatoxinas (HOELTZ et al. 2010).

## **2.5 Extração das Aflatoxinas**

A extração das AFLAs (B1, B2, G1 e G2) foi realizada empregando os procedimentos descritos por Soares; Rodrigues – Amaya (1989) e Heidtmann-Bemvenuti et al (2012), a fim de verificar qual método apresentava maior recuperação para posterior padronização. Para isso, foi realizado a recuperação apenas na matriz farelo, devido sua composição apresentar alto teor de lipídeos, quando comparado ao endosperma e casca, representando assim a pior condição para interferência.

### ***2.5.1 Extração pelo método de Soares; Rodrigues – Amaya (1989) modificado***

Foram pesados 10 g de amostra e adicionados 60 mL de solução de metanol: cloreto de potássio 4% na proporção de 9:1. A mistura foi agitada em blender por 2 min e posteriormente filtrada. Foram transferidos 30 mL do filtrado para um erlenmeyer, onde foram adicionados 30mL de sulfato de amônio 30%. Na mistura foram adicionados 1 cm<sup>3</sup> de celite, agitado levemente e deixado em repouso por 5 min. Após filtração, 30 mL do extrato foram transferidos para um funil de separação, adicionados de 30 mL de água destilada e particionados 3 vezes com 10 mL de clorofórmio. Cada 10 mL da fração clorofórmica foram acondicionados em frascos âmbar com tampa de rosca e o conteúdo seco em banho-maria a 80 °C por 25 min (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

### ***2.5.2 Extração pelo método QuEChERS***

Foram pesados 10 g de amostra em um erlenmeyer de 250 mL e adicionados 20 mL de água destilada e 20 mL de acetonitrila acidificada com 0,2 mL de ácido acético glacial. A mistura foi agitada em mesa horizontal (5 min/200 rpm) e após foram adicionados 1,5 g de sulfato de magnésio e 0,85 g de acetato de sódio, agitando por 5 min. O extrato foi centrifugado por 10 min a 1400 g e foram adicionados 0,3 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de celite em 6 mL do sobrenadante. A mistura foi agitada manualmente por 1 min. Foram coletados 3 mL do sobrenadante e seco em banho-maria a 60 °C. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL da fase móvel e centrifugado a 1400 g (Eppendorf Centrifuge 5410, Hamburg, Germany) (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al. 2012).

## 2.6 Validação do método HPLC-FL e HPTLC

Os parâmetros de desempenho do método de extração foram avaliados nos dois sistemas cromatográficos (HPLC-FL e HPTLC).

### 2.6.1 Curva analítica e linearidade

Para construção da curva no HPLC-FL soluções padrões foram preparadas em triplicata nas concentrações de 0,3; 2,5; 5,0; 8,0; 10,5 ng/mL para as AFLAB<sub>2</sub> e AFLAG<sub>2</sub> e 1,0; 6,0; 12,0; 16,0; e 20,0 ng/mL para as AFLAB<sub>1</sub> e AFLAG<sub>1</sub>. Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* LC Solution.

Na HPTLC as curvas foram construídas com variação entre 1,5 – 20 ng para AFLAB<sub>1</sub>; 0,5 – 20 ng para AFLAB<sub>2</sub>; 1,0 – 20 ng para AFLAG<sub>1</sub> e 0,8 – 20 ng para AFLAG<sub>2</sub>. Para quantificação foi utilizado o programa ImageJ que permite quantificar a intensidade de fluorescência emitida por cada composto, e os resultados da curva foram expressos em ng de aflatoxinas (HOELTZ et al. 2010; IBÁÑEZ-VEA et al. 2011; RIBANI et al. 2004).

### 2.6.2 Limite de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

Foram determinados o LOD e o LOQ do HPLC-FL através da injeção de soluções padrão em ordem decrescente de concentração, considerando o LOD a concentração correspondente ao pico que representava 3 vezes o sinal/ruído da linha de base do equipamento. O LOQ foi estimado a partir da concentração que geraria pico com relação 10 vezes o sinal/ruído.

Em HPTLC os limites de detecção e quantificação foram determinados aplicando padrões em concentrações decrescentes, sendo o limite de detecção representado pelo ponto que gerava menor fluorescência, mas que garantia a identidade do composto. Os LOD e o LOQ do método foram estimado a partir dos valores determinados no HPLC-FL e HPTLC, considerando as diluições realizadas durante o preparo do extrato contendo os analitos (INMETRO, 2003; RIBANI et al. 2004).

### 2.6.3 Precisão

Foi avaliado a precisão instrumental do HPLC-FL e da HPTLC, a partir de 10 determinações sucessivas de uma mistura de aflatoxinas, nas concentrações de 5,0 ng/mL para as AFLAB<sub>2</sub> e AFLAG<sub>2</sub> e 12,0 ng/mL para as AFLAB<sub>1</sub> e AFLAG<sub>1</sub> em HPLC-FL e 1,5 µg/mL para as AFLAs (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) em HPTLC. Os resultados foram expressos como coeficiente

de variação (CV) entre as concentrações obtidas após a realização da técnica cromatográfica (RIBANI et al. 2004).

#### **2.6.4 Recuperação**

A recuperação ou exatidão do método, foi determinada através da porcentagem de recuperação do compostos de interesse em amostras fortificadas (Equação 3). Amostras de endosperma, farelo e casca foram fortificadas com três níveis de uma mistura de aflatoxinas. Foram deixadas em repouso por 24 h para completa evaporação do solvente e posteriormente foram submetidas a extração. A fortificação das amostras utilizadas no HPLC-FL foi de 2,5; 5,0 e 10,0 ng/g de AFLAs (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) e na determinação em HPTLC 65,0; 130,0 e 320 ng/g de cada aflatoxina (ANVISA, 2003; RIBANI et al. 2004).

$$R (\%) = \frac{C1 - C2}{C3} \cdot 100$$

Equação 3

Em que:

C1 = concentração determinada na amostra fortificada.

C2 = concentração determinada na amostra não fortificada.

C3 = concentração determinada no padrão fortificação.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Condições cromatográficas**

Os parâmetros cromatográficos adotados para determinação em HPLC-FL permitiram separação das aflatoxinas, resultando em tempos de retenção de 12,5; 15,0; 18,5 e 22,4 min para AFLAG<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub> e AFLAB<sub>1</sub>, respectivamente e tempo total de corrida de 25 min, que não promovia o alargamento das bandas cromatográficas.

A fase móvel utilizada na técnica de HPTLC foi tolueno, acetato de etila e ácido fórmico na proporção 3:2:1, resultando em R<sub>f</sub> de 0,42; 0,38; 0,34 e 0,27, respectivamente para AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>.

#### **3.2 Método de extração**

Estudos preliminares sobre a recuperação das aflatoxinas foram realizadas através da extração pelo método QuEChERS e de Soares; Rodrigues – Amaya (1989), sobre a matriz farelo. Recuperações médias de 82% foram observadas para o método de Soares; Rodrigues –

Amaya, enquanto as recuperações pelo método QuEChERS foram menores que 40%, quando avaliado por HPLC-FL e HPTLC. A influência do solvente extrator, associado as etapas de limpeza, possivelmente tenham afetado nas recuperações, bem como em outros indicativos de confiabilidade do método.

Problemas em análise de aflatoxinas foram relatados por Beaver (1990), que constataram degradação dessas micotoxinas quando utilizaram para extração uma mistura de metanol-água, água – acetonitrila e com estas misturas acidificada com ácido acético. Essa degradação possivelmente tenha sido resultado da necessidade de maior tempo na etapa de evaporação do solvente. No caso do estudo realizado neste trabalho isso pode ter ocorrido com o método de QuEChERS ao avaliar sua recuperação.

### **3.3 Padronização do método de Soares e Rodrigues–Amaya (1989) para determinação das aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>)**

As curvas analíticas foram adequadas para quantificação das aflatoxinas pelos dois métodos em estudo, HPLC-FL e HPTLC, pois de acordo com a ANVISA (2003) e INMETRO (2003) os coeficientes de correlação ( $r$ ) devem igual a 0,99 e superior a 0,90, respectivamente. As equações das curvas, os coeficientes de correlação e a linearidade estão apresentados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** - Curvas analíticas, coeficientes de correlação e linearidade para cada aflatoxina em HPLC-FL e HPTLC

Micotoxinas	HPLC-FL			HPTLC		
	Curva Analítica ( $\mu\text{g/mL}$ )	r	Linearidade (ng/mL)	Curva Analítica (ng)	r	Linearidade (ng)
AFLAB <sub>1</sub>	$y = 1,51 \cdot 10^7 x - 12763,06$	0,9999	1 - 20	$y = 2,0671x + 25,441$	0,9902	3- 20
AFLAB <sub>2</sub>	$y = 2,06 \cdot 10^9 x - 36163,03$	0,9996	0,3 - 11	$y = 11,577x + 34,945$	0,9924	1 - 20
AFLAG <sub>1</sub>	$y = 7,39 \cdot 10^6 x - 10857,20$	0,9995	1 - 20	$y = 3,2764x + 28,503$	0,9918	2 - 20
AFLAG <sub>2</sub>	$y = 3,79 \cdot 10^8 x - 24237,35$	0,9943	0,3 - 11	$y = 6,5846x + 22,309$	0,9929	1,5 - 20

HPLC-FL – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência; HPTLC – Cromatografia em camada delgada de alta performace; r Coeficiente de correlação.

Os limites de detecção e quantificação proporcionado pelo HPLC-FL e HPTLC são adequados para determinação de aflatoxinas em arroz e suas frações, pois permitem a quantificação de cada analito dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira. De acordo com a RDC N.7 de 2011 são permitidos 5 µg/kg para as AFLAs (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) em alimentos para consumo humano. Os valores determinados de LOD e LOQ, podem ser observados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** - Limite de detecção e quantificação dos sistemas cromatográfico e do método

Micotoxinas	HPLC - FL				HPTLC			
	Instrumento		Método		Placa		Método	
	(ng/mL)		(µg/kg)		(ng)		(µg/kg)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
AFLAB <sub>1</sub>	0,4	1,2	0,1	0,3	0,9	3	0,6	2
AFLAB <sub>2</sub>	0,1	0,3	0,02	0,07	0,3	1	0,2	0,6
AFLAG <sub>1</sub>	0,4	1,2	0,1	0,3	0,6	2	0,4	1,4
AFLAG <sub>2</sub>	0,1	0,3	0,02	0,07	0,5	1,5	0,3	1

HPLC-FL – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência; HPTLC – Cromatografia de camada delgada de alta performance; LOD - Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.

Conforme esperado, o HPLC-FL, apresentou-se mais sensível que HPTLC, apresentando menores LOD e LOQ, independente da aflatoxina. No entanto a técnica HPTLC, também pode ser empregada para monitorar os contaminantes, pois pode detectar em concentrações inferiores aos limites estabelecidos pela legislação brasileira (RDC n. 7/2011). Observa-se que as AFLAs (B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>) apresentam maior fluorescência e, dessa forma, independente da técnica cromatográfica aplicada apresentam menor LOQ.

Os ensaios de precisão (Tabela 3.3) mostraram a dispersão dos resultados obtidos através de padrões analíticos determinados nos cromatogramas. Em análise de traços ou impurezas são aceitos coeficientes de variação de até 20%, e neste estudo fica demonstrado que as duas técnicas cromatográficas são precisas (RIBANI et al. 2004)

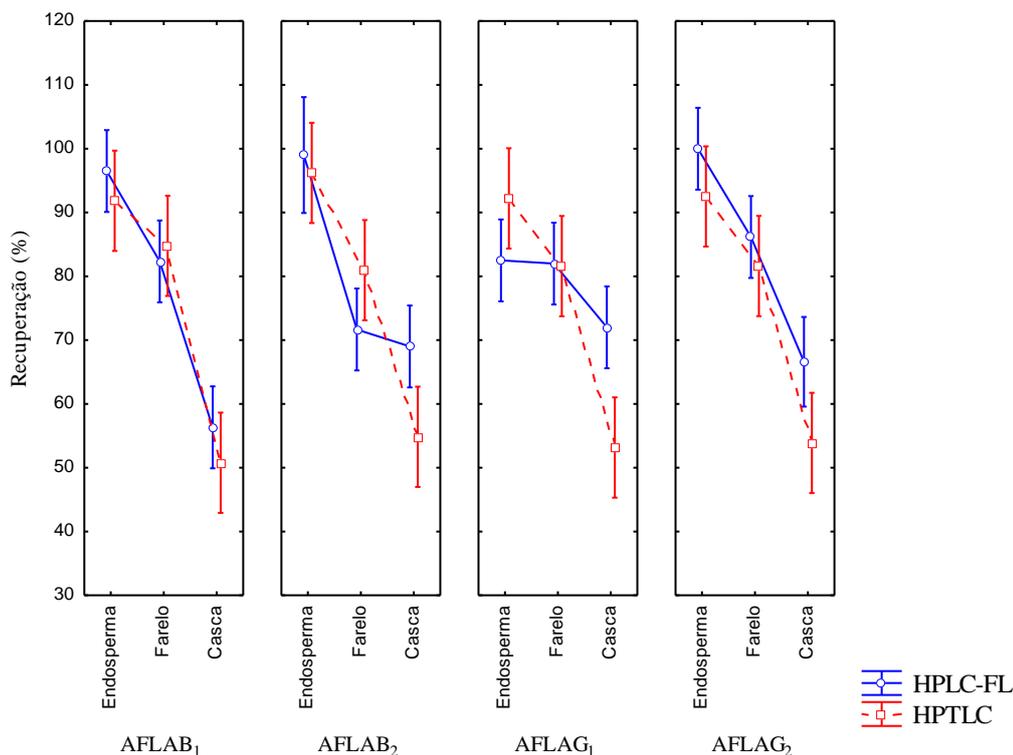
**Tabela 3.3** - Ensaio de precisão dos instrumentos cromatográficos

Micotoxinas	HPLC-FL		HPTLC	
	Concentração Média ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV	Concentração Média (ng)	CV
AFLAB <sub>1</sub>	0,0159	3,7	15,5702	5,4
AFLAB <sub>2</sub>	0,0050	9,8	15,0677	4,1
AFLAG <sub>1</sub>	0,0123	4,4	14,6696	5,1
AFLAG <sub>2</sub>	0,0051	8,5	14,6144	7,3

CV- Coeficiente de variação; HPLC-FL – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência; HPTLC – Cromatografia em camada delgada de alta performance.

Um dos indicativos de mérito que fornece a qualidade de um método é dado pelos percentuais de recuperação do analito a partir de amostras fortificadas (RIBANI et al. 2004). Independente dos instrumentos utilizados para quantificação das aflatoxinas, os maiores percentuais de recuperação foram observados para as amostras do endosperma polido, seguido de farelo e casca. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, devido à complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (RIBANI et al. 2004). Portanto, de acordo com os indicativos de eficiência recomendados pela ANVISA (2003), INMETRO (2003) e Ribani et al. (2004), os métodos foram adequados para quantificação de aflatoxinas (Figura 3.1). A menor recuperação observada na casca pode ter sido ocasionada pela complexidade da amostra que em função de sua riqueza em óxido de silício, associada a celulose pode absorver as micotoxinas (CARVALHO et al., 2012).

**Figura 3.1** - Média das recuperações das aflatoxinas determinadas em HPLC-FL e HPTLC



HPLC - FL – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência;

HPTLC – Cromatografia em camada delgada de alta performance

Com o desenvolvimento de equipamentos cromatográficos cada vez mais sofisticados, a HPTLC não tem sido muito utilizada, principalmente por ser considerada semiquantitativa. A detecção visual é a forma mais comumente utilizada e portanto depende da percepção do analista que pode causar variabilidade entre as medidas. No entanto, com o auxílio do programa computacional ImageJ, a quantificação da intensidade de fluorescência gerada por cada micotoxina pode ser realizada com mais segurança, melhorando a característica operacional para aproveitar a análise simultânea de várias amostras. Este programa foi desenvolvido a fim de auxiliar na área biomédica, no entanto, neste estudo foi possível verificar que o programa é uma ótima ferramenta para auxiliar em determinações em camada delgada. Além disso conferiu precisão a técnica, ampliando as possibilidades para aplicá-la no monitoramento de contaminação em cereais (HOELTZ et al. 2010).

O método de Soares; Rodrigues-Amaya (1989) empregava originalmente 50 g de amostra e utilizava 300 mL de uma mistura de metanol:cloreto de potássio (9:1), para extração das aflatoxinas. Embora este seja um método bastante utilizado para a determinação de micotoxinas em diferentes matrizes, sua desvantagem está relacionado a grande quantidade de

amostra e solventes necessários para a extração. Este fato dificulta a determinação de micotoxinas, uma vez que tanto a descarga de resíduos como o custo de solventes são desafios a serem enfrentados. O método de extração adaptado reduziu em 5 vezes os resíduos gerados, e apresentou boa performance analítica, podendo ser aplicado para determinar aflatoxinas em amplas faixas de concentrações por apresentar LOQ abaixo do máximo permitido pela legislação, independente da técnica cromatográfica aplicada.

### 3.4 Conteúdo de aflatoxinas no arroz armazenado e suas frações

O método de extração modificado de Soares empregando HPLC–FL foi aplicado para avaliação da ocorrência de aflatoxinas em frações de arroz provenientes de secagem estacionária e combinada e armazenamento durante 10 meses. As ocorrências registradas estão apresentadas na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** - Conteúdo de aflatoxinas em arroz e suas frações ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )

Fração do arroz	Tipo de secagem	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
Endosperma	Estacionária	nd	nd	<LOQ	nd
	Combinada	nd	nd	nd	nd
Farelo	Estacionária	nd	<LOQ	<LOQ	1,3 <sup>a</sup>
	Combinada	nd	nd	nd	<LOQ
Casca	Estacionária	<LOQ	<LOQ	nd	0,5 <sup>b</sup>
	Combinada	<LOQ	nd	nd	0,2 <sup>c</sup>

\* letras minúscula iguais na coluna não apresentam diferença significativa a nível de 5%; nd - não detectado; <LOQ – menor que o limite de quantificação.

Pode-se observar que as amostras não apresentaram contaminação com AFLAs (B1, B2 e G1), ou que só foram detectados abaixo do limite de quantificação do método. O endosperma polido não apresentou contaminação com nenhuma das aflatoxinas em estudo. As amostras de farelo e casca submetidos a secagem estacionária apresentaram maior contaminação com AFLA<sub>G2</sub>, indicando que o tipo secagem influencia os grãos armazenados, que são susceptíveis a períodos maiores de armazenamento o que pode comprometer a qualidade dos mesmos e ainda, conforme outros autores, a contaminação se inicia pelas frações mais externas (DORS, BIERHALS; BADIALE-FURLONG, 2011; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al. 2012).

A secagem estacionária é um dos procedimentos empregados comumente nas indústrias beneficiadoras de grãos por necessitar de baixos investimentos. No entanto possui baixa velocidade e desuniformidade de umidade na massa de grãos e essas características podem contribuir para o desenvolvimento fúngico, conforme indica os resultados deste levantamento (ELIAS, 2007)

Lutfullah; Hussain (2012) analisaram 20 amostras de arroz no Paquistão e encontraram um nível médio de contaminação com aflatoxinas de 4,6 µg/kg. Reiter et al., (2010) relataram que 24 de 81 amostras de arroz na Áustria apresentaram quantidades entre 0,45 e 9,86 µg/kg de AFLAB<sub>1</sub>. Ibáñez-Vea et al (2011) observaram que 9% das amostras recolhidas a partir de cereais da Espanha estavam contaminadas com AFLAB<sub>1</sub>, porém nenhuma com concentração acima de 0,20 µg/kg. Dors, Bierhals; Badiale-Furlong (2011), avaliaram a ocorrência de micotoxinas em arroz parboilizado no sul do Brasil e observaram que a AFLAB<sub>1</sub> estava presente em 9% das amostras analisadas com níveis variando de 11 a 74 µg/kg. Cabe ressaltar que em nenhum caso foi detectada a AFLAG<sub>2</sub> como neste estudo, o que também sugere a contaminação fúngica propiciada mas com alteração na manifestação do seu potencial toxigênico. Porém cabe lembrar que este estudo foi realizado sob condições ideais de secagem e armazenamento, realizado em uma planta experimental com toda infraestrutura necessária para manutenção da umidade baixa.

#### 4 CONCLUSÃO

A miniaturização do método de extração por Soares e Rodrigues-Amaya (1989) para quantificação por HPLC-FL e HPTLC reduzindo a quantidade de solvente, mostrou-se precisa e com indicativos de qualidade analítica para determinação de aflatoxinas em arroz e suas frações. Foi quantificado AFLAG<sub>2</sub> nas amostras de farelo (1,3 µg/kg), casca (0,5 µg/kg) que foram secos pelo método estacionário, bem como na casca combinada (0,2 µg/kg), sendo as maiores contaminações observadas nas frações decorrente da secagem estacionária.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 889, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, 2003.

ARROYO-MANZANARES, N.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. **Food Control**, n. 36, p. 94 e 101, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of International**. 17 th, CD-ROM, 2000.

BEAVER, R. W. Degradation of aflatoxins in common HPLC solvents. **Journal of high resolution chromatography**, v. 13, n. 12, 833–835, 1990.

CARVALHO, A. P. M. G.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Emprego de casca de arroz como adsorvente para execução de técnica de MSPD para determinar aflatoxinas em cebolas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n. 4, p. 630-7, 2012.

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, 2011.

ELIAS, M. C. **Pós-Colheita de Arroz: Secagem, armazenamento e qualidade**. Pelotas: Ed. UFPEL, 2007. 422p.

FU, Z.; HUANG, X.; MIN, S.; Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. **Journal of Chromatography A**, p 271–274, 2008.

IBÁÑEZ-VEA, M.; CORCUERA, L. A.; REMIRO, R.; MURILLO-ARBIZU, M. T.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E. Validation of a UHPLC-FLD method for the simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley. **Food Chemistry**, v. 127, p. 351–358, 2011.

HACKBART, H. C. S. **Biodegradação de Aflatoxinas**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, p. 1-6, 2012.

HOELTZ, M.; WELKE, J. E.; ISA BEATRIZ NOLL, I. B.; DOTTORI, H. A.; Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin b1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 43-47, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01, 2003.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. **Food Chemistry**, v. 153, p. 44 –51, 2014.

LUTFULLAH, G., HUSSAIN, A. Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. **Food Control**. v.23, n.1, p. 32 e 36, 2012.

MAJEED, S.; IQBAL, M.; ASI, M. R. IQBAL, S. Z. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 446 e 450, 2013.

REITER, E. V.; VOUK, F.; BÖHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. Aflatoxins in rice – A limited survey of products marketed in Austria. **Food Control**, v. 21, p. 988–991, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, M. E. B. FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159 e 165, 2014.

SHEIBANI, A.; GHAZIASKAR, H. S. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B1 and B2 from pistachio. **Food Control**, p. 124–128, 2009.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector. **Food Control**, p.1807 e 1813, 2011.

SOARES, L. M. V. , RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 72:22-6, 1989.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; TANAKA, M. K. K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 59–66, 2007.

ZAIN, M. E.; Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, n° 15, p. 129–144, 2011.

ZHU, Z.; LIU, G.; CHEN, Y.; CHENG, J. Assessment of aflatoxins in pigmented rice using a validated immunoaffinity column method with fluorescence HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 31, p. 252–258, 2013.

---

---

**CAPITULO IV**

**ARTIGO II - OPERAÇÕES DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO E OS TEORES  
DE AFLATOXINAS EM ARROZ**

---

---

## **OPERAÇÕES DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO E OS TEORES DE AFLATOXINAS EM ARROZ**

### **RESUMO**

Neste trabalho foi avaliado a influência das operações de pós-colheita nos níveis de aflatoxinas em arroz e suas frações, relacionando também com características físicas das amostras. Os grãos colhidos foram secos em sistema estacionário, intermitente e combinado e a ocorrência das aflatoxinas foi acompanhada ao longo de seis meses de armazenamento em silos de concreto. As aflatoxinas foram determinadas utilizando o método de Soares e Rodrigues-Amaya (1989), modificado e quantificado por HPLC-FL. O teor de aflatoxinas total após 6 meses de armazenamento foi maior no farelo, seguido de casca e endosperma. O farelo obtido de grãos secos em secador estacionário mostrou-se contaminado após 6 meses de armazenamento com níveis médios superiores a 25 µg/kg, respectivamente. Os dados reforçam que a secagem intermitente é a mais adequada para diminuir o risco de contaminação ao longo do armazenamento do grão.

Palavras chave: aflatoxinas, secagem, HPLC-FL, silos de concreto.

### **ABSTRACT**

This study evaluated the influence of post-harvest operations in the levels of aflatoxins in rice and its fractions, also relating to physical characteristics of the samples. The harvested grains were dried steady, intermittent and combined system and the occurrence of aflatoxins was monitored over six months storage in concrete silos. Aflatoxins have been determined using the method of Soares; Rodriguez-Amaya (1989), modified and quantified by HPLC-FL. The content of total aflatoxin after 6 months of storage was higher in the bran, endosperm and hull followed. The bran dry grain dryer stationary proved contaminated after 6 months of storage greater than 25 µg/kg, respectively average. These data reinforce the intermittent drying is the most appropriate to reduce the risk of contamination during the storage of grain.

Keywords: aflatoxins, drying, HPLC - FL, concrete silos.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil a produção de arroz se concentra no estado do Rio Grande do Sul e o cultivo é feito sob forma irrigada, o que pode favorecer o desenvolvimento fúngico aumentando a possibilidade de contaminação com micotoxinas. As aflatoxinas (AFLAs) são produzidas por *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e raramente por *Aspergillus nomius* e *Aspergillus tamari*, espécies que se desenvolvem principalmente durante o armazenamento de grãos (PEREIRA, CARVALHO; PRADO, 2002). As aflatoxinas englobam um conjunto de compostos furanocumarínicos conhecidos como AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub> (ROCHA et al. 2014), sendo que a primeira é classificada pela Agência Internacional de Investigação do Câncer, como a micotoxina mais tóxica e carcinogênica para seres humanos (IARC, 1993).

Muitos países estabelecem regras que limitam a quantidade máxima de aflatoxinas permitidas na alimentação humana e animal. Desta forma, é necessário que as cadeias produtivas sejam avaliadas quanto aos seus pontos críticos com relação a contaminação fúngica e manifestação de potencial toxigênico e adotem as melhores alternativas tecnológicas na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, para evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido ou, ao menos, que estejam abaixo dos limites seguros (BIANCHINI, 2003; HOELTZ et al. 2009; LIU, GAO; YU, 2006).

A presença de micotoxinas é menos comum em arroz quando comparado a outros cereais como trigo e milho, porém as ocorrências registradas indicam que o consumo diário pode representar riscos com danos crônicos a saúde, difíceis de serem associados a uma causa específica. Durante as operações de pós-colheita do arroz, a combinação de fatores como umidade, temperatura, tempo e condições físicas do grão, níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, nível de inóculo, prevalência de linhagens toxigênicas, presenças de impurezas podem favorecer a contaminação por fungos, principalmente do gênero *Aspergillus* (TANAKA et al. 2007). No entanto, dados sobre os efeitos das condições de secagem e sequência de armazenamento empregadas por empresas, na rotina nacional são relativamente escassos. Considerando que os fungos aflatoxigênicos podem invadir o arroz em diferentes fases da produção, o monitoramento e identificação dos pontos críticos na cadeia de produção e distribuição deste cereal e seus derivados, torna-se imprescindível (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; HOELTZ et al. 2009).

Além da avaliação da ocorrência das aflatoxinas é interessante estimar a contaminação fúngica, pois isto pode alterar o valor nutricional e tecnológico, podendo tornar-se menos acessível e menos adequado para comercialização. A contaminação fúngica pode ser estimada, a partir da aplicação de métodos indiretos como: determinação da atividade enzimática,

ergosterol, glicosamina e proteínas. Dentre elas, a determinação de glicosamina tem demonstrado ser um bom indicador para a estimativa de desenvolvimento fúngico em cereais (AIDDO et al.1981; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al. 2012; SOUZA et al. 2011)

Neste trabalho foi avaliada a influência das operações de secagem estacionária, intermitente e combinada, na ocorrência de aflatoxinas em arroz e suas frações, durante o armazenamento em silos de concreto, buscando correlacionar com outras alterações físicas e químicas nas amostras.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A acetonitrila e metanol (Backer) utilizados como fase móvel no sistema cromatográfico possuíam grau de pureza superior a 99,9%. Ambos foram filtrados em filtro Millipore (Supelco, 58067) com poros de 0,45 µm de diâmetro. Todos os componentes da fase móvel foram previamente desgaseificados em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique, 1600 W). A água ultrapura foi obtida através do sistema Direct-Q UV3<sup>®</sup> de resistividade 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup>, Millipore, Bedford, USA. O ácido acético glacial (pureza ≥ 99%) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Foi utilizado celite (Nuclear), sulfato de amônio e clorofórmio (Synth) e cloreto de potássio (Vetec) todos com pureza ao redor de 99%.

Para detecção das micotoxinas foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de fluorescência (HPLC-FL) da marca Shimadzu (Quioto, Japão), constituído por um sistema de bombas (modelo LC-AT), forno, desgaseificador da fase móvel (modelo DGU), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i) e detector de fluorescência (modelo FL – 10AXL). Como fase estacionária foi utilizada uma coluna cromatográfica modelo Nucleosil, C18 (com dimensões de comprimento e largura de 10 cm x 4,6 mm, respectivamente e 3 µm de diâmetro de partículas, Bellefonte, PA, USA). O controle do equipamento e tratamento dos dados foram feitos pelo software LC Solution.

### **2.2 Amostras**

O arroz da classe longo fino, produzidos em sistema irrigado, com umidade inicial próxima a 24%. Após a colheita (23/03/2013), os grãos foram levados para uma planta piloto na estação experimental do IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz), localizado no município de Cachoeirinha-RS, conforme ilustrado na Figura 4.1 (a). Os grãos foram descarregados em

moega (Figura 4.1 (b)), passados por etapa de limpeza (Figura 4.1 (c)), e submetidos a secagem estacionária, intermitente e combinada sendo posteriormente armazenados por um período de 6 meses.

Na secagem estacionária foi utilizado silo-secador de alvenaria armada, com capacidade estática para 4,4 toneladas (Figura 4.1 (a)), onde as condições psicrométricas do ar foram modificadas através da queima de gás liquefeito de petróleo (GLP) (Figura 4.1 (e)), utilizando o princípio do equilíbrio higroscópico para grãos de arroz, fixado o valor em 12,5% de teor de água. A secagem intermitente foi realizada em secador piloto da marca Ferrabil modelo SA1000-LAB com capacidade estática para 1 tonelada (Figura 4.1 (d)), utilizando temperatura do ar de secagem de 45°C até que os grãos atingissem teores de água entre 12 e 13%. Foi realizado ainda uma combinação entre as secagem intermitente e estacionária, sendo utilizado secagem intermitente para reduzir a umidade inicial dos grãos de 24 para 16%, e, em seguida, os grãos foram mantidos em secagem estacionária para redução até 12,5% de umidade.

Foram coletadas 3 amostras de cada silo, ou seja, no ponto inferior, médio e superior, nos meses de maio, agosto e novembro de 2013. Posteriormente beneficiadas pelo processo convencional de branco polido, feito em engenho de provas marca Zaccaria (Figura 4.1 (f)). As frações endosperma, farelo e casca foram armazenadas em sacos de polietileno sendo enviadas ao Laboratório de Micotoxinas e Ciências de Alimentos da FURG. As amostras das frações foram homogeneizadas e trituradas em moinhos de martelos até obtenção de granulometria inferior a 32 mesh. O esquema de secagem, armazenamento e beneficiamento do arroz pode ser observado na Figura 1. Cabe salientar que o armazenamento do grão segue sendo acompanhado.

**Figura 4.1** - Esquema das etapas de processamento do arroz



### 2.3 Condições cromatográficas

Os solventes empregados como fase móvel foram água ultrapura acidificada com ácido acético glacial 1%, acetonitrila e metanol na proporção 60:8:32 (v/v/v). Os parâmetros controlados na determinação cromatográfica foram vazão da fase móvel de 0,4 mL/min, temperatura da coluna de 45°C, resultando em tempo de retenção de 12,5; 15,0; 18,5 e 22,4 min para AFLAG<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub> e AFLAB<sub>1</sub>, respectivamente, e tempo total de corrida de 25 min. Para quantificação das aflatoxinas, o resíduo seco resultante da extração foi ressuspensão em 1 mL de fase móvel e injetado manualmente em HPLC-FL (HACKBART, 2013).

### 2.4 Extração de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>)

Foram pesados 10 g de amostra aos quais foram adicionados 60 mL de metanol:clorato de potássio 4% na proporção de 9:1. A mistura foi agitada em blender por 2 min e filtrada. Foram transferidos 30 mL do filtrado para um erlenmeyer, onde foram adicionados 30 mL de sulfato de amônio 30%. Foi adicionado 1 cm<sup>3</sup> de celite na mistura, agitado levemente, e deixado em repouso por 5 min. Após filtração, 30 mL do extrato foram transferidos para um funil de separação, adicionados 30 mL de água destilada e particionado 3 vezes com 10 mL de clorofórmio. Cada 10 mL da fração clorofórmica foram acondicionados em frascos âmbar com tampa de rosca e o conteúdo seco em banho-maria a 80 °C por 25 min (SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), para posterior quantificação em HPLC-FL.

### 2.5 Determinação do teor de glicosamina

Foram pesados 1 g de amostra e adicionados 6 mL de HCl 6 M. A mistura foi deixada em banho-maria a 100 °C por 2 h e posteriormente filtrada. Do filtrado foi transferido 1 mL para um balão volumétrico de 25 mL, neutralizado com NaOH 3 M, realizada titulação reversa com KHSO<sub>4</sub> 1%, e o volume do balão aferido com água destilada. Para quantificação do teor de glicosamina, 1 mL do extrato anterior foi transferido para um tubo de ensaio, juntamente com 1 mL de solução de acetil acetona em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,25 M (1 mL de acetil acetona em 50 mL de solução Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,25 M) sendo colocados em banho-maria a 100°C por 20 min. Após aquecimento, os tubos foram resfriados e adicionados de 6 mL de etanol e 1 mL de reagente de Erlich (2,67 g de *p*-dimetilaminobenzaldeído em 30 mL de etanol:ácido clorídrico 1:1, completando-se o volume em balão de 50 mL com água destilada). Os tubos com a mistura em reação foram colocados em estufa a 65 °C por 10 min. Após atingir temperatura ambiente a absorvância foi lida em espectrofotômetro a 530 nm (AIDDO et al.,1981).

## 2.6 Caracterização das amostras

O teor de umidade das amostras foi determinado por gravimetria de acordo com AOAC (2000).

A determinação de impurezas presentes nas amostras foi realizada a partir de análise granulométrica, sendo peneirados 100 g das amostras de arroz e 40 g das amostras de farelo e casca num conjunto de cinco peneiras com aberturas de malhas variando de 8; 12; 14; 24; 42 mesh e uma base. Em seguida, os conteúdos retirados de cada peneira foram avaliados quanto a presença de impurezas. Foi classificado como impureza, qualquer material diferente das frações do grão, como pedras insetos entre outros (GERMANI, BENASSI; CARVALHO, 1997).

## 2.7 Análise estatística dos resultados

Para o tratamento dos dados foi utilizado o programa computacional *Statistica 7.0* e *OriginPro 8*. A diferença de média de contaminação foi verificada pelo teste de ANOVA e utilizado Tukey, como teste Post Hoc.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Indicativos do método

O método de extração das aflatoxinas apresentou curvas padrão com coeficiente de correlação superior a 0,99. Os limites de quantificação foram de 0,3 µg/kg para as AFLAB<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, e 0,07 µg/kg para as AFLAB<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>, com quantificação em HPLC-FL. O percentual de recuperações foi maior no endosperma, variando entre 83% para AFLAG<sub>1</sub> e 100% para AFLAG<sub>2</sub>, e menor na casca com mínimo de 56% (AFLAB<sub>1</sub>) e máximo 72% (AFLAG<sub>1</sub>). Portanto o método permite quantificação de aflatoxinas abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

## 3.2 Aflatoxinas no arroz e suas frações

Dos 6 meses de armazenamento acompanhados obtiveram-se 81 amostras após beneficiamento resultando nas frações casca, endosperma polido e farelo. O conteúdo de aflatoxinas nas amostras foi quantificado e os resultados estão apresentados na Tabela 4.1. Cabe ressaltar que o intervalo de armazenamento foi considerado a partir de maio, pois a colheita ocorreu em março e a secagem efetuada antes tomou o tempo necessário para o grão atingir 12,5% de umidade.

**Tabela 4.1** - Aflatoxinas nas frações de arroz após armazenamento

		Aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) $\pm$ Desvio Padrão											
Fração do arroz	Tipo de secagem	AFLAB <sub>1</sub>			AFLAB <sub>2</sub>			AFLAG <sub>1</sub>			AFLAG <sub>2</sub>		
		1°**	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Endosperma	Estacionária	<LOQ	nd	nd	nd	nd	1,4 $\pm$ 0,15BC	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd
	Intermitente	<LOQ	nd	nd	nd	nd	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd
	Combinada	<LOQ	nd	nd	<LOQ	nd	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd
Farelo	Estacionária	1,3 $\pm$ 0,16b	<LOQ	<LOQ	0,6 $\pm$ 0,07Ab	0,5 $\pm$ 0,07Cb	14,5 $\pm$ 2,32Aa	<LOQ	<LOQ	13,7 $\pm$ 2,13Aa	nd	nd	<LOQ
	Intermitente	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,5 $\pm$ 0,03Ad	3,2 $\pm$ 0,09bBc	0,4 $\pm$ 0,06Cd	4,2 $\pm$ 0,46Aab	1,8 $\pm$ 0,14cd	4,9 $\pm$ 0,84Ba	nd	nd	nd
	Combinada	<LOQ	1,0 $\pm$ 0,15Bc	1,3 $\pm$ 0,16Ac	0,4 $\pm$ 0,07Ac	3,7 $\pm$ 0,30Ab	3,9 $\pm$ 0,39Bb	3,7 $\pm$ 0,68Ab	<LOQ	6,8 $\pm$ 1,30Ba	nd	nd	nd
Casca	Estacionária	<LOQ	1,2 $\pm$ 0,11Ba	1,2 $\pm$ 0,15Aa	<LOQ	<LOQ	1,4 $\pm$ 0,04BCa	<LOQ	<LOQ	<LOQ	nd	<LOQ	1,3 $\pm$ 0,25Aa
	Intermitente	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,7 $\pm$ 0,04Ca	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,3 $\pm$ 0,04Ab	0,6 $\pm$ 0,05Ba	0,5 $\pm$ 0,08Bab
	Combinada	<LOQ	1,5 $\pm$ 0,17Aa	<LOQ	0,5 $\pm$ 0,04Ab	0,5 $\pm$ 0,07Cb	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,4 $\pm$ 0,07Ab	1,6 $\pm$ 0,29Aa	0,5 $\pm$ 0,03Bb

\*\* Coleta das amostra, 1 – Imediatamente após secagem dos grãos a 12% de umidade, 2 – 3 meses de armazenamento, 3 – 6 meses de armazenamento; nd – não detectado; <LOQ - menor que o limite de quantificação do equipamento; Letras maiúscula iguais na coluna e minúsculas iguais na linha não diferem significativamente com nível de significância = 0,05

No endosperma polido foi detectado apenas AFLAB<sub>2</sub> em grãos submetidos a secagem estacionária após seis meses de armazenamento (1,4 µg/kg). Esses resultados indicam que em algum período do armazenamento fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* estavam viáveis na massa de arroz armazenada. Além disso, eles podem ter encontrado microclima no silo que se caracterizava como estressante, induzindo a manifestação do potencial toxigênico. Considerando que o arroz é o principal alimento de grande parte da população brasileira, consumido em grandes quantidades, a contaminação mesmo em baixos níveis, pode representar risco crônico a saúde da população e precisa ser evitado.

Ao contrário do endosperma, algumas amostras de farelo apresentaram contaminação com níveis acima do limite máximo de 5 µg/kg, estabelecido pela RDC n°7/2011 (ANVISA, 2011) e pela Instrução normativa n° 18, de 25 de junho de 2013 (MAPA, 2013), o que reforça que a contaminação é mais provável nas frações externas e gera a necessidade de monitorar o farelo para obtenção de óleo, elaboração de produtos alimentícios ou para produção de ração animal.

A distribuição de aflatoxinas no grão pode estar relacionado a estrutura física, onde a casca desempenha função de proteção do grão como um todo. Porém, em virtude desta não apresentar nutrientes suficientes para o desenvolvimento fungico e por possíveis micro rupturas na casca durante as operações de pós-colheita, os fungos possivelmente migrem para o farelo com conseqüente produção de micotoxinas, visto que a tensão de O<sub>2</sub> diminui nas porções internas representando estresse para o micro-organismo (CASTELLS et al. 2007; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al. 2012).

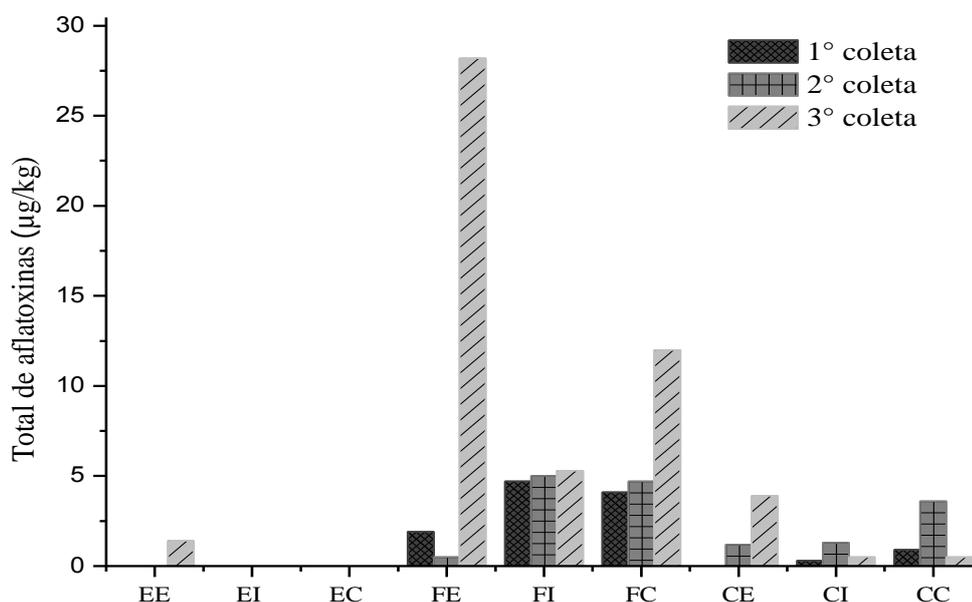
Com relação as amostras de casca, os níveis quantificados foram relativamente baixos, quando comparado as amostras de farelo. Embora a casca não seja utilizada na alimentação, esses níveis de contaminação podem migrar para o farelo e endosperma, quando submetido ao processo de parboilização, conforme mencionado por Coelho et al (1999); Dors, Pinto; Badiale-Furlong (2009).

A AFLAB<sub>2</sub> foi detectada em maior número nas amostras analisadas, correspondendo a 52%, enquanto a AFLAG<sub>2</sub> esteve presente em 26% e as AFLAG<sub>1</sub> e AFLAB<sub>1</sub> em 22%. Este perfil de contaminação não era esperado pois na maioria dos estudos que detectaram a ocorrência de aflatoxinas em cereais, normalmente a mais abundante é a AFLAB<sub>1</sub> (DORS, BIERHALS; BADIALE-FURLONG, 2011; REITER et al. 2010; TRUCKSESS et al. 2011; ZHU et al. 2013).

### 3.3 Influência do tipo de secagem e tempo de armazenamento nos níveis de aflatoxinas presentes no arroz

A Figura 4.2 mostra o conteúdo de aflatoxinas total (soma de 4 AFLAs) nas amostras de endosperma, farelo e casca, cuja matéria-prima original foi submetida a diferentes tipos de secagem.

**Figura 4.2** - Contaminação total com aflatoxinas nos diferentes tipos de secagem do grão



EE = endosperma estacionário; EI = endosperma intermitente; EC = endosperma combinado; FE = farelo estacionário; FI = farelo intermitente; FC = farelo combinado; CE = casca estacionário; CI = casca intermitente; CC = casca combinada

As amostras de casca e farelo avaliadas apresentaram contaminação com pelo menos uma das quatro aflatoxinas, com exceção da casca resultante da secagem estacionária, em que a contaminação ficou abaixo do limite de quantificação do método. De maneira geral, observa-se que o tempo de armazenamento contribuiu com a contaminação, pois as maiores concentrações foram observadas após 6 meses de armazenamento. Liu, Gao; Yu (2006), estudaram a influência do armazenamento no teor de aflatoxinas em arroz integral, por um período de 10 anos, e verificaram que existia relação clara entre o tempo de armazenamento e a contaminação com aflatoxinas.

As amostras de casca em geral apresentaram menores teores dos contaminantes quando empregada a secagem intermitente antes do armazenamento. Nas amostras de farelo e endosperma, decorrentes da secagem estacionária, após armazenamento prolongado, foram determinados os maiores níveis de aflatoxinas comparado as demais formas de secagens.

O tipo de secagem pode afetar a contaminação fúngica, não apenas durante a operação como também durante o armazenamento. A secagem estacionária é bastante utilizada nas indústrias beneficiadoras de grãos, pois não promove muitos danos físicos no grão, além de pequeno investimento para instalação. Sua desvantagem é a baixa velocidade de perda de umidade resultando em grãos com teores diferentes na massa armazenada no mesmo silo. Na secagem intermitente a operação ocorre em poucas horas (aproximadamente 4 h). O maior tempo utilizado na secagem estacionária pode ter contribuído com o desenvolvimento fúngico e consequente produção de aflatoxinas nas amostras de farelo durante armazenamento prolongado (ELIAS, 2002; ELIAS; OLIVEIRA, 2009).

Os resultados deste trabalho mostram que a secagem estacionária é recomendada quando os grãos são armazenados por pouco tempo, pois até 6 meses de armazenamento a contaminação por micotoxinas foi menor. Quando necessário armazenamentos mais prolongados sugere-se a utilização da secagem intermitente ou combinada, que apresentaram menores teores do contaminante ao longo do período de armazenamento avaliado até o presente.

Em países como o Brasil, onde o arroz faz parte da alimentação diária da população, as aflatoxinas podem estar relacionadas a danos inespecíficos na saúde humana, sem que haja possibilidade de associar a causa ao efeito, o que reforça a necessidade de avaliar a presença delas em alimentos de consumo diário.

Lima et al (2000) pesquisaram arroz com casca e suas frações (arroz brunido, farelo e palha) armazenados em silos metálicos, quanto a presença de aflatoxinas, e mesmo com a detecção do fungo *A. flavus* não foi verificado a presença de aflatoxinas nas amostras. Bianchini (2003) ao avaliar arroz com casca durante a secagem e o armazenamento em silo metálico quanto a presença de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona, verificou apenas a presença de zearalenona nas amostra, e além disso, isolou 137 culturas de *A. flavus* e apenas duas mostraram-se produtoras de AFLAB<sub>1</sub> e AFLAB<sub>2</sub>.

No entanto, tem sido documentado que a contaminação de cereais com micotoxinas pode ser resultado de armazenamento impróprio (SALEEMULLAH et al. 2006). Reddy et al (2009) encontraram elevada contaminação com aflatoxinas em amostras de arroz que foram armazenadas sob inapropriadas condições, na qual os grãos foram expostos a chuva e inundações. Da mesma forma, Totuja et al (2006) avaliaram o efeito do armazenamento

inadequado do arroz descascado encontrando arroz altamente contaminado com aflatoxinas com níveis variando de 60 a 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . A baixa contaminação por aflatoxinas nas amostras avaliadas neste trabalho, quando comparada aos resultados de outros estudos, possivelmente seja decorrente das secagens e armazenamentos terem sido realizadas sob condições de maior controle de umidade e temperatura.

Cabe lembrar que neste estudo o arroz foi seco empregando três técnicas comumente utilizadas na cadeia produtiva do arroz mas em condições ideais, ou seja, os grãos foram submetidos as secagens logo após a colheita, sendo em seguida armazenados em silos de concreto, todos os equipamentos utilizados para limpeza, transferência de amostra, secadores, silos, controladores de chama e conseqüente temperatura, estavam em perfeitas condições, permitindo que os diferentes tipos de secagens fossem realizados com os melhores parâmetros para cada operação.

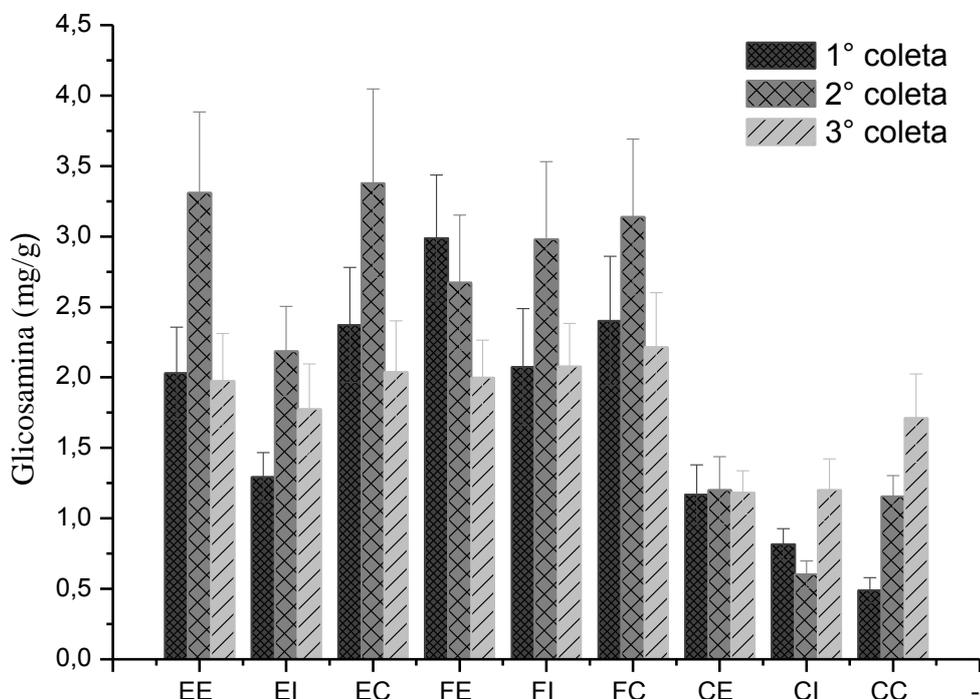
Conforme Liu et al (2006) boas práticas de secagem e armazenamento de grãos de arroz inteiros, são fundamentais para reduzir a contaminação de arroz com aflatoxinas. De acordo com Tanaka (2007), no Japão a contaminação fúngica e produção de aflatoxinas raramente ocorre em arroz armazenado, pois o nível de umidade destes locais é de 70 a 75%, a temperatura é menor que  $15^{\circ}\text{C}$ , o conteúdo de umidade dos grãos varia de 13 – 14% e a atividade de água é de 0,65 – 0,70%.

### **3.4 Glicosamina como indicativo de contaminação fúngica em arroz**

A equação da curva de calibração de glicosamina foi  $y = 39,7.x$ , na qual x corresponde a concentração em  $\text{mg}/\text{mL}$  e y a absorvância, obtendo-se 0,9954 como coeficiente de correlação. O limite de quantificação foi de 26  $\mu\text{g}$  e a recuperação de 112% (HEIDTMANN-BEMVENUTI, 2011)

A fim de relacionar o desenvolvimento fúngico com a produção de aflatoxinas, foi determinado o teor de glicosamina (Figura 4.3) nas mesmas amostras que foram determinadas as aflatoxinas.

**Figura 4.3** - Glicosamina das diferentes frações do grãos provenientes de diferentes sistemas de secagens



EE = endosperma estacionário; EI = endosperma intermitente; EC = endosperma combinado; FE = farelo estacionário; FI = farelo intermitente; FC = farelo combinado; CE = casca estacionário; CI = casca intermitente; CC = casca combinada

Os maiores níveis de glicosamina no farelo e endosperma, deve-se possivelmente a maior disponibilidade de nutrientes e condições físicas adequadas para o desenvolvimento fúngico. A passagem do fungo para o farelo possivelmente seja decorrente de rupturas na casca durante as operações de pós-colheita.

Os teores de glicosamina apresentaram-se variando ao longo do armazenamento, embora sem um comportamento crescente ou decrescente definido, o que sugere que as espécies fúngicas se alteram ao longo do período, como já tem sido mencionado na literatura (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

A segunda coleta apresentou os maiores percentuais de glicosamina, pois a coleta registrada em agosto corresponde ao primeiro intervalo de armazenamento quando possivelmente havia uma adaptação da micota as novas condições de umidade, atividade de água e temperatura.

Os farelo e o endosperma obtidos de grãos secos em diferentes condições e tempos de armazenamento apresentaram maiores teores de glicosamina indicando que os microrganismos migram para o interior do grão ou pertencem a espécies que produzem glicosamina de forma diferenciada dos que ficam na superfície do grão. Tanto no farelo como no endosperma os maiores teores de glicosamina foram observados na segunda coleta, isso possivelmente tenha ocorrido devido a coleta registrada em agosto corresponder ao primeiro intervalo de armazenamento quando possivelmente havia uma adaptação da micota as novas condições de umidade, atividade de água e temperatura. Esse período também coincidiu com aquele período em que houve detecção de aflatoxinas. Podendo ter havido neste período uma condição de estresse para a micota toxigênica e/ou as espécies fúngicas eram diferentes dos outros períodos.

É importante ressaltar, que a contaminação com fungos não indica necessariamente contaminação com aflatoxinas, pois as micotoxinas podem permanecer nos grãos mesmo que o fungo não se encontre mais viável (TANAKA, 2000).

### **3.5 Caracterização física das amostras**

Foi realizada a análise granulométrica a fim de determinar o percentual de impurezas nas amostras, buscando relacionar com o desenvolvimento fúngico e conteúdo de aflatoxinas verificados. Os resultados obtidos para as três coletas não foram significativos. As operações de classificação, executadas antes do processo de secagem, contribuíram para a limpeza das amostras, pois não foram encontrados insetos, pedras, ou qualquer outro tipo de material estranho. Esse tipo de cuidado é importante porque o produto que contém impurezas (detritos vegetais e corpos estranhos) é portador de maior quantidade de microrganismos o que representa condições que intensificam sua deterioração, pois as matérias estranhas apresentam teores de umidade mais elevados que o produto sob a mesma condição de armazenagem (FARONI; SILVA, 2008).

Com relação ao teor de umidade das amostras, de maneira geral, pôde-se observar que foi menor na casca (com média de 9,6%) quando comparado ao endosperma (12,8%) e farelo (11,5%). A umidade do substrato e a umidade relativa constituem pontos críticos na produção das aflatoxinas. De acordo com observações de Diener; Davis (1996) a produção máxima de aflatoxina, em grãos de cereais, ocorre em umidade de 25% a 30 °C. A umidade relativa mínima necessária para desencadear a contaminação fungica é de 83 a 88%. Estes resultados sugerem que a baixa umidade na casca contribuiu para a baixa incidência de contaminação fúngica (Figura 3).

Oyebanji; Efiuvwere (1999) avaliaram a influência da umidade no desenvolvimento dos fungos *A. flavus*, *A. niger*, *P. purpurogenum* e *F. moniliforme* e a produção de AFLAB<sub>1</sub>, em arroz naturalmente contaminado com fungos. Observaram que a população fúngica do arroz quando utilizado umidade de 13% diminuiu significativamente durante a estocagem. As amostras com umidade maior ou igual a 20% apresentaram níveis elevados (>20 ppb) de AFLAB<sub>1</sub>. No presente estudo os maiores níveis de aflatoxinas foram verificados no farelo proveniente da secagem estacionária após 6 meses de armazenamento. Ao contrário do verificado com os teores de glicosamina que foram diminuindo no mesmo período. Isso mostra que a micota está passando por uma situação de estresse que não foi causado possivelmente pela umidade ou atividade de água.

#### 4 CONCLUSÃO

O farelo é a fração do grão que apresentou maior risco de contaminação com aflatoxinas, especialmente após seis meses de armazenamento. A secagem estacionária propiciou os maiores níveis de contaminação ao longo do armazenamento, com níveis médios de 14,5 e 13,7 µg/kg de AFLAB<sub>2</sub> e G<sub>1</sub> após 6 meses de armazenamento. Os níveis de glicosamina variaram de forma independente das aflatoxinas detectadas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

AIDDO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 6-9, 1981.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. Horwitz, W. (Ed.). 17 th ed. Gaithersburg, 2000.

BECKER-ALGERI, T. A.; HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; BADIALE-FURLONG, E. Thermal treatments and their effects on the fumonisin B1 level in rice. **Food Control**, n. 34, p. 488 e 493, 2013.

BIANCHINI, A. **Estudo comparativo entre manejos de secagem e armazenamento de arroz na incidência de fungos toxigênicos e micotoxinas**. 2003. 103f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**. n.119, p. 140–146, 2007.

CASTELLS, M.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARIN, S. Distribution of total aflatoxins in milled fractions of hulled rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.7, p. 2760–2764, 2007.

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.

DIENER, U. H.; DAVIS, N. D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 56, p. 1390-1393, 1966.

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, 2011.

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**, n. 42, p. 433–437, 2009.

ELIAS, M. C. **Armazenamento e conservação de grãos em média e pequenas escalas**. 3ª Edição. Pólo de Modernização Tecnológica em Alimentos da Região Sul. Pelotas: Ed. UFPEL, 2002. 218p.

ELIAS, M.; OLIVEIRA, M. **Aspectos Tecnológicos e Legais na Formação de Auditores Técnicos do Sistema Nacional de Certificação de Unidades Armazenadoras**. Pelotas: Ed. Santa Cruz, 2009. 430p.

FARONI, L. R. D. A.; SILVA, J. S. S. (2008) **Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados**. In: Silva J. S. Secagem e armazenamento de produtos agrícolas. Viçosa, p. 371 – 406.

GERMANI, R.; BENASSI, V. T.; CARVALHO, J. L. V. **Métodos de avaliação de grão e farinha de trigo**. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. 84 p. (Documentos, n. 28).

HACKBART, H. C. S. **Biodegradação de Aflatoxinas**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. **Efeito do emprego de fungicidas no desenvolvimento e manifestação do potencial toxigênico de *Fusarium graminearum* em arroz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, p. 1-6, 2012.

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E.A.L.; NOLL, I.B.. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, 2009.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins** (Vol. 56). Lyon France: World Health Organization. 1993.

LIMA, C. A. P.; ORSI, R. B.; DILKIN, CORRÊA, P. B. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. *Ciência Tecnologia Alimentos*, v. 20, n. 1, 2000.

LIU, Z.; GAO, J. B.; YU, J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. **Journal of Stored Products Research**, n. 42, p. 468–479, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa nº 18, de 25 de junho de 2013. **Escopo mínimo de contaminantes que deve ser monitorado por cultura agrícola**. D.O.U., 27/06/2013 - Seção 1. 2013.

OYEBANJI, A. O.; EFIUVWERE, B. Growth of spoilage mould and aflatoxin B1 production in naturally contaminated or artificially inoculated maize as influenced by moisture content under ambient tropical condition. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 209-217, 1999.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim Ceppa**, v. 20, n. 1, p.141-156, 2002.

REDDY, K. R. N., REDDY, C. S., MURALIDHARAN, K. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 27–31, 2009.

REITER, E. V.; VOUK, F.; BÖHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. Aflatoxins in rice – A limited survey of products marketed in Austria. **Food Control**, n. 21, p. 988–991, 2010.

ROCHA, M. E. B.; FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, n. 36, p. 159 e165, 2014.

SALEEMULLAH IQBAL, A., KHALIL, I. A., SHAH, H. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 699–703, 2006.

SOARES LMV, RODRIGUEZ-AMAYA DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**,72:22-6, 1989.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciência e Agrotecnologia*. v.35, n.6, 2011.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; TANAKA, M. K. K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 59–66, 2007.

TOTEJA, G. S., MUKHERJEE, A., DIWAKAR, S., SINGH, P., SAXENA, B. N., SINHA, K. K., ET AL. Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination of parboiled rice samples collected from different states of India: A multi-centre study. **Food Additives e Contaminants: Part A**, v. 23, n. 4, p. 411–414, 2006.

TRUCKSESS, M.W., ABBAS, H.K., WEAVER, C.M., SHIER, W.T., 2011. Distribution of aflatoxins in shelling and milling fractions of naturally contaminated rice. **Food Additives & Contaminants Part A**, v. 28, p. 1076–1082, 2011.

ZHU, Z.; LIU, G.; CHEN, Y.; CHENG, J. Assessment of aflatoxins in pigmented rice using a validated immunoaffinity column method with fluorescence HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 31, p. 252–258, 2013.

---

---

**CAPITULO V**

**ARTIGO III - COCÇÃO DO ARROZ E OS TEORES RESIDUAIS DE  
AFLATOXINAS**

---

---

## COCÇÃO DO ARROZ E OS TEORES RESIDUAIS DE AFLATOXINAS

### RESUMO

Neste trabalho foi avaliado a influência do processo de cocção do arroz no teor das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. Amostras de arroz branco polido foram fortificadas com aflatoxinas em três diferentes concentrações (4, 5 e 6 µg/kg) e submetidas a tratamento térmico em micro-ondas, chapa elétrica e autoclave. Para extração foi utilizado o procedimento de Soares; Rodrigues-Amaya (1989) e para quantificação HPLC-FL. A maior degradação foi observada quando o arroz foi cozido em micro-ondas com média de 80% de redução para cada uma das aflatoxinas, enquanto que o tratamento em chapa elétrica ocorreu a degradação de 34% para AFLAB<sub>1</sub>, 13% para AFLAB<sub>2</sub>, 57% para AFLAG<sub>1</sub> e 29% para AFLAG<sub>2</sub>. O tratamento em autoclave, degradou 29% da AFLAG<sub>1</sub> e 3% da AFLAG<sub>2</sub>, as AFLAs B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> não foram afetadas por este tratamento.

Palavras-chave: aflatoxinas, tratamento térmico, degradação, HPLC-FL

### ABSTRACT

This study evaluated the influence of the rice cooking process the content of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>. Polished white rice samples were spiked with aflatoxins in three different concentrations (4, 5 and 6 µg / kg) and subjected to heat treatment in microwave, electric griddle and autoclave. For the extraction procedure was used Soares; Rodriguez-Amaya (1989) for quantitation and HPLC-FL. The most degradation was observed when the rice was cooked in a microwave with an average 80% reduction for each of aflatoxins, whereas treatment in the hot plate was 34% for degradation AFLAB<sub>1</sub>, 13% to AFLAB<sub>2</sub>, 57% to AFLAG<sub>1</sub> and 29% for AFLAG<sub>2</sub>. The autoclave treatment, 29% of degraded AFLAG<sub>1</sub>, 3% to AFLAG<sub>2</sub> and AFLAS B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> were not affected by this treatment.

Keywords: aflatoxin, heat treatment, degradation, HPLC-FL

## 1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFLAs) são metabólitos secundários produzidos por várias espécies do fungo *Aspergillus* (HWANG, CHUN; LEE, 2004). Dentre as principais aflatoxinas estão a AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>, sendo a primeira o mais potente carcinógeno natural conhecido e a micotoxina mais frequente produzida pelas cepas toxigênicas de *Aspergillus*. As doenças provocadas por exposição a aflatoxinas são conhecidos como aflatoxicoses, porém nem sempre reconhecida como patologia específica, pois os sintomas agudos são semelhantes ao desencadeado por diversos tipos de contaminantes. Nos níveis crônicos os sintomas são relacionados a donos hepáticos, incluindo a carcinogenicidade (ROCHA et al. 2014; ZAIN, 2011).

As AFLAs são produzidas sob condições ideais de umidade e temperatura, em grãos ricos em carboidratos, como, amendoim, milho, trigo e arroz. A Food and Agricultural Organization (FAO, 2004) estima que pelo menos 25% do grãos de cereais do mundo estão contaminados por micotoxinas, incluindo as aflatoxinas. Embora esforços continuem no sentido de definir maneiras para o controle de micotoxinas, medidas práticas não foram adequadamente implementadas, tais como recomendar formas de preparo que minimizem o risco (CACCIAMANI et al. 2007; HOELTZ et al. 2009; ZHANG et al. 2011).

As aflatoxinas são compostos estáveis, resistente ao calor e solúveis em solventes orgânicos, dessa forma são difíceis de serem degradadas em alimentos, mesmo após tratamento térmico (ROCHA et al. 2014). A principal forma de exposição a micotoxinas, por humanos e animais, se dá pela ingestão de alimentos contaminados. Nesse sentido, atenção deve ser dada a alimentos consumidos diariamente pela população, como o arroz, uma vez que este comportamento propicia a exposição crônica (BECKER-ALGERI et al. 2013; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

O uso de tratamento térmico com objetivo de reduzir parcialmente ou totalmente a contaminação com aflatoxinas, pode ser uma alternativa para a degradação desses compostos. Pesquisas mostram que no caso do amendoim e milho, a prática convencional de tostagem tem reduzido o nível de contaminação em mais que 40% (LEE et al. 1969; SARAJEEWA, 1990; SIMIONATO; TAHA, 2001; WALKING, 1979) e quando torrado em forno micro-ondas a redução chega acima de 90% (PRADO; OLIVEIRA, 1996).

Em virtude das potentes propriedades cancerígenas e tóxicas das aflatoxinas, muitos países vem estabelecendo regras que limitam a quantidade máxima permitida na alimentação humana e animal. No Brasil em 2011, a Anvisa estabeleceu a RDC N°7 que diminui os níveis permitidos e amplia os limites para alimentos à base de cereais e seus derivados, com destaque

para o arroz que não estava considerado na legislação anterior. Além disso, mais recentemente através Instrução Normativa N° 18 de 25 de junho de 2013 do MAPA, definindo para o Ano-Safra 2013/14, foi estabelecido limites para micotoxinas em arroz, incluindo as aflatoxinas. No entanto, os limites se referem a grãos e seus produtos crus e não se tem a partir disto informes sobre o efeito do preparo doméstico nos níveis realmente ingeridos do contaminante pela população. Importante ressaltar que, segundo dados da CONAB (2012), são consumidos 57 kg/ano per capita de arroz.

Neste trabalho, foi avaliada a estabilidade de padrões das AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub> e delas presentes em arroz branco polido, aos efeitos dos tratamentos térmicos normalmente realizados em ambiente doméstico, ou seja, cozimento em chapa elétrica, sob pressão e em micro-ondas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Arroz branco polido, foi adquirido no comércio local da cidade de Rio Grande/RS. A acetonitrila e metanol (Backer) utilizados como fase móvel do sistema cromatográfico, com pureza superior a 99,9%, foram filtrado em filtro Millipore (Supelco, 58067) com poros de 0,45 µm de diâmetro. Todos os componentes da fase móvel foram previamente desgaseificados em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique, 1600 W). A água ultrapura foi obtida através do sistema Direct-Q UV3<sup>®</sup> de resistividade 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup>, Millipore, Bedford, USA. O ácido acético glacial (pureza ≥ 99%) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Foi utilizado celite (Nuclear), sulfato de amônio e clorofórmio (Synth) e cloreto de potássio (Vetec), todos com pureza aproximada de 99%.

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de fluorescência (HPLC-FL) para identificação e quantificação das aflatoxinas, da marca Shimadzu (Quioto, Japão), constituído por um sistema de bombas (modelo LC-AT), forno, desgaseificador da fosse móvel (modelo DGU), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i) e detector de fluorescência (modelo FL – 10AXL). Foi utilizada uma coluna cromatográfica modelo Nucleosil, C18 (10 cm x 4,6mm, 3 µm, Bellefonte, PA, USA). O controle do equipamento e tratamento dos dados foram feitos através do software LC Solution.

### 2.3 Preparo dos padrões

As soluções padrão de aflatoxinas foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em uma mistura de benzeno: acetonitrila (98:2 v/v). As concentrações das soluções estoque foram de 0,1 mg/mL para as AFLAs (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), separadamente. Esses padrões foram diluídos de forma a obter concentrações igual a 10 µg/mL. As concentrações exatas destas soluções foram determinadas em espectrofotômetro, utilizando comprimentos de onda de 360 nm para a AFLAB<sub>1</sub> e 362 nm para as demais. Para o cálculo das concentrações foram utilizados os valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) 19800, 20900, 17100, 18200 mol<sup>-1</sup>/cm<sup>-1</sup> das AFLAs (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), respectivamente (AOAC, 2000). Todas as soluções foram secas e armazenadas a -18°C.

### 2.4 Estabilidade térmica dos padrões de aflatoxinas

Foram avaliados os efeitos dos tratamentos térmicos em autoclave, micro-ondas e chapa elétrica sobre a degradação das AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>. Foi adicionado, em frascos âmbar, 1 mL de uma mistura de padrões de AFLAs contendo 12 ng/mL para AFLAB<sub>1</sub> e AFLAG<sub>1</sub> e 5 ng/mL para AFLAB<sub>2</sub> e AFLAG<sub>2</sub>. As soluções em cada frasco foram secas sob atmosfera de N<sub>2</sub>, e submetidos a diferentes condições de tratamento térmico, conforme descrito na Tabela 5.1. Posteriormente, o resíduo seco, resultante de cada tratamento foi ressuspensão em 1 mL de fase móvel e injetado no HPLC-FL. O percentual de degradação foi calculado, pela relação entre a quantidade de aflatoxinas adicionadas inicialmente aos frascos, com a quantidade restante após tratamento térmico.

**Tabela 5.1** - Tratamentos térmicos dos padrões das AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>

Tratamento	Variáveis
Micro-ondas	1' 40 W
	5' 40 W
	1' 100 W
	5' 100 W
Autoclave	10' 0,5 kgf/cm <sup>2</sup>
	30' 0,5 kgf/cm <sup>2</sup>
	10' 1,1 kgf/cm <sup>2</sup>
	30' 1,1 kgf/cm <sup>2</sup>
Chapa elétrica	10' 50 °C
	30' 50 °C
	10' 150 °C
	30' 150 °C

' = minutos

## 2.5 Cocção do arroz por diferentes métodos

Amostras de arroz branco polido foram fortificadas artificialmente com 4; 5 e 6 µg/kg de cada aflatoxina (AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>) e deixadas em repouso por 24 h, a fim de garantir que todo o solvente fosse evaporado.

O arroz foi submetido ao processo de cocção em micro-ondas, autoclave e chapa elétrica, de acordo com as seguintes condições: 20 g de amostra; 0,2 g de NaCl; 0,4 g de óleo de soja comercial e 50 mL de água, com exceção do tratamento em micro-ondas, na qual a quantidade de água utilizada foi 180 mL.

Para a cocção convencional (chapa elétrica) o arroz foi cozido por 10 min à temperatura de aproximadamente 100°C, até que toda a água adicionada inicialmente tivesse sido absorvida pelos grãos ou evaporada. A cocção sob pressão foi realizada em autoclave e neste processo o arroz foi cozido sob pressão igual 1,1 kgf/cm<sup>2</sup> por um intervalo de 2,5 min. Durante a cocção em micro-ondas foi utilizado 10 min e potência de 100 W. Todos os tratamentos térmicos foram realizados comparativamente a um controle sem contaminação. Os percentuais de degradação das aflatoxinas foram estimados pela diferença entre os níveis iniciais dos contaminantes e os residuais determinados após os tratamentos (BECKER-ALGERI et al. 2013).

## 2.6 Determinação das aflatoxinas

Foram pesados 10 g de amostra e adicionados 60 mL de metanol: cloreto de potássio 4% na proporção de 9:1. A mistura foi agitada em blender por 2 min e posteriormente filtrada. Foram transferidos 30 mL do filtrado para um erlenmeyer, onde foram adicionados 30 mL de sulfato de amônio 30%. Foram adicionados 1 cm<sup>3</sup> de celite na mistura, agitado levemente e deixando em repouso por 5 min. Após filtração, 30 mL do extrato foi transferido para um funil de separação, adicionados 30 mL de água destilada e particionado 3 vezes com 10 mL de clorofórmio. Cada 10 mL da fração clorofórmica foram acondicionados em frascos âmbar com tampa de rosca e o conteúdo seco em banho-maria a 80 °C por 25 min (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989, com modificações).

A quantificação das aflatoxinas foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de fluorescência. Os solventes empregados na fase móvel foram: água ultrapura acidificada com ácido acético glacial 1%, acetonitrila e metanol na proporção 60: 8: 32 (v/v/v). As demais características do método foram vazão da fase móvel de 0,4 mL/min, temperatura da coluna de 45 °C, resultando em tempo de retenção de 12,5; 15,0; 18,5 e 22,4 min para AFLAG<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub> e AFLAB<sub>1</sub>, respectivamente, e tempo total de corrida de 25 min. Para quantificação das aflatoxinas, o resíduo seco resultante da extração foi ressuspensão em 1 mL de fase móvel e injetado manualmente no cromatógrafo. Para controle do equipamento e tratamento dos resultados foi utilizado o *software* LC Solution (HACKBART, 2013). As concentrações de aflatoxinas nas amostras foram estimadas em base seca.

## 2.7 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do programa Statistica 7.0, utilizando ANOVA para comparação das médias de degradação de cada AFLA (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) e para comparação das condições dos tratamento em micro-ondas, autoclave e chapa elétrica. Foi utilizado teste de Tukey com 95% de confiança, para verificar quais amostras que apresentavam diferença significativa.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira parte do estudo os padrões de micotoxinas foram submetidos as condições de cocção doméstica na forma livre, sendo utilizado valores extremos de temperatura, pressão, tempo e potência a fim de verificar como cada variável contribuía para a degradação destes compostos quando utilizado micro-ondas, autoclave e chapa elétrica para cocção dos alimentos

e, assim, estimar os parâmetros mais eficientes para degradação das aflatoxinas no arroz. Os percentuais de degradação para cada tratamento estão apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2** - Degradação de padrões de aflatoxinas sob diferentes tratamentos térmicos

Tratamento térmico		Degradação das aflatoxinas (%)			
		AFLAB <sub>1</sub>	AFLAB <sub>2</sub>	AFLAG <sub>1</sub>	AFLAG <sub>2</sub>
Micro-ondas	1' 40 W	0 <sup>Ec</sup>	19,0 <sup>CDEb</sup>	24,1 <sup>Ea</sup>	0 <sup>Ec</sup>
	5' 40 W	0 <sup>Eb</sup>	17,0 <sup>DEa</sup>	20,2 <sup>Ea</sup>	0 <sup>Eb</sup>
	1' 100 W	14,2 <sup>Eb</sup>	15,1 <sup>DEb</sup>	34,8 <sup>DEa</sup>	0 <sup>Ec</sup>
	5' 100 W	3,1 <sup>Ec</sup>	12,0 <sup>EFb</sup>	25,4 <sup>Ea</sup>	0 <sup>Ec</sup>
Autoclave	10' 0,5 kgf/cm <sup>2</sup>	27,0 <sup>EDab</sup>	18,4 <sup>CDEb</sup>	35,6 <sup>EDa</sup>	23,8 <sup>Db</sup>
	30' 0,5 kgf/cm <sup>2</sup>	47,4 <sup>BCb</sup>	43,0 <sup>Ab</sup>	80,4 <sup>Aa</sup>	70,4 <sup>Aa</sup>
	10' 1,1 kgf/cm <sup>2</sup>	15,0 <sup>EFb</sup>	2,5 <sup>Ec</sup>	31,2 <sup>Ea</sup>	0 <sup>Ec</sup>
	30' 1,1 kgf/cm <sup>2</sup>	23,4 <sup>EDc</sup>	16,4 <sup>DEc</sup>	77,9 <sup>ABa</sup>	52,5 <sup>Bb</sup>
Chapa elétrica	10' 50 °C	39,1 <sup>DCb</sup>	24,8 <sup>BCDc</sup>	55,8 <sup>BCDa</sup>	25,8 <sup>CDbc</sup>
	30' 50 °C	56,6 <sup>Bab</sup>	43,9 <sup>Ab</sup>	68,5 <sup>ABCa</sup>	46,5 <sup>Bb</sup>
	10' 150 °C	52,4 <sup>BCa</sup>	28,7 <sup>BCb</sup>	52,9 <sup>DCa</sup>	26,3 <sup>CDb</sup>
	30' 150 °C	88,2 <sup>Aa</sup>	34,0 <sup>ABb</sup>	87,7 <sup>Aa</sup>	32,3 <sup>Cb</sup>

Letras maiúscula iguais na coluna e minúsculas iguais na linha não diferem significativamente com nível de significância = 0,05; ' = minutos.

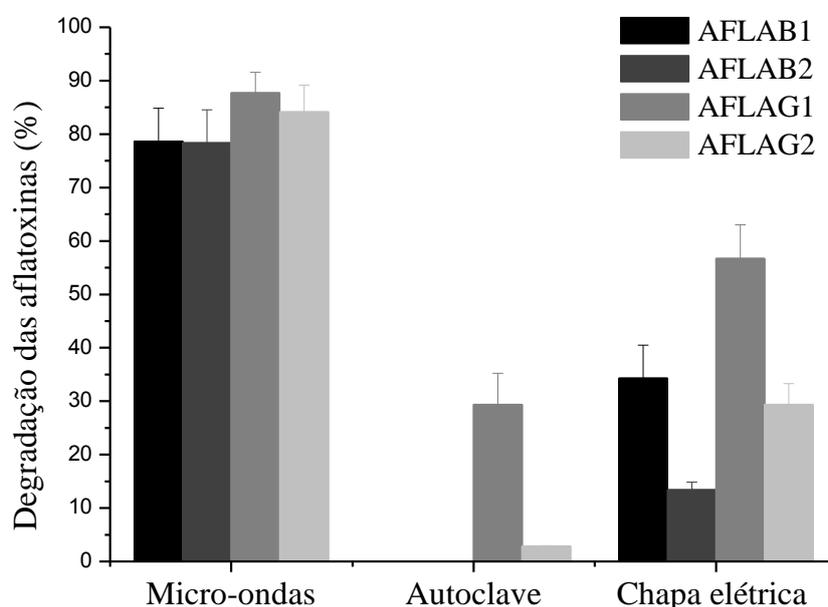
No tratamento térmico em micro-ondas a maior degradação foi para as AFLAB<sub>2</sub> e AFLAG<sub>1</sub>, não sendo afetados significativamente pelo tempo ou potência do tratamento. Em autoclave e chapa elétrica o tempo foi uma variável significativa para degradação, pois em 30 min de exposição ao tratamento, maior percentual de degradação foi observado para todas as aflatoxinas. Tanto a pressão da autoclave como a temperatura da chapa elétrica só foram significativos frente a 30 min de tratamento térmico, sendo que a pressão agiu negativamente sobre a degradação das aflatoxinas e a temperatura apresentou relação positiva. No tempo de 10 min nenhuma das variáveis foi significativa. Entre as aflatoxinas avaliadas, a AFLAG<sub>1</sub> apresentou maior degradação independente do tratamento, indicando menor estabilidade térmica.

Gonzalez, Mattusch; Wennrich, (1998) estudaram a influência da temperatura na degradação das aflatoxinas. O efeito do tratamento térmico foi avaliado a partir da imersão de uma solução de aflatoxinas em banho a 100 °C em diferentes intervalos de tempo. Os resultados

mostraram que em 3 min foi atingido 20% de degradação tanto para AFLAG<sub>1</sub> quanto para AFLAB<sub>2</sub>. Maior degradação (50%) foi observada em tratamento a 100°C por 40 min. Semelhante aos resultados desse trabalho, pois as degradações das aflatoxinas foram maiores quando utilizado maior intervalo de tempo frente aos tratamentos térmicos.

O arroz branco polido fortificado artificialmente em três níveis com uma mistura das aflatoxinas submetidas a cocção em micro-ondas, autoclave e chapa elétrica, tem suas degradações apresentadas na Figura 5.1.

**Figura 5.1** - Influência do tipo de cocção do arroz na degradação de aflatoxinas



Os condições de tempo, potência, pressão e temperatura utilizados para cocção do arroz foram estabelecidos como sendo os necessários para que o arroz apresentasse textura adequada para os hábitos de consumo nacional, ou seja, mais próximo visualmente do que é utilizado no preparo doméstico. Por isso, o tempo e quantidade de água empregados em cada processo foram diferentes, sendo utilizados 10 min para cocção em micro-ondas e chapa elétrica e 2,5 min para autoclave. Além disso, a quantidade de água utilizada para cocção do arroz em micro-ondas foi 3,5 vezes maior que nos demais tratamentos.

A maior redução de aflatoxinas no arroz foi observada durante o tratamento em micro-ondas, com aproximadamente 80% de degradação para todas, seguido pela cocção em chapa elétrica com percentuais de degradação entre 13 e 57% dos teores iniciais. A cocção em autoclave não afetou as AFLAs B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, no entanto degradou as AFLAs G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em 29 e 3%,

respectivamente. Independente do tratamento térmico utilizado para cocção do arroz, a AFLAG<sub>1</sub>, apresentou maior degradação, como observado no experimento com as soluções de padrões.

Park et al (2005) relataram que cozinhar arroz fortificado com AFLAB<sub>1</sub> pelo método convencional (chapa elétrica), degradou em média 34% da quantidade inicial, sendo o mesmo observado neste estudo.

Becker-Algeri et al (2013) avaliaram o efeito do tratamento térmico do arroz, sobre a contaminação com fumonisina B<sub>1</sub> mas não foi registrada redução significativa quando o arroz foi submetido a autoclave. Semelhante ao observado neste trabalho, que entre os tratamentos térmicos aplicados, a menor degradação foi observada para o arroz cozido em autoclave, onde apenas AFLAG<sub>1</sub> foi degradada. No entanto, resultados contrários foram obtidos por Park; Kim (2006) que relataram obter degradação entre 78 e 88% para AFLAB<sub>1</sub> em arroz submetidas ao cozimento sob pressão.

Simionato; Sylos (2004), avaliaram o efeito do processo de cozimento sobre os teores de AFLAB<sub>1</sub> e Ocratoxina A em arroz branco polido contaminados artificialmente, e submetidos a cocção convencional, com excesso de água e em micro-ondas. Para os três processos o tempo de cocção foi de 9 min. A redução mais elevada foi encontrada para o arroz cozido em excesso água (89,1%) seguido pela cocção convencional (82,3%) e, finalmente, por micro-ondas (72,5%). Próximo aos resultados encontrado neste trabalho para o tratamento em micro-ondas, porém contrário ao observado no tratamento convencional, que apresentou degradação entre 13 e 57%.

Rehana et al. (1979), também estudaram o efeito da cocção convencional, com água em excesso e sob pressão, sobre as concentrações de AFLAB<sub>1</sub> em amostras de arroz artificialmente e naturalmente contaminadas. A cocção sob pressão resultou em média reduções na contaminação de 70,7 e 70,5% para o amostras de arroz artificialmente e naturalmente contaminadas, respectivamente. Cocção convencional por 30 min resultou em uma redução média de 47,5% para as amostras naturalmente contaminadas e 49,0% para artificialmente contaminadas. Cocção em excesso de água resultou em perdas de toxina mais elevados, com reduções médias de 75,7 e 74,5% para o artificialmente e naturalmente contaminados, respectivamente. Rehana et al. (1979), também detectaram a presença de AFLAB<sub>1</sub> na água residual para este tipo de tratamento. Novamente os resultados diferem com relação a cocção sob pressão, pois nesse trabalho a cocção em autoclave foi a que menos degradou as aflatoxinas, enquanto Rehana et al encontraram degradações próximo a 70%.

O efeito de diferentes tratamentos térmicos sobre a degradação de micotoxina tem sido relatado em vários estudos, com degradações desde 0 até 100%, e muitas vezes apresentando resultados contraditórios. Dessa forma, os resultados sugerem que outros fatores influenciam na degradação de aflatoxinas, quando submetidas a tratamento térmico, conforme os dados obtidos e os encontrados na literatura.

Segundo Buser; Abbas (2002) o teor de água livre é um fator determinante para degradação das aflatoxinas, pois é necessária para hidrolisar o anel lactona durante o tratamento térmico. Hwang; Lee (2006) avaliaram a influência do teor de água na degradação das aflatoxinas através da análise de Sujebi (sopa com flocos de trigo) e pão cozido a vapor, dois produtos tradicionais na culinária Coreana. A degradação foi da ordem de 43% no pão, enquanto na sopa de Sujenbi, não foi detectado aflatoxinas após processo. Os autores justificaram que essa diferença estava relacionada principalmente a água livre durante o tratamento térmico. Fato este que pode ajudar a explicar os resultados obtidos nesse trabalho, onde a quantidade de água utilizada para cozinhar arroz em micro-ondas foi de 3,6 vezes maior que nos demais tratamentos.

Além disso, a matriz sobre a qual se encontram as aflatoxinas é outra variável importante, indicando que a degradação das aflatoxinas em alimentos naturalmente contaminados pode ser mais complexa e demorada, quando comparado a alimentos artificialmente contaminado, por estarem ligados as macromoléculas do alimento de forma diferente e assim mais protegidos contra a degradação (BASSAPA; SHANTHA, 1996).

Os tratamentos térmicos diminuíram os níveis iniciais de aflatoxinas, porém não evitariam a exposição caso se consumisse grandes quantidades do alimento, pois o tratamento de gelatinização funciona de forma similar a uma diluição do contaminante. No entanto, outros experimentos envolvendo variáveis que possam afetar estes compostos precisam ser realizados, para que se possa recomendar formas de preparo mais seguras para redução do risco.

#### **4 CONCLUSÃO**

A análise dos padrões de aflatoxinas indicou que o tempo é a principal variável para degradação das micotoxinas. A maior degradação das aflatoxinas no arroz foi resultado do tratamento em micro-ondas, apresentando aproximadamente 80% de redução. Todos os tratamentos térmicos utilizados para cocção do arroz, causaram degradação de pelo menos uma das quatro aflatoxinas (AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>) em estudo. Sendo a AFLAG<sub>1</sub> a mais sensível aos tratamentos térmicos aplicados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of International**. 17 th, CD-ROM, 2000.

BASSAPA, C., SHANTHA, T. Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds-a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 95 e107, 1996.

BECKER-ALGERI, T. A.; HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; BADIALE-FURLONG, E. Thermal treatments and their effects on the fumonisin B1 level in rice. **Food Control**, n. 34, p. 488 e 493, 2013.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**. n.119, p. 140–146, 2007.

BUSER, M. D., ABBAS, H. K. Effects of extrusion temperature and dwell time on aflatoxin levels in cottonseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2556–2559, 2002.

CACCIAMANI, J. L. M.; PERES, G. L.; BUFFON, J. G.; BADIALE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. **Boletim da CEPPA**. v. 25, n.1, p.157-164, 2007.

CAST (Council of Agricultural Science and Technology). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. **Task Force Report**, n.139, EUA: CAST; 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) **Acompanhamento da safra brasileira: safra 2011/2012**. Sétimo levantamento – abril de 2012. Brasília. Disponível em:<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_04\\_11\\_15\\_04\\_18\\_boletim\\_abril\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_11_15_04_18_boletim_abril_2012.pdf)>. Acesso em: abr 2012.

DIENER, U. H.; DAVIS, N. D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 56, p. 1390-1393, 1966.

GONZALEZ, M. P.; MATTUSCH, J.; WENNRICH, R. Stability and determination of aflatoxins by high-performance liquid chromatography with amperometric detection, **Journal of Chromatography A**, 828, p. 439–444, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO – 2004). **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e00/y5499.HTM>> Acesso em: nov.2012.

HACKBART, H. C. S. **Biodegradação de Aflatoxinas**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E.A.L.; NOLL, I. B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v.39, n.3, 2009.

HWANG, J. H.; LEE, K. G.; Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, v. 98, p.71–75, 2006.

LEE, L.S.; CUCULLU, A.F.; FRANZ, O.A.; PONS, W.A. Destruction of aflatoxins in peanuts during dry and oil roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.17, p.451-453, 1969.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa nº 18, de 25 de junho de 2013. **Escopo mínimo de contaminantes que deve ser monitorado por cultura agrícola**. D.O.U., 27/06/2013 - Seção 1. 2013.

PARK, J. W., CHOI, S. Y., HWANG, H. J., KIM, Y.B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished Rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 305-314, 2005.

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.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S. Efeito do forno de microondas na destruição de aflatoxinas em amendoim. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.56, n.2, p.21-24, 1996.

ROCHA, M. E. B.; FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, n. 36, p. 159 e 165, 2014.

REHANA, F.; BASAPPA, S.C.; MURTHY, V.S. Destruction of aflatoxin in rice by different cooking methods. **Journal of Food Science and Technology**, v.16, p.111-112, 1979.

SAMARAJEEWA, U.; SEN, A.C.; COHEN, A.; WEI, C.A. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **Journal of Food Protection**, v.53, p.489-501, 1990.

SIMIONATO, E. M. R. S.; SYLOS, c. m. Effect of Cooking on the Levels of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Rice. **Brazilian Journal Food Technology**, v.7, n.2, p.167-171, 2004.

SOARES LMV, RODRIGUEZ-AMAYA DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, p. 22-6, 1989.

TAHA, O.G.; FONSECA, T.T.; SYLOS, C.M. Efeito da radiação microondas na redução dos teores de aflatoxinas em amendoim. **Alimentos e Nutrição**, v.12, p.63-179, 2001.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; TANAKA, M. K. K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 59–66, 2007.

TRUCKSESS, M.W., ABBAS, H.K., WEAVER, C.M., SHIER, W.T., 2011. Distribution of aflatoxins in shelling and milling fractions of naturally contaminated rice. **Food Additives & Contaminants Part A**, v. 28, p. 1076–1082, 2011.

WALTKING, A.E. Fate of aflatoxin during roasting and storage of contaminated peanut products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.54, p.533-539, 1971.

ZAIN, M. E.; Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, n° 15, p. 129–144, 2011.

ZHANG, C.; MA, Y.; ZHAO, X.; ZENG, Y.; WANG, F. Kinetic modelling of aflatoxins B1 conversion and validation in corn, rice, and peanut during thermal treatments. **Food Chemistry**. v. 129, p. 1114 –1119, 2011.

ZHU, Z.; LIU, G.; CHEN, Y.; CHENG, J. Assessment of aflatoxins in pigmented rice using a validated immunoaffinity column method with fluorescence HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 31, p. 252–258, 2013.

---

---

## **CAPITULO VI**

### **COCLUSÃO GERAL E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

## CONCLUSÃO GERAL

Foi possível modificar e padronizar o método de extração das aflatoxinas (AFLAB<sub>1</sub>, AFLAB<sub>2</sub>, AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub>) descrito por Soares e Rodrigues-Amaya (1989), diminuindo o gasto com solventes, geração de resíduos e permitindo quantificação por cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de fluorescência (HPLC-FL). Os limites de quantificação foram inferiores ao máximo permitido pela legislação brasileira que é de 5 µg/kg para o somatória das quatro aflatoxinas e os percentuais de recuperação foram maiores no endosperma, seguido do farelo e casca.

Nas frações de arroz submetidas a secagem estacionária foram encontrados os maiores teores de contaminação após 6 meses, sendo a AFLAB<sub>2</sub> a micotoxina detectada em maior número de amostras (52%) seguido por AFLAG<sub>2</sub> (26%) e AFLAG<sub>1</sub> e AFLAB<sub>1</sub> (22%). A fração mais contaminada foi o farelo com níveis acima dos estabelecidos na legislação brasileira.

Todos os tratamentos térmicos utilizados para cocção do arroz, causaram degradação de pelo menos uma das quatro aflatoxinas. O maior percentual de degradação foi obtido com tratamento em micro-ondas, que resultou em 80% de redução. O tratamento em autoclave foi o que resultou em menor redução degradando apenas a AFLAG<sub>1</sub> e AFLAG<sub>2</sub> em 29 e 3%, respectivamente.

Dessa forma, para obter arroz com menor contaminação com aflatoxinas, se faz necessário o emprego de secagem intermitente logo após a colheita, podendo ou não os grãos serem armazenados por períodos até 6 meses, conforme resultados deste estudo. Além disso, quando associado a cocção em micro-ondas os níveis de aflatoxinas podem reduzir em aproximadamente 80%, mostrando assim ser a forma mais adequada para o processamento e consumo de arroz.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 889, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 274, de 15 de outubro de 2002. Controle sanitário na área de alimentos. **Diário Oficial da União** – D.O.U de 16/10/2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

AIDDO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 6-9, 1981.

AKIYAMA, H; GODA, Y; TANAKA, T; TOYODA, M. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. **Journal of Chromatography**. A, v. 932, p. 153-157, 2001.

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

ARROYO-MANZANARES, N.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. **Food Control**, n. 36, p. 94 e 101, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. Horwitz, W. (Ed.). 17 th ed. Gaithersburg, 2000.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M. F. P. M.; GOMES, R. A. R.; VALENTINI, S. R. T. **Conservação de Grãos**. Campinas: Fundação Cargill, 1998. P. 15-191.

BASSAPA, C., SHANTHA, T. Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds—a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 95 e107, 1996.

BEAVER, R. W. Degradation of aflatoxins in common HPLC solvents. **Journal of high resolution chromatography**, v. 13, n. 12, 833–835, 1990.

BECKER-ALGERI, T. A.; HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; BADIALE-FURLONG, E. Thermal treatments and their effects on the fumonisin B1 level in rice. **Food Control**, n. 34, p. 488 e 493, 2013.

BIANCHINI, A. **Estudo comparativo entre manejos de secagem e armazenamento de arroz na incidência de fungos toxigênicos e micotoxinas.** 2003. 103f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BIEHL, M.L; BUCK , W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **J Food Protection.** v. 50, p. 1058-1073, 1987.

BOK, J. W.; KELLER, N. P.; LAE, A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryotic Cell.** v.3, p.527-535, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n.34/76 da Comissão Nacional de Normas e padrões para alimentos. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] União,** Brasília, pt. I, p. 710, 19 jan. 1977.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology.** n.119, p. 140–146, 2007.

BUSER, M. D., ABBAS, H. K. Effects of extrusion temperature and dwell time on aflatoxin levels in cottonseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 50, p. 2556–2559, 2002.

CACCIAMANI, J. L. M.; PERES, G. L.; BUFFON, J. G.; BADIALE-FURLONG, E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. **Boletim da CEPPA.** v. 25, n.1, p.157-164, 2007.

CARBONE I., RAMIREZ-PRADO J.H., JAKOBEK J.L., HORN.J.W. , Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster, **BMC Evolutionary Biology,** 7 (111): p. 1-12, 2007.

CARVALHO, A. P. M. G.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Emprego de casca de arroz como adsorvente para execução de técnica de MSPD para determinar aflatoxinas em cebolas. **Revista Instituto Adolfo Lutz,** v.71, n. 4, p. 630-7, 2012.

CAST (Council of Agricultural Science and Technology). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. **Task Force Report,** n.139, EUA: CAST; 2003.

CASTELLS, M.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARIN, S. Distribution of total aflatoxins in milled fractions of hulled rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.55, n.7, p. 2760–2764, 2007.

CASTRO, L; VARGAS, EA . Determining aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in maize using florisisil clean up with thin layer chromatography and visual and densitometric quantification. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 21,n. 1, p. 115-122, 2001.

CHEEKE, P. R; SHULL, L.R. Mycotoxins In Natural Toxicants in feeds and poisonous plants. USA: **AVI publishing company.** p. 393-471. 1985.

CIGIC, I. K., PROSEN, H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, 10(1), p. 62–115, 2009.

CNOSSEN, A.G.; JIM\_ENEZ, M. J.; SIEBENMORGEN, T.J. Rice fissuring response to high drying and tempering temperatures. **Journal of Food Engineering**. 59, p. 61– 69, 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.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) **Acompanhamento da safra brasileira: safra 2011/2012**. Sétimo levantamento – abril de 2012. Brasília. Disponível em:<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_04\\_11\\_15\\_04\\_18\\_boletim\\_abril\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_11_15_04_18_boletim_abril_2012.pdf)>. Acesso em: abr 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) **Indicadores da agropecuária. Brasília**. Disponível em: <http://www.conab.org.br>. Acess em 08/03/2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_04\\_09\\_10\\_27\\_26\\_boletim\\_graos\\_abril\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_27_26_boletim_graos_abril_2013.pdf)>. Acesso em: abr 2013>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) Acompanhamento da safra brasileira, 2013. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_06\\_06\\_09\\_09\\_27\\_boletim\\_graos\\_-\\_junho\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_06_06_09_09_27_boletim_graos_-_junho_2013.pdf)>, acessado em 08/03/2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfWcKAJ/projecoes-agronegocio-brasil-2011-2012-a-2021-2022-2-1?part=2>>. Acesso em: abr 2013.

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

DIENER, U. H.; DAVIS, N. D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 56, p. 1390-1393, 1966.

DORS, G. C., PINTO, L. A. A., FURLONG, E. B. Migration of Mycotoxins into Rice starchy endosperm during the parboiling process. **Food Science and Technology International**. , 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**. 31(1), p. 172-177, 2011.

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**, n. 42, p. 433–437, 2009.

ELIAS, M. C. **Armazenamento e conservação de grãos em média e pequenas escalas**. 3ª Edição. Pólo de Modernização Tecnológica em Alimentos da Região Sul. Pelotas: Ed. UFPEL, 2002. 218p.

ELIAS, M. C. **Pós-colheita de arroz: secagem, armazenamento e qualidade**. 1ª ed. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária UFPEL, v.1, 2007, 424 p.

ELIAS, M.; OLIVEIRA, M. **Aspectos Tecnológicos e Legais na Formação de Auditores Técnicos do Sistema Nacional de Certificação de Unidades Armazenadoras**. Pelotas: Ed. Santa Cruz, 2009. 430p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA, 2007 - 1). **Micotoxinas: Importancia na alimentação e na saúde humana e animal**. Outubro, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA, 2007). **Embrapa Arroz e Feijão**. Disponível em <http://www.cnpaf.embrapa.br>, acessada, setembro 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA, 2010). **Pragas e doenças do arroz**. Disponível em: <[http://www.cnpaf.embrapa.br/eventosenoticias/anteriores/anteriores2009/0911\\_03.htm](http://www.cnpaf.embrapa.br/eventosenoticias/anteriores/anteriores2009/0911_03.htm)>. Acesso em: abr 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO, 2004). **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e00/y5499.HTM>>. Acesso em: nov.2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO, 2006). **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. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICAL DATABASES (FAOSTAT, 2009). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em: Jan 2013.

FARONI, L. R. D. A.; SILVA, J. S. S. (2008) **Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados**. In: Silva J. S. Secagem e armazenamento de produtos agrícolas. Viçosa, p. 371 – 406.

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**, 27(4), p. 800-804, 2007.

FILHO, A. F. L.; SILVA, J. S.; REZENDE, R. C. **Estruturas para Armazenagem de Grãos**. In: Silva, J.S. Secagem e Armazenagem de produtos Agrícolas. Viçosa: Ed. Aprenda Fácil, 2000. P. 107 - 138.

FIRMIN, S.; GANDIA, P.; MORGAVI D.P.; HOUIN G., JOUANY, J.P.; BERTIN, G., BOUDRA H., Modification of aflatoxina B1 and ochratoxin a toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation. **Food Additives and Contaminants**. 27 (8): 1153-1160, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO – 2004). **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Roma. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e00/y5499.HTM>> Acesso em: nov.2012.

FRANCO, D. F. e PETRINI, J. A. Secagem do arroz. **Comunicado Técnico Embrapa**. ISSN 1806-9185, Pelotas, RS, Dezembro, 2006.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Embrapa, 2007.

FRENICH, A. G., MARTÍNEZ, J. L., ROMERO-GONZÁLEZ, R., AGUILERA-LUIZ, M. M. . Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 117(4), 705–712, 2009.

FU, Z.; HUANG, X.; MIN, S.; Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. **Journal of Chromatography A**, p 271–274, 2008.

FURLONG, E. B.; SOARES, L. A.; VIEIRA, A. P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.58, n.2, p.105-111, 1999.

GERMANI, R.; BENASSI, V. T.; CARVALHO, J. L. V. **Métodos de avaliação de grão e farinha de trigo**. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. 84 p. (Documentos, n. 28).

GÖBEL, R.; LUSKY, K. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by new immunoaffinity column. **Journal of AOAC International**, 87(2), 411–416, 2004.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D.; **Divulgação Técnica: Análise de Micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999**. Biológico, São Paulo, v. 63, n. ½, p. 15-19, jan./dez., 2001.

GONZALEZ, M. P.; MATTUSCH, J.; WENNRICH, R. Stability and determination of aflatoxins by high-performance liquid chromatography with amperometric detection, **Journal of Chromatography A**, 828, p. 439–444, 1998.

GREGORI, R.; MERIGGI, P.; PIETRI, A.; FORMENTI, S.; BACCARINI, G.; BATTILANI, P. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. **Food Control**, 30, p. 280-287, 2013.

HACKBART, H. C. S. **Biodegradação de Aflatoxinas**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.23, n.1, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. **Efeito do emprego de fungicidas no desenvolvimento e manifestação do potencial toxigênico de *Fusarium graminearum* em arroz**. Dissertação

(Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e hplc/uv-fl. **Química Nova**, v. XY, p. 1-6, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; 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(16), p. 861-869, 2011.

HOELTZ, M. **Estudo da influencia de manejo pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (*Oryza sativa L.*)**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS, 2005.

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E.A.L.; NOLL, I. B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v.39, n.3, 2009.

HOELTZ, M.; WELKE, J. E.; ISA BEATRIZ NOLL, I. B.; DOTTORI, H. A.; Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin b1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 43-47, 2010.

HUTT, W.; MEIERING, A.; OELSCHLAGER, W. Grain contamination in drying with direct heating. **Canadian Agricultural Engineering**, Canadá, v. 20, n. 2. p.103-107, 1978.

HWANG, J. H.; LEE, K. G.; Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, v. 98, p.71–75, 2006.

IBÁÑEZ-VEA, M.; CORCUERA, L. A.; REMIRO, R.; MURILLO-ARBIZU, M. T.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E. Validation of a UHPLC-FLD method for the simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley. **Food Chemistry**, v. 127, p. 351–358, 2011.

INFOCOMM (2010) **Rice Information**. Disponível em <<http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/rice/docs/ia0710en.pdf>>. Acesso em: set 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01, 2003.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins** (Vol. 56). Lyon France: World Health Organization. 1993.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ - IRGA (2009) **Dados de safra**, Porto Alegre, 2009 <[http://www.irga.rs.gov.br/index.pdf?action=dados\\_safra](http://www.irga.rs.gov.br/index.pdf?action=dados_safra)>. Acesso em: jan 2013.

JAIMEZ, J.; GENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of chromatography a**. v. 882, p.1 – 10, 2000.

JULIANO, B. O. **Rice Chemistry and Quality. Island Publishing House, Philippines**, Cap. 2: Structure and Gross Composition of the Rice Grain, p. 25-54, 2003.

KENNEDY, G.; BURLINGAME B., Analysis of food composition data on rice from a genetic resource perspective. **Food Chemistry**, 80: p. 549-596, 2003.

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

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. **Food Chemistry**, v. 153, p. 44 –51, 2014.

KRSKA, R., MOLINELLI, A. Mycotoxin analysis: State-of-the-art and future trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 387(1), p. 145–148, 2007.

KRSKA, R; WELZIG, E.; BERTHILLER, F.; MOLINELLI, A.; MIZAIKOFF, B. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. **Food Additives Contaminants** v. 22, n. 4, p. 345-353, 2005.

LEE, L.S.; CUCULLU, A.F.; FRANZ, O.A.; PONS, W.A. Destruction of aflatoxins in peanuts during dry and oil roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.17, p. 451-453, 1969.

LEITE, C.W.; VILLELA, F.A. Velocidade de secagem de arroz em secador intermitente rápido com emprego de dois fluxos de ar. **Informativo Abrates**. v.20, nº.1,2, p.010 - 014, 2010.

LIMA, C. A. P.; ORSI, R. B.; DILKIN, CORRÊA, P. B. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 20, n. 1, 2000.

LIU, Z.; GAO, J.; YU, J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v.42, p. 468 – 479, 2006.

LOPES, R. P., SOBRINHO, J. C., SILVA, J. S., SILVA, J. N. Fontes de energia para secagem de café. Engenharia na agricultura. Viçosa, 2001, 26 p. (**Boletim técnico**, 3).

LUTFULLAH, G., HUSSAIN, A. Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. **Food Control**. v.23, n.1, p. 32 e 36, 2012.

MAGAN, N. e ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, 119, p. 131–139, 2007.

MAJEED, S.; IQBAL, M.; ASI, M. R. IQBAL, S. Z. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 446 e 450, 2013.

MAZAHERI, M. Determination of aflatoxins in imported rice to Iran. **Food and Chemical Toxicology**, n. 47, p. 2064 – 2066, 2009.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa nº 18, de 25 de junho de 2013. **Escopo mínimo de contaminantes que deve ser monitorado por cultura agrícola**. D.O.U., 27/06/2013 - Seção 1. 2013.

NUNES, I.L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIM, T.E.; FURLONG, E.B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, n.2, p.190-164,2003.

OYEBANJI, A. O.; EFIUVWERE, B. Growth of spoilage mould and aflatoxin B1 production in naturally contaminated or artificially inoculated maize as influenced by moisture content under ambient tropical condition. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 209-217, 1999.

PALMA, M.; LIAZID, A. BRIGUI, J. BARROSO, C.G. Investigation on Ochratoxin A stability using diferente extracton techiques. **Talanta**. v. 71, p. 976-980, 2007.

PARK, C.E.; KIM, Y.S.; PARK, K.J.; KIM, B.K. Changes in physicochemical characteristics of rice during storage at different temperatures. **Journal of Stored Products Research**, 48, P. 25-29, 2012.

PARK, J. W., CHOI, S. Y., HWANG, H. J., KIM, Y.B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished Rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 305-314, 2005.

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.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim da CEPPA**, n. 1, v. 20, p 141 -156, 2002.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Mycotoxins in foods: implications for human health. In: WAHLQVIST, M. L.; TRUSWELL, A. S. (Ed.). **Recent advances in clinical nutrition**. London: John Libby, 1986. p. 161-168.

PORTELLA, J. A.; MARTINS, R. R. **Gás na secagem de grãos**. **Revista Cultivar**. P.36-37. 2001. Disponível em: <[http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/gc31\\_secagem.pdf](http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/gc31_secagem.pdf)> Acesso em jan 2013.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S. Efeito do forno de microondas na destruição de aflatoxinas em amendoim. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.56, n.2, p. 21 - 24, 1996.

PUTRANTO, A.; XIAO, D.C., XIAO, Z.; WEBLEY, P.A. Mathematical modeling of intermittent and convective drying of rice and coffee using the reaction engineering approach (REA). **Journal of Food Engineering**. 105, p. 638 – 646, 2011.

PUZZI, D. **Abastecimento e Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, p.666, 2000.

RAMALLO, L. A.; LOVERA, N. N.; SCHMALKO, M. E. Effect of the application of intermittent drying on *Ilex paraguariensis* quality and drying kinetics. **Journal of Food Engineering**, n. 97, p. 188 –193, 2010.

REDDY, K. R. N., REDDY, C. S., MURALIDHARAN, K. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 27 – 31, 2009.

REHANA, F.; BASAPPA, S.C.; MURTHY, V.S. Destruction of aflatoxin in rice by different cooking methods. **Journal of Food Science and Technology**, v.16, p.111 - 112, 1979.

REITER, E. V.; VOUK, F.; BÖHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. Aflatoxins in rice – A limited survey of products marketed in Austria. **Food Control**, n. 21, p. 988 – 991, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. V. 27, n. 5, p. 771 - 780, 2004.

ROCHA, M. E. B. FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159 e 165, 2014.

RODRICKS, J. V.; HESSELTINE, C. W.; MEHLMAN, M. A. (Ed.). **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Pathotox, 1977. p. 37-50.

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 agrotecnologia**., v. 30, n. 1, p. 118 - 125, 2006.

SALEEMULLAH IQBAL, A., KHALIL, I. A., SHAH, H. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 699 – 703, 2006.

SAMARAJEEWA, U.; SEN, A.C.; COHEN, A.; WEI, C.A. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **Journal of Food Protection**, v.53, p.489 - 501, 1990.

SCUSSEL, V.M. Aflatoxin and food safety: Recent south American perspectives. **Journal of Toxicology- Toxin Reviews**, New York, v.23, n.2-3, p.179-216, 2004.

SHEIBANI, A.; GHAZIASKAR, H. S. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B1 and B2 from pistachio. **Food Control**, p. 124–128, 2009.

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, 2008.

SILVA, J. S.; AFONSO, A.D.L.; DONZELLES, S.M.L. **Secagem e secadores**. In: SILVA, J.S., *Secagem e armazenagem de produtos Agrícolas*. Viçosa: Aprenda fácil, 2000, p.107 – 138.

SILVA, J.S. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**.– Viçosa : Aprenda Fácil, 2008, 560p.

SILVA, L. C. Micotoxinas em Grãos e Derivados. **Revista Grãos Brasil**, n. 39, p. 13-16, 2009.

SIMIONATO, E. M. R. S.; SYLOS, c. m. Effect of Cooking on the Levels of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Rice. **Brazilian Journal Food Technology**, v.7, n.2, p.167 - 171, 2004.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector. **Food Control**, p.1807 e 1813, 2011.

SOARES LMV, RODRIGUEZ-AMAYA DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, p. 22 - 6, 1989.

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. **Química orgânica**. 8.ed.vol.1. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**. v.35, n.6, 2011.

STORCK, C. R. **Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos**. Santa Maria, UFSM. Dissertação (Mestre em Ciencia e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, 2004, 121p.

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

TAHA, O.G.; FONSECA, T.T.; SYLOS, C.M. Efeito da radiação microondas na redução dos teores de aflatoxinas em amendoim. **Alimentos e Nutrição**, v.12, p.63 - 179, 2001.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; TANAKA, M. K. K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 59 – 66, 2007.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 882, p. 23 - 28, 2000.

TOTEJA, G. S., MUKHERJEE, A., DIWAKAR, S., SINGH, P., SAXENA, B. N., SINHA, K. K., ET AL. Aflatoxin B1 contamination of parboiled rice samples collected from different states

of India: A multi-centre study. **Food Additives e Contaminants: Part A**, v. 23, n. 4, p. 411 – 414, 2006.

TRUCKSESS, M.W., ABBAS, H.K., WEAVER, C.M., SHIER, W.T., 2011. Distribution of aflatoxins in shelling and milling fractions of naturally contaminated rice. **Food Additives & Contaminants Part A**, v. 28, p. 1076 – 1082, 2011.

VAN EGMOND, H.P. **Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation, 2003. In aflatoxinas: ocorrência, distribuição e estimativa de ingestão através de produtos de amendoim da cidade de Piracicaba** – São Paulo. Dissertação em Ciência e tecnologia de alimentos, 2005.

VERGARA, F.; AMÉZAGA, E.; BÁRCENAS, M. E.; WELTI, J. Analysis of the drying processes of osmotically dehydrated apple using the characteristic curve model. **Drying Technology**, London, v. 15, n. 3, p. 949 - 963, 1997.

WAGACHA, J.M., AND MUTHOMI, J.W. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. **Int J Food Microbiol** 124: p. 1 – 12. 2008.

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

WALTKING, A.E. Fate of aflatoxin during roasting and storage of contaminated peanut products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.54, p. 533 - 539, 1971.

WEBER, E. A. **Armazenagem e conservação dos grãos**, Livraria e editora Agropecuária Ltda. Guaíba – RS, 2001, p. 93 - 186.

YOSHISAWA, T. **Mycotoxins analyses for federative republic of Brazil**. Japão: Trainig Course, 2001. 283 p.

ZAIN, M. E.; Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, n° 15, p. 129 – 144, 2011.

ZHANG, C.; MA, Y.; ZHAO, X.; ZENG, Y.; WANG, F. Kinetic modelling of aflatoxins B1 conversion and validation in corn, rice, and peanut during thermal treatments. **Food Chemistry**. 129, p. 1114 – 1119, 2011.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food and Technology**. v.37, p. 849 - 868, 2002.

ZHU, Z.; LIU, G.; CHEN, Y.; CHENG, J. Assessment of aflatoxins in pigmented rice using a validated immunoaffinity column method with fluorescence HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 31, p. 252 – 258, 2013.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA, A. M. R.; ROZZA, D. B.; DRIEMEIER, D; MALLMANN, C.A.; MIGLIAVACCA, F. A. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n.4, 2004.