

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL – PPGQTA**

**OCRATOXINA A E CITRININA EM ARROZ: UM
ESTUDO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCORRÊNCIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Helen Cristina dos Santos Hackbart

Rio Grande, 9 junho de 2009

OCRATOXINA A E CITRININA EM ARROZ: UM ESTUDO DE
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
OCORRÊNCIA

por

Helen Cristina dos Santos Hackbart

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (FURG-RS)
em preenchimento parcial dos requisitos, para a obtenção do grau de **Mestre em
Química**.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliana Badiale Furlong

Rio Grande RS, Brasil.
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TECNOLÓGICA E AMBIENTAL**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**OCRATOXINA A E CITRININA EM ARROZ: UM
ESTUDO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCORRÊNCIA**

Elaborada por

Helen Cristina dos Santos Hackbart

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química
Tecnológica e Ambiental

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Eliana Badiale Furlong
(Orientador – Presidente)

Prof^a Dr^a Leonor de Almeida de Souza Soares (FURG)

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG)

Rio Grande, 09 de junho de 2009.

Ao meu noivo Ricardo

À minha família, especialmente aos meus pais Enildo e Cleusa, que desde sempre foram meus maiores exemplos e melhores mestres, sempre me incentivando e acreditando em mim. Aos meus irmãos, Mauro, Vivian, Liege, Ana Maria e Marcos pelo carinho e apoio, aos meus cunhados Simone, Guilherme, e sobrinhas, Fernanda e Juliana pela torcida.

Amo a todos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dr^a Eliana Badiale Furlong, por tudo mesmo: pela sua generosidade e paciência em compartilhar conhecimentos, por ter sempre a porta aberta para seus orientados, pelas longas discussões e seminários em que participou para observar o nosso desenvolvimento. Professora Eliana é responsável por seus orientados concluírem suas teses de bem com a vida. Tenho muito orgulho de tê-la como orientadora.

Ao professor Ednei Gilberto Primel pelo apoio e boa vontade para esclarecer minhas dúvidas durante as análises no HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS.

A todos os colegas do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais, pela colaboração.

A todos os colegas do Laboratório de Micotoxinas, pelo ambiente fraterno, agradável e muito divertido.

As minhas colegas, Adriane, Dolores e Juliana pelo apoio, solidariedade nos momentos que antecederam a finalização desse trabalho.

A Adriana Demoliner, minha colega, por ter me ajudado a dar os primeiros passos no aprendizado da técnica de análise por LC-MS e pelas ótimas discussões.

A Jaqueline, Michele e Luciana, exemplos de dedicação ao trabalho.

Aos meus pais que me propiciaram a oportunidade de estudar, pelo carinho, dedicação e incentivo durante todos os momentos da realização deste trabalho. Aos meus irmãos, Mauro, Vivian, Liege que sempre torceram por mim e em especial Ana Maria e Marcos pelos momentos de descontração e apoio.

Ao meu noivo Ricardo que sempre me incentivou, me deu forças para vencer cada etapa e fez com que eu confiasse mais em mim.

Ao IRGA, por ter cedido às amostras.

À CNPq, pela bolsa de mestrado.

RESUMO

OCRATOXINA A E CITRININA EM ARROZ: UM ESTUDO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE OCORRÊNCIA

Helen Hackbart; Eliana Badiale-Furlong

A ocratoxina A e a citrinina são micotoxinas encontrados naturalmente em alimentos e rações animais. A avaliação do risco do consumo de alimentos contaminados por esses compostos deve ser estimada a partir de dados confiáveis que reflitam a verdadeira concentração destas toxinas em diferentes alimentos ou insumos, especialmente se ingeridos com frequência. Isto gera a necessidade de métodos analíticos precisos que sejam rápidos sem desconsiderar as etapas clássicas de avaliação de traços, amostragem representativa, extração, limpeza, concentração, separação de formas químicas, detecção, confirmação de identidade e quantificação. Para as micotoxinas em geral as técnicas cromatográficas são as mais aplicadas e relatadas em vista da diversidade estrutural destes compostos. Neste trabalho foi realizada uma otimização de extração utilizando o método QuEChERS modificado em comparação com os métodos Soares e Rodrigues Amaya (1989), Tanaka (2001) e Ultrassom (Palma *et. al.*, 2007) empregando diferentes técnicas cromatográficas com detectores distintos para análise destas micotoxinas simultaneamente. Foram analisadas 38 amostras de arroz cultivadas e armazenadas em campos experimentais de Cachoeirinha na região Sul do Brasil. O uso dos sistemas CCD, HPLC-DAD e LC-MS proporcionou especificidade, precisão e sensibilidade, de modo que os limites de detecção e quantificação, obtivessem valores inferiores ao limite máximo estabelecido por órgãos reguladores internacionais ($5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para ocratoxina A). Os limites de detecção encontrados para citrinina e ocratoxina A em camada delgada foram 4,7 e 6 vezes maior que para cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos, 14 e 300 vezes maior que cromatografia líquida acoplada a detector de massas. Os limites de quantificação das duas micotoxinas ficaram dentro do exigido pela legislação européia para OTA de $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para HPLC-DAD e LC-MS. Na cromatografia de camada delgada esse valor ficou 4 vezes acima do estabelecido para ocratoxina A. A ocorrência de ocratoxina A e citrinina foi verificada em 16 % das amostras estando os teores variando entre 3 e $560 \mu\text{g Kg}^{-1}$, sugerindo possível exposição crônica a estas micotoxinas caso as amostras sejam consumidas.

Palavras chaves: Ocratoxina A, citrinina, arroz.

ABSTRACT

OCHRATOXIN A AND CITRININ IN RICE: STUDY OF METHODOLOGY FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF OCCURRENCE

Helen Hackbart; Eliana Badiale-Furlong

Ochratoxin A and citrinin are mycotoxins found naturally in foods and feeds. The evaluation of the risk of the consumption of contaminated foods for those compositions should be dear starting from reliable data that reflect the true concentration of these toxins in different foods or inputs, especially if ingested frequently. This generates the need of necessary analytical methods that they are fast without disrespecting the classic stages of evaluation of lines, representative sampling, extraction, cleaning, concentration, separation in chemical ways, detection, identity confirmation and quantification. For the mycotoxins the techniques chromatography are in general the most applied and told in view of the structural diversity of these composed. In this work an extraction optimization was accomplished using the method QuEChERS modified in comparison with the methods Soares and Rodrigues Amaya (1989), Tanaka (2001) and Ultrasound (Palma *et. al.*, 2007) using different techniques chromatography with different detectors for analysis of these mycotoxins simultaneously. The 38 samples of rice were analyzed cultivated and stored in experimental fields of Cachoeirinha in the South of Brazil. The use of the systems TLC, HPLC-PDA and LC-MS, provided specificity, precision and sensibility, so that the detection limits and quantification, they obtained inferior values to the established maximum limit for organs international regulators (5 ppb for ochratoxin A). The detection limits found for citrinin and ochratoxin A in thin layer were 4,7 and 6 times larger than for liquid chromatography of high efficiency coupled to detector of arrangement of diodes, 14 and 300 times larger than liquid chromatography coupled to detector of mass. The limits of quantification of the two micotoxinas were inside of the demanded by the European Legislation for OTA of $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for HPLC-DAD and LC-MS. In the thin layer chromatography that value was 4 times above the established for ocratoxina A. The occurrence of ocratoxina A and citrinin was verified in 16% of the samples being the tenors varying between 3 and $560 \mu\text{g Kg}^{-1}$, suggesting possible chronic exhibition the these mycotoxins in case the samples are consumed.

Keywords: Ochratoxin A, citrinin, rice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas morfológicas externas da gramínea <i>Oryza sativa</i> L.....	19
Figura 2. Participação dos principais estados produtores de arroz.....	22
Figura 3. Organograma do processamento do arroz e suas funções.....	23
Figura 4. Estrutura do grão de arroz.....	24
Figura 5. Estrutura da ocratoxina A.....	33
Figura 6. Fórmula estrutural dos isômeros da citrinina.....	35
Figura 7. Estrutura da citrinina H ₁ e H ₂	36
Figura 8. Processo de desenvolvimento da fase móvel.....	44
Figura 9. Curva analítica em CCD.....	59
Figura 10. Cromatogramas de citrinina e ocratoxina A em 254 nm.....	60
Figura 11. Cromatogramas da citrinina em 330 nm.....	60
Figura 12. Cromatograma da ocratoxina A em 217 nm.....	60
Figura 13. Cromatograma de OTA (A) e CIT (B).....	61
Figura 14. Distribuição amostral da normal da OTA e CIT.....	62
Figura 15. Superfície de resposta para os resultados em relação ao RSD.....	66
Figura 16. Linearidade da citrinina (A) e ocratoxina A (B) em HPLC-DAD.....	73
Figura 17. Linearidade da citrinina (A) e ocratoxina A (B) em LC-MS.....	73

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Produção (em milhões de toneladas) de arroz no mundo, nos 8 principais países, e no Brasil em 2006 e 2007.....	05
Tabela 2 – Produção (em mil toneladas) de arroz na região Sul do Brasil, entre 2006 e 2007.....	06
Tabela 3 – Composição em energia e nutrientes do arroz polido e do arroz integral.....	10
Tabela 4 – Variáveis para o planejamento fatorial 2^4	35
Tabela 5 – Formas de homogeneização analito/solvente.....	36
Tabela 6 – Concentrações abrangidas pela curva analítica das micotoxinas em CCD.....	38
Tabela 7 – Eficiência da eluição de OTA e CIT em diferentes solventes.....	42
Tabela 8 – Condições cromatográficas para as micotoxinas OTA e CIT.....	44
Tabela 9 – Condições operacionais do LC-MS/MS.....	45
Tabela 10 – Efeito da granulometria das amostras na recuperação da OTA e CIT.....	46
Tabela 11 – Recuperação (%) de CIT e OTA em CCD.....	47
Tabela 12 – Efeito das condições de agitação na recuperação.....	48
Tabela 13 – Recuperação do planejamento em relação a recuperação da OTA.....	49
Tabela 14 – Efeitos e coeficientes para as variáveis estudadas em relação ao RSD.....	50
Tabela 15 – Efeitos e coeficientes para as variáveis estudadas em relação à recuperação.....	51
Tabela 16 – Combinação das variáveis do experimento 13.....	51
Tabela 17 – Resultados do efeito das variáveis do planejamento na recuperação.....	52
Tabela 18 – Indicativos para análise em CCD.....	53
Tabela 19 – Áreas relativas para CIT e OTA em HPLC-DAD.....	54

Tabela 20 – Indicativos de performance do HPLC-DAD.....	54
Tabela 21 – Áreas relativas da CIT e OTA em LC-MS/MS.....	55
Tabela 22 – Indicativos de performance do LC-MS/MS.....	56
Tabela 23 – Contaminação com OTA e CIT detectada em amostras analisadas por CCD.....	58
Tabela 24 – Contaminação por OTA e CIT nas amostras analisadas por HPLC-DAD.....	58
Tabela 25 – Contaminação pro OTA e CIT determinadas por LC-MS.....	59
Quadro 1 – Proporção da fase móvel em sistema de separação em gradiente.....	29
Quadro 2 – Proporção da fase móvel em sistema de separação em gradiente.....	30
Quadro 3 – Proporção da fase móvel em sistema de separação em gradiente.....	30
Quadro 4 – Proporção da fase móvel em sistema de separação em gradiente.....	30
Quadro 5 – Proporção da fase móvel em sistema isocrático.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
- CCD – Cromatografia de Camada Delgada
- CCDAE – Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência
- CIT – Citrinina
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
- C₁₈ – Octadecilsilano
- DAD – Detector Arranjo de Diodos
- ELISA – do inglês, *Enzime-Linked Immunosorbent Assay*
- EM – Espectrometria de Massas
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ESI – Ionização Eletrospray, do inglês, *Electrospray Ionization*
- FAO – Organização para Agricultura e Alimentação, do inglês, *Food and Agriculture Organization*
- FLD – Detector de Fluorescência, do inglês, *Fluorescence Detection*
- HPLC – do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*
- HPLC-DAD – do inglês, *High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detection*
- HPTLC – do inglês, *high performance thin layer chromatography*
- IARC – do inglês, *International Agency of Research on Cancer*
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia
- IRGA – Instituto Rio Grandense do Arroz.
- LC – do inglês, *liquid chromatography*

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada ao detector de massa, do inglês, *liquid chromatography – mass spectrometry*

LMT – Limite Máximo Tolerado

LOD – Limite de Detecção, do inglês, *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês, *Limit of Quantification*

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de massas, do inglês, *mass spectrometry detection*

m/z – razão massa/carga

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação.

OMS. Organização Mundial da Saúde.

OTA – Ocratoxina A

PDA – do inglês, *diode array detection*

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*

R_f – Fator de retardamento, do inglês, *Retardation Factor*

RSD – Coeficiente de variação, do inglês, *Relative Standard Deviation*

SAS – do inglês, *Statistical Analyses System*

TLC – do inglês, *thin layer chromatography*

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Série Eluotrópica

ANEXO B – Fluxograma da adaptação do método de extração

ANEXO C – Fragmentação da ocratoxina A e citrinina em LC-MS/MS

ANEXO D – Resumos e trabalhos apresentados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 O arroz e sua importância para o agronegócio mundial.....	19
2.2 Composição química e valor nutricional do arroz.....	26
2.3 Contaminação micotoxicológica do arroz.....	28
2.4 Micotoxinas.....	30
2.4.1 Ocratoxina A.....	32
2.4.2 Citrinina.....	35
2.5 Determinações de micotoxinas em arroz.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Solventes e reagentes.....	40
3.2 Equipamentos.....	41
3.3 Padrões de micotoxinas.....	42
3.4 Otimização dos sistemas cromatográficos.....	43
3.4.1 Cromatografia de camada delgada (CCD).....	43
3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos.....	45
3.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.....	48
3.5 Amostras.....	48
3.5.1 Amostragem.....	48
3.6 Comparação dos sistemas de extração.....	49
3.7 Otimização do procedimento de extração QuEChERS.....	51
3.8 Validações dos sistemas CCD, HPLC-DAD e LC-MS.....	53
3.8.1. Curva analítica e linearidade.....	53
3.8.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	55
3.8.3. Exatidão (recuperação).....	56
3.8.4. Precisão (repetitividade).....	57
3.9 Aplicação do procedimento desenvolvido.....	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 Adequações dos sistemas cromatográficos.....	59
4.1.1 Cromatografia em camada delgada.....	59
4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência e detector de arranjo de diodos.....	60
4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectro de massas.....	62
4.2 Efeito da granulometria na recuperação das micotoxinas.....	63
4.3 Recuperações das micotoxinas pelos diferentes métodos.....	64
4.4 Otimização do procedimento de extração QuEChERS.....	65
4.4.1 Método QuEChERS adaptado.....	70
4.5 Validações dos procedimentos.....	70

4.5.1 Cromatografia de camada delgada	70
4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	71
4.6. Aplicação do procedimento em amostras	75
4.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência e detector de arranjo de diodos	76
4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência LC-MS	76
5 CONCLUSÃO.....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS.....	92
ANEXO A – Série Eluotrópica.....	92
ANEXO B – Fluxograma da adaptação do método de extração.....	93
ANEXO C – Fragmentação da ocratoxina A e citrinina em LC-MS	94
ANEXO D – Resumos e trabalhos apresentados	95

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Embrapa (2008) o consumo de arroz na dieta brasileira em 2007 foi de 40 Kg por habitante/ano. O arroz é consumido por todas as classes sociais, sob diferentes formas de preparo, sua principal função no cardápio é fornecer energia, embora possua nutrientes que atuam na formação de estrutura e regulação metabólica visto que provem de uma porção do vegetal destinada a suprir as necessidades do desenvolvimento de um novo indivíduo.

Um dos principais fatores que influenciam na qualidade do arroz é a incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita do grão. O arroz pode ser exposto a uma diversidade de microrganismos, tais como leveduras, fungos e bactérias, e dentre estes os fungos filamentosos são os que podem causar maior dano comprometendo a qualidade do produto final, pois, fungos associados aos cereais, denominados toxigênicos, podem produzir metabólitos secundários tóxicos denominadas micotoxinas. Estas são altamente nocivas à saúde do homem, por causar danos que variam desde distúrbios gastrointestinais, neurológicos, imunológicos e até câncer.

A dificuldade em evitar ou minimizar estes contaminantes decorre do fato que ocorrência de fungos e a produção das micotoxinas são aleatórias, ou seja, não são facilmente previsíveis. As variáveis bióticas e abióticas influenciam a manifestação do potencial toxigenico dos fungos, que geram compostos em quantidades traços e se em co-ocorrência de gêneros e espécies mais de um tipo de estrutura química com a finalidade proteger a espécie. Este tipo de ocorrência denomina-se também contaminação cruzada, pois, desencadeia a produção de metabólitos fúngicos com graus de toxicidade diferentes na mesma matriz. Para minimizar estes riscos são necessárias estratégias tais como evitar a contaminação fúngica, prevenir condições de estresse do microorganismo, usar processos de descontaminação, evitar o consumo de matrizes com níveis elevados de micotoxinas através de legislação restritiva e dispor de metodologias adequadas à fiscalização.

O refinamento das técnicas analíticas, tais como cromatografia de camada delgada (CCD ou TLC), cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE ou HPTLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) que acopladas a detectores como, fluorescência (FDL), arranjo de diodos (DAD ou PDA) ou espectrômetro de massas (EM ou MS) permitem detectar a presença desses metabólitos tornando possível a detecção destes

compostos em níveis traços ppb e ppt. No entanto, estas técnicas ainda são dispendiosas, requerem analistas treinados e geram resíduos químicos em grande quantidade o que poderia justificar por que no Brasil ainda não estão disponíveis informes sobre a ocorrência destas micotoxinas em alimentos como, é o caso do arroz, tão amplamente consumido e produzido em diversas regiões do país. Também são poucos os estudos de correlação entre as condições de manejo da cultura, processo e armazenamento e os níveis de micotoxinas presentes no ambiente ou nos alimentos, tal situação dificulta a avaliação de riscos de danos à saúde e a adoção de processos que minimizem os impactos da contaminação. A falta de procedimentos analíticos acessíveis e confiáveis é outro fator que pode estar associado ao pouco conhecimento de ocorrência de algumas micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e ou animal.

Algumas micotoxinas pelas suas propriedades físico-químicas são pouco estudadas embora as condições para a sua produção se registrem no local de colheita, armazenamento e processamento. Dentre elas se destacam a ocratoxina A e a citrinina, ambas são produzidas por fungos que podem infestar o grão especialmente durante o armazenamento em ambientes com atividade de água superiores a 70 % e temperaturas inferiores a 25 °C.

Cabe salientar que a ocorrência dessas micotoxinas vem sendo registradas em diferentes regiões sob condições climáticas semelhantes as do Rio Grande do Sul (PFOHL-LESZKOWICZ *et al.*, 2005, CASTEGNARO *et al.*, 2006; TANAKA *et al.*, 2007; ZINEDINE *et al.*, 2007; JUAN *et al.*, 2008; DORS *et al.*, 2009). Em vista da possibilidade de ocorrência e das poucas informações sobre a situação micotoxicológica do arroz e seus derivados, especialmente no caso da ocratoxina A e citrinina, este trabalho teve como objetivo geral estudar a ocorrência das micotoxinas ocratoxina A e citrinina, em arroz e derivados, empregando metodologia confiável com mínima geração de resíduo. Para tal os objetivos específicos foram:

- Padronizar metodologia para determinação simultânea de ocratoxina A e citrinina.
- Avaliar a ocorrências dessas micotoxinas em arroz produzido em campos experimentais de Cachoeirinha, Rio Grande do Sul e em arroz armazenados em silos.
- Estabelecer condições analíticas que minimize o uso de solventes e geração de resíduos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O arroz e sua importância para o agronegócio mundial

Conforme mencionado na publicação Arroz Brasileiro (2007) registros mais antigos sobre o arroz foram encontrados na literatura chinesa, há cerca de 5.000 anos. Porém antes de qualquer evidência histórica, o arroz foi, provavelmente, o principal alimento e a primeira planta cultivada na Ásia. Diversos historiadores e cientistas apontam o sudeste da Ásia como seu local de origem. Na Índia, uma das regiões de maior diversidade de tipos de arroz, as províncias de Bengala, Assam e Mianmar têm também sido referidas como centros de origem.

A prova da antiguidade do uso de arroz na Índia é a sua citação em todas as escrituras hindus e nas variedades especiais citadas como oferendas em cerimônias religiosas. Além disso, as diferenças entre as formas de arroz cultivadas na Índia e sua classificação em grupos, de acordo com o valor nutritivo, o comportamento e a exigência das plantas, foram mencionadas cerca de 1.000 anos a.C.

Da Índia a cultura, provavelmente, estendeu-se à China e à Pérsia, difundindo-se, mais tarde, para o sul e o leste, passando pelo Arquipélago Malaio, e alcançando a Indonésia (ARROZ BRASILEIRO, 2007).

A cultura do arroz é igualmente muito antiga nas Filipinas e, no Japão, foi introduzida pelos chineses cerca de 100 anos a.C. Esta cultura não era conhecida nos países mediterrâneos até a sua introdução pelos árabes no Delta do Nilo. Os sarracenos levaram-no à Espanha e os espanhóis, por sua vez, à Itália. Os turcos introduziram o arroz no sudeste da Europa, onde começou a ser cultivado nos séculos VII e VIII, com entrada dos árabes na Península Ibérica. Os portugueses foram, provavelmente, os que introduziram esse cereal na África Ocidental, e os espanhóis, os responsáveis pela sua disseminação nas Américas (EMBRAPA, 2007).

Alguns autores apontam o Brasil como o primeiro país a cultivar esse cereal no continente americano. O arroz era o “milho d’água” (abatiuaupé) que os tupis, muito antes de terem contato com os portugueses, já colhiam nos alagados próximos ao litoral (EMBRAPA, 2008).

Em 1587, lavouras arrozeiras já ocupavam terras na Bahia e, por volta de 1745, no Maranhão. Em 1766, a Coroa Portuguesa autorizou a instalação da primeira descascadora de arroz no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro. A prática da orizicultura no Brasil, de forma organizada e racional, aconteceu em meados do século XVIII e, daquela época até a metade do século XIX, o país foi um grande exportador de arroz (EMBRAPA, 2008).

Atualmente, o arroz encontra-se disseminado sendo cultivado em todos os continentes, em cerca de 120 países, e seu consumo pela população mundial é um hábito inquestionável, como ingrediente principal de vários pratos típicos de diferentes culturas (EMBRAPA, 2008). Na maioria dos países produtores, quase toda a produção é destinada ao consumo interno destes países (KENNEDY *et. al.*, 2003).

O arroz, uma gramínea do gênero *Oryza*, Figura 1, que é constituído por 21 espécies, das quais apenas 7 são as mais produzidas no mundo, *Oryza barthii*, *Oryza glaberrima*, *Oryza latifolia*, *Oryza longistaminata*, *Oryza punctata*, *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* (EMBRAPA, 2007).

O arroz é uma gramínea adaptada ao meio ambiente aquático. Esta adaptação é possível devido à presença de um tecido no colmo da planta, chamado parênquima. Ele possibilita a passagem do oxigênio do ar para a camada da rizosfera (sistema radicular). Devido a essas características é possível o plantio no ecossistema de várzeas (irrigado), também conhecido como taipas de nível (COUNCE *et al.*, 2000). Esta gramínea cresce nas mais variadas condições: de 50° de latitude norte a 40° de latitude sul, e em altitudes inferiores ao nível do mar ou superiores a 3.000 metros (EMBRAPA 2007).



Figura 1. Estruturas morfológicas externas da gramínea *Oryza sativa* L.
Fonte: Embrapa, 2007.

A espécie *Oryza sativa L.* é a de maior importância comercial no Brasil. Esta espécie é dividida em três principais subespécies: indica, japônica e javânica, sendo as duas primeiras mais consumidas. A subespécie “indica” é a mais comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais e representa cerca de 80% da produção mundial (KENNEDY *et al.*, 2003).

A produção mundial de arroz em casca em 2007 foi de 638 milhões de toneladas, sendo que os maiores produtores foram os países da Ásia, seguidos do Brasil com 11,3 milhões. A Tabela 1 mostra os principais produtores mundiais de arroz.

Tabela 1 – Produção (em milhões de toneladas) de arroz no mundo, nos 8 principais países, e no Brasil entre 2006 e 2007.

<i>Países</i>	<i>2006</i>	<i>2007</i>
<i>China</i>	184,0	189,7
<i>Índia</i>	136,6	138,0
<i>Indonésia</i>	54,3	53,1
<i>Vietnã</i>	35,7	35,8
<i>Tailândia</i>	29,1	29,9
<i>Brasil</i>	11,6	11,3
<i>Estados Unidos</i>	9,3	8,2
<i>Paquistão</i>	8,2	8,5
<i>Produção mundial</i>	636,7	638,0

Fontes: FAO, 2007.

A China é o maior produtor individual de arroz e foi a responsável por 30 % da produção mundial em 2007, seguida pela Índia (21 %) e Indonésia (8 %). Em nível mundial, o Brasil é responsável por apenas 2 % da produção de arroz. As informações contidas na Tabela 2 posicionam a região Sul do Brasil como a de maior produtora de arroz sendo o estado do Rio Grande do Sul responsável por 57 % da produção nacional

No ano de 2007 a área plantada foi apenas ligeiramente maior que em 2006, respectivamente, 3.030.000 e 2.988.000 hectares. No entanto, a produção em toneladas caiu em 2007 (de 11.578.000 para 11.326.000 ton) bem como a produtividade de 3.875 para 3.755 Kg.ha⁻¹ (CONAB, 2009). Esta redução na produção foi considerada a maior desde 2001. Fatores como estiagem e o fenômeno El Niño, provenientes do aquecimento global, além da baixa cotação do produto no mercado interno levaram a essa baixa na produção (IBGE, 2007).

Segundo a Conab, este perfil também pode ser atribuído a substituição de culturas de arroz por soja nos Estados do Centro-Oeste e em Tocantins, a ocupação das chamadas “áreas

velhas” no estado do Mato Grosso e os preços desestimulantes do produto no estado do Rio Grande do Sul, onde o sistema de cultivo irrigado implica em maiores custos de produção.

Tabela 2 – Produção (em mil toneladas) de arroz na região Sul do Brasil, entre 2006 e 2007.

Região	2006	2007
Norte	1.014,6	1.116,0
Nordeste	1.115,1	1.047,3
Centro-Oeste	1.139,0	1.180,4
Sudeste	300,8	274,5
Sul⁽¹⁾	8.152,2	7.697,7
Paraná – PR	180,7	179,3
Santa Catarina – SC	1.099,1	1.099,1
Rio Grande do Sul – RS	6.872,4	6.419,3
Brasil	11,6	11,3

Fonte: Conab

⁽¹⁾Região Sul e seus Estados.

A safra de grãos 2008/2009, no Estado do Rio Grande do Sul manteve um aumento da área plantada de 2,0% em relação à safra anterior. A razão que levou a este acréscimo de área foi, principalmente, as cotações do produto no mercado. Apesar da falta de chuvas neste último ano, a situação da cultura desenvolveu-se dentro da normalidade (CONAB, 2009). A produção nacional foi de 12,25 milhões de toneladas, ficando 1,6% acima da safra passada sendo que o estado do Rio Grande do Sul foi responsável por 62% desta produção. Estima-se que o consumo de arroz no Brasil foi de 40 Kg por habitante em um ano, tomando-se por base o grão em casca. O arroz polido, que passa por um processo padrão de beneficiamento para a retirada da casca e polimento, ainda é o principal produto consumido pela população (EMBRAPA, 2007).

O arroz no Brasil é cultivado em dois ecossistemas, várzeas e terras altas, como constam na Figura 2. No ecossistema de várzeas predomina o sistema de cultivo com irrigação controlada, que ocupa cerca de 1,3 milhões de hectares na região subtropical (RS e SC), onde a cultura é manejada sob alto nível tecnológico e apresenta rendimento médio ao redor de 5,2 t/ha (IBGE, 2007).

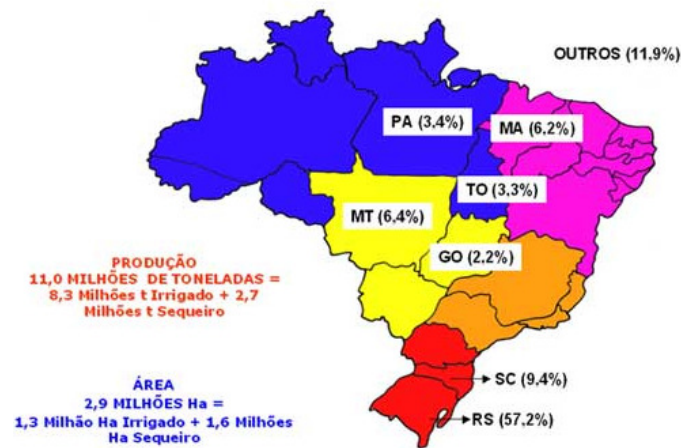


Figura 2. Participação dos principais Estados produtores de arroz.
Fonte: IBGE, 2007.

O estado do Rio Grande do Sul caracteriza-se pelo cultivo de grandes áreas de arroz. O sistema de produção convencional é altamente mecanizado, em áreas sistematizadas, a semeadura feita em solo seco e a água manejada na forma de banhos, até o início do perfilhamento, quando entra definitivamente nas quadras. No entanto, a irrigação, na grande maioria das lavouras, é pouco planejada, embora se tenha o domínio da água. O irrigante coloca a água no ponto mais alto e a conduz por gravidade, mantendo uma lâmina de água através de taipas construídas com diferença de nível de 5 a 10 cm (Arroz Irrigado, 2005).

O ecossistema de terras altas desempenhou um papel de grande relevância na produção de arroz sob o sistema de cultivo de sequeiro e, devido à sua rusticidade e adaptação a solos ácidos, foi uma alternativa altamente satisfatória para as regiões de cerrados. O arroz de terras altas é raramente usado para abrir novas áreas, por outro lado, a redução do risco climático renovou o interesse pela cultura e possibilitou a adoção das tecnologias recomendadas pela pesquisa e como o cultivo mínimo é uma prática generalizada nos cerrados, o arroz está sendo adaptado a esse novo ambiente.

No armazenamento do arroz seco, os pontos críticos, são as pragas que atacam os grãos, danificando-os e muitas vezes dificultando a comercialização. Os fungos de espécies toxigênicas podem produzir micotoxinas nocivas ao homem e animais, constituindo um dos fatores que influenciam a qualidade tecnológica.

O tratamento com fungicidas protetores de grãos deve ser realizado no momento de abastecer o armazém e pode ser feito na forma de pulverização na correia transportadora ou em outros pontos de movimentação de grãos. É importante que haja uma perfeita mistura do fungicida com a massa de grãos. Uma vez armazenado, o arroz deve ser monitorado durante

todo o período em que permanece estocado. O acompanhamento de pragas que ocorrem na massa de grãos armazenados é de fundamental importância, pois permite detectar o início da manifestação que poderá alterar a qualidade final do grão (Arroz Irrigado, 2007).

Quanto ao processo de beneficiamento, o arroz pode ser classificado em quatro subgrupos: arroz integral, arroz parboilizado integral, arroz polido e arroz parboilizado polido (ARROZ BRASILEIRO, 2007). Sendo que as duas formas polidas respondem juntas por 90% do consumo brasileiro. O organograma do processamento do arroz e seus derivados encontra-se na Figura 3.

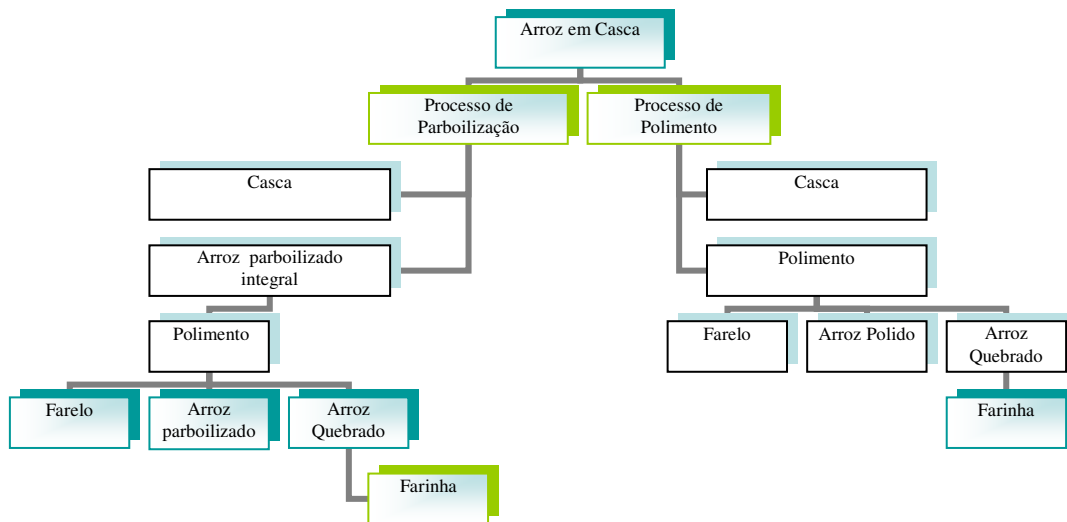


Figura 3. Organograma do processamento do arroz e suas funções.

Fonte: Adaptado de Juliano *et. al.*, 1996.

O grão de arroz é constituído pelo endosperma e embrião (germe), envoltos pelas camadas de aleurona e pericarpo. Todo o grão é recoberto por uma casca rígida, não comestível, que tem como função a proteção do ataque de insetos e fungos. Esta casca é retirada para a produção de arroz integral (AMATO *et al.*, 2002). A estrutura do grão de arroz está representada na Figura 4 (KENNEDY *et. al.*, 2003).

O arroz integral e parboilizado integral resultam da retirada apenas da cascas e, apesar de mais nutritivos, correspondem às formas menos consumidas no Brasil. As razões que levam ao seu menor consumo se devem principalmente a sua reduzida vida de prateleira e sabor diferenciado (SLOAN, 2005).

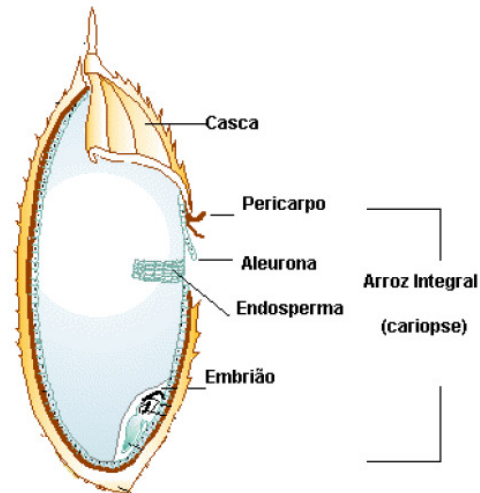


Figura 4. Estrutura do grão de arroz.

Fonte: Kennedy *et al.*, 2003.

Para a produção do arroz polido são retirados além da casca, o pericarpo, camada de aleurona e o embrião, conhecidos como farelo de arroz, restando o endosperma que basicamente contém amido. O arroz polido é pobre em micronutrientes devido aos processos de descascamento e polimento que removem grande parte dos lipídeos, minerais e principalmente vitaminas hidrossolúveis (AMATO *et al.*, 2002).

A parboilização do arroz é um processo hidrotérmico, no qual o arroz em casca é imerso em água potável a uma temperatura superior a 58 °C, seguido de gelatinização total ou parcial do amido e secagem. Depois os grãos são descascados produzindo o arroz parboilizado integral ou são descascados e polidos, resultando no arroz parboilizado polido (BRASIL, 1988). Neste processo há migração de compostos da casca e do farelo para o interior do grão, o que implica no maior teor de vitaminas e minerais no arroz parboilizado polido do que nos grãos polidos (PZSCZOLA, 2001).

Para todas as classes de arroz, integral, parboilizado integral, parboilizado polido ou polido, a legislação prevê um mínimo 80% de grãos inteiros para que o produto possa ser chamado de arroz. Se houver quantidades superiores a 20% de grãos quebrados de arroz o produto não pode ser comercializado como arroz e terá que ser denominado de fragmentos de grãos e/ou quíleras, o que implica em significativa redução no valor comercial e as principais aplicações são para alimentação animal e como adjunto para fabricação de cervejas (KADAN *et al.*, 2001).

No Brasil, também são produzidas massas alimentícias à base de farinha de arroz comercializadas para atender principalmente a comunidade oriental. Além da farinha, o emprego de outros derivados do arroz, como o óleo, amido, gérmen e o farelo podem

contribuir favoravelmente na formulação de alimentos e são cada vez mais utilizados (PZSCZOLA, 2001).

2.2 Composição química e valor nutricional do arroz

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

Tabela 3 – Composição em energia e nutrientes do arroz polido e do arroz integral.

Energia e nutrientes	Polido		Integral	
	Fonte A	Fonte B	Fonte A	Fonte B
Energia (Kcal/100g)	363	364	360	357
Macronutrientes (g/100g)				
Umidade	12,0	12,0	12,0	12,4
Proteínas	6,7	7,2	7,5	8,1
Lipídios	0,4	0,6	1,9	1,6
Carboidratos totais	80,4	79,7	77,4	76,6
Fibra bruta	0,3	0,6	0,9	0,9
Cinzas	0,5	0,5	1,2	1,3
Micronutrientes (mg/100g)				
Tiamina (B ₁)	0,07	0,08	0,34	0,36
Riboflavina (B ₂)	0,03	0,03	0,05	0,06
Niacina	1,6	1,6	4,7	5,2
Ferro	0,8	1,3	1,6	2,0
Zinco	1,0	1,1	2,1	2,0

Fonte: (A) WATT e MERRILL (1975), exceto para zinco (WHITNEY e ROLFES, 1999).

(B) IBGE (1999), exceto para zinco (PHILIPPI, 2002).

Na Tabela 3 está apresentada a composição em energia e nutrientes do arroz polido e do arroz integral (grãos crus), incluindo teores de umidade, registrados em diferentes fontes

bibliográficas. As informações sobre a composição química do arroz variam entre as fontes disponíveis, mas, a variabilidade registrada raramente ultrapassa 20 %. Para ilustrar este aspecto são apresentados dados da tabela de composição de alimentos internacional (WATT *et al.*, 1975) e outra nacional (IBGE, 1999). Observa-se que o arroz polido cru contém basicamente carboidratos (80 %). O polimento do grão integral provoca perdas consideráveis de certos nutrientes, tais como lipídios e tiamina (cerca de 80 %), fibra e niacina (até quase 70 %) e ferro e zinco (em torno de 50 %). O valor nutritivo do arroz integral é superior ao do arroz polido, mesmo considerando que o grão integral contém ácido fólico em suas camadas periféricas, que reduz a biodisponibilidade de minerais como o ferro e o zinco (HUNT *et al.*, 2002).

A quase totalidade dos carboidratos do arroz é representada pelo amido, encontrado no endosperma. O grão de arroz contém dois tipos de amido: amilose e amilopectina. O teor de amilose, maior determinante da capacidade de aglutinação dos grãos, constitui uma variável de grande interesse no processamento e tecnologia em geral do arroz (KENNEDY *et al.*, 2003).

O conteúdo protéico do arroz (grão cru), em média de 7,5 % (base úmida), pode oscilar entre 5 % e 13 % pelas diferenças varietais (KENNEDY *et al.*, 2003). A proteína do arroz é constituída por diferentes frações protéicas: albumina, globulina, prolamina e glutelina. A glutelina, maior fração presente no grão (70 % a 80 % da proteína total), contém 16,8 % de nitrogênio, sendo por isso considerado no caso do arroz o fator 5,95 para conversão de nitrogênio em proteína. Essa fração apresenta teores mais elevados do aminoácido essencial lisina em relação às frações globulina e prolamina (SGARBIERI, 1996; TAIRA, 1995).

O aminoácido que mais limita o aproveitamento biológico das proteínas dos cereais é a lisina. O teor deste aminoácido das variedades de arroz mais comumente consumidas está entre 30 e 40 mg/g de proteína. Todavia, podem ser encontrados teores de lisina mais elevados, conforme constatado por Zhai *et al.* (2001) em variedades de arroz selvagem.

O conteúdo de lipídios do arroz polido é muito baixo (menos de 1 %). Entretanto, o grão integral pode conter até 3% visto que cerca de 80 % dos lipídios do grão se encontram em suas camadas periféricas (TAIRA, 1995). O farelo de arroz, por sua vez, contém quantidades significativas de lipídios (cerca de 20%) (USP, 2004). Apesar dos baixos teores de gordura no arroz, esta é rica em ácidos graxos insaturados como o oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) (TAIRA, 1995; ZHOU *et al.*, 2003).

Da mesma forma que acontece para os lipídios, a maioria dos componentes das fibras do grão de arroz é perdida no processo de polimento (Tabela 3). As tabelas de composição de alimentos disponíveis no Brasil descrevem teores de fibra em torno de 1,3 % e 3,5 % (PHILIPPI, 2002), de 1,7 % e 3,0 % (USP, 2004) e de 1,6 % e 4,8 % (NEPA, 2006) para arroz polido e arroz integral, respectivamente. O arroz polido contém, sobretudo, hemicelulose e pectina, e o integral hemicelulose, pectina e celulose (MENDEZ *et al.*, 1995).

As vitaminas mais estudadas e citadas na literatura em relação ao arroz são: tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂) e niacina, provavelmente as mais importantes. Como essas vitaminas estão mais concentradas nas camadas periféricas do grão, incluindo o germe, existem diferenças consideráveis em seus teores no arroz integral em relação ao arroz polido. Os teores destes componentes podem variar muito em decorrência das condições de cultivo e de preparo do arroz para consumo, contudo as diferenças varietais são as mais relevantes (TAIRA, 1995).

2.3 Contaminação micotoxicológica do arroz

As variações da temperatura do ar e da radiação solar, durante as fases críticas da planta, são os principais elementos climáticos relacionados com a variabilidade dos níveis de produtividade, além de propiciarem a incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita. Dentre os grupos de organismos que compõem a microbiota dos cereais, os fungos filamentosos são os que podem causar maior dano comprometendo a qualidade do produto final, influenciando diretamente na qualidade do produto, pois, alguns deles denominados toxigênicos, podem produzir metabólitos secundários denominados micotoxinas (FURLONG *et al.*, 2003).

Os fungos podem ser classificados em função do período de infecção de fungos de campo, que crescem sob condições que ocorrem antes da colheita e fungos de armazenamento, que normalmente desenvolve-se na pós-colheita (FROHLICH *et al.*, 1991; YOSHIKAWA *et al.*, 2001).

Os fatores não naturais como danos mecânicos durante a colheita e alterações nos grãos por insetos e naturais como umidade e temperatura tornam a safra mais suscetível a invasão fúngica e a formação de toxina no campo (TANIWAKI *et al.*, 1999; CALDAS *et al.*,

2002). Os fungos que se desenvolvem e podem produzir toxinas nos grãos durante o período de armazenamento são influenciados por fatores relacionados, principalmente, com umidade e temperatura inadequadas, combinadas com longos períodos de permanência nos armazéns, pois são situações estressantes e desencadeantes para a manifestação de potencial toxigenico (DILKIN, 2002).

Estudos relacionam estes fatores, indicando estreita relação entre a quantidade de micotoxinas produzidas por algumas espécies de fungos e atividade de água, temperatura, tempo de estocagem, tipo de substrato, presença de microflora competitiva, cepa microbiana e integridade da semente (MILANEZ *et. al.*, 2002; PARDO *et. al.*, 2004; DORS *et. al.*, 2009). Cabe salientar que nem todas as subculturas de cepas produzem as mesmas quantidades de micotoxinas (PARDO *et. al.*, 2004).

Nos produtos estocados em depósitos ou moinhos, a produção de toxinas ocorre de acordo com as condições de armazenagem e de distribuição para o mercado, sempre considerando que os fatores de estresse para o microrganismo devem ser evitados, tais como umidade, temperatura, difusão CO₂ pela embalagem e outros (NUNES *et. al.*, 2003).

Em geral as condições de campo são mais desfavoráveis em países de climas quente e úmidos, como o Brasil, ou em épocas que apresentem estas características. No entanto, as condições de armazenamento podem ser críticas em todos os lugares do mundo desde que não sejam tomadas medidas que minimizem o estresse microbiano (NUNES *et. al.*, 2003; DORS *et. al.*, 2009).

A distribuição geográfica dos fungos na natureza é bem ampla (CREPPY, 2002). Os fungos do gênero *Penicillium*, usualmente se desenvolvem em cereais tanto em baixa como em alta temperatura o que se constitui num problema para países como o Brasil, onde todas estas possibilidades existem.

Centenas de micotoxinas já são conhecidas, mas, somente algumas são mais estudadas, por ocorrerem em substratos naturais e causarem efeitos nocivos à saúde humana e de animais de criação, assim, muitos países, estabeleceram regulamentos para estas substâncias com o objetivo de preservar a saúde e os interesses econômicos, tomados como base para o estabelecimento de limites e regulamentos para micotoxinas.

A avaliação de risco de ocorrência propicia a estimativa científica da probabilidade de potencial dos efeitos à saúde, para nortear o estabelecimento de regulamentos, tais como LMT (limite máximo tolerável). Os países desenvolvidos apresentam legislação específica para diversas micotoxinas enquanto que países em desenvolvimento não possuem ou apenas algumas micotoxinas são consideradas de risco. O Brasil possui legislação apenas para as

Aflatoxinas: Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002 – aflatoxinas $B_1+B_2+G_1+G_2 = 20 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para alimentos como amendoim em casca, pasta de amendoim e milho em grão. Para os demais produtos direcionados ao consumo humano ainda prevalece à legislação de 1974 do Ministério da Saúde, Resolução nº 34/76, publicada no Diário Oficial da União, em 19 de janeiro de 1977: aflatoxinas $B_1 + G_1 = 30 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Países vizinhos ao Brasil, como o Uruguai possuem legislação para aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2 em alimentos e especiarias de $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$, zearalenona em milho e cevada de $200 \mu\text{g Kg}^{-1}$, patulina em sucos de frutas de $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e ocratoxina A de $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para alimentos como arroz, cevada, café e milho direcionados ao consumo humano (FAO, 2007).

A União Européia possui legislação para uma variedade maior de micotoxinas e alimentos. No caso dos cereais e produtos processados para consumo direto ou como ingrediente para alimentos estão recomendados LMT de aflatoxina $B_1 = 2 \mu\text{g Kg}^{-1}$; AFTotais = $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$; Cereais crus: Ocratoxina A = $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$; Produtos derivados de cereais para consumo direto: Ocratoxina A = $3 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e zearalenona $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$; deoxinivalenol em rações = $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$. (FAO, 2007).

2.4 Micotoxinas

Todas as micotoxinas são de origem fúngica, porém, nem todos os componentes tóxicos produzidos por fungos são chamados micotoxinas. O alvo e a concentração dos metabólitos são também importantes. Metabólitos fúngicos que são tóxicos para bactérias são chamados antibióticos e, os que são tóxicos para plantas, chamam-se fitotoxinas (pode referir-se também a toxinas produzidas pelas próprias plantas). Micotoxinas são produzidas por fungos e são tóxicas para vertebrados e outros grupos de animais mesmo em concentrações consideradas traços. Outro metabólito fúngico de baixo peso molecular não considerado micotoxina e tóxico apenas em alta concentração é o etanol (BENNETT *et. al.*, 2003).

O estudo das micotoxinas é complexo e interdisciplinar, envolvendo muitos conhecimentos inter-relacionando diferentes áreas. De forma geral, podem-se relacionar os seguintes aspectos do estudo das micotoxinas: o estudo sobre os gêneros alimentícios abrange todos os aspectos da produção comercialização e utilização deste alimento; o sistema da

deterioração tem muitos fatores inter-relacionados, isto é, aspecto biológico, químico, físico, micro e macroambiental; o conhecimento da micotoxina envolve aspectos relacionados com a produtividade, metabolismo, toxicologia, saúde, oferta, distribuição na natureza e aspectos analíticos. As formas de controle compreendem a prevenção, análise da micotoxina e segregação do material contaminado e detoxificação, tendo a análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) como excelente ferramenta. Outro aspecto consiste na análise do sistema sócio-econômico que relaciona e envolve a conjuntura cultural, política e econômica estudada visando identificar situações de danos de caráter epidemiológico (PATERSON *et. al.*, 2004).

As micotoxinas não são apenas difíceis de definir, são também para classificar. Devido a suas diversas estruturas químicas e origem biossintética, seus variados efeitos biológicos e sua produção por um variado número de espécies fúngicas, os esquemas de classificação tendem a refletir a área do profissional que realiza sua categorização. Clínicos frequentemente os relacionam com os órgãos que são afetados classificando-as em hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas e imunotoxinas. Biólogos celulares colocam as micotoxinas em grupos genéricos como teratogênicos, mutagênicos, carcinogênicos e alérgenos. Químicos as classificam com base na sua estrutura química (ex. cumarias, lactonas); bioquímicos de acordo com sua origem biossintética (derivados de aminoácidos) e micologistas, pelo fungo que as produzem (toxinas de *Aspergillus*, toxinas de *Penicillium*). Nenhuma dessas classificações é inteiramente satisfatória (BENNETT, *et. al.*, 2003).

As micotoxinas compreendem uma mistura de compostos com efeitos tóxicos que além de outros sintomas clássicos de intoxicação variam entre carcinogenicidade e mutagenicidade, resultantes da atividade metabólica secundária dos fungos toxígenos que podem ser produzidas em uma ampla variedade de produtos alimentícios e sob uma variedade grande de situações, sendo reconhecidamente tóxicas para outras formas de vida (PIER *et. al.*, 1980; FRISVAD *et. al.*, 1992; OSWEILLER, 1998; PITTET, 1998; DILKIN, 2002). Podem ser compostos orgânicos de baixo peso molecular e podem desencadear imunogenicidade (LAWLOR *et. al.*, 2001; DILKIN, 2002). A presença das micotoxinas nos alimentos e rações é potencialmente perigosa para a saúde de homens e animais, pois além de não estimular o sistema imune, possuem vários efeitos tóxicos e dificilmente são degradadas durante o processamento ou preparo de alimentos e rações (TRENK *et. al.*, 1971; PIER *et. al.*, 1980; PITTET, 1998; GARDA *et. al.*, 2003; RICHARD, 2007).

Midio *et. al.* (2002) mencionam que são reconhecidas mais de cem espécies de fungos produtores de micotoxinas que podem se desenvolver em um grande número de substratos

destinados, tanto à alimentação humana, quanto a animal, e produzir um número de micotoxinas. Outros autores têm afirmado que existam cerca de 400 micotoxinas reconhecidas (PIER *et. al.*, 1980; PITTET, 1998; DILKIN, 2002; NIELSEN *et. al.*, 2003; PATERSON *et. al.*, 2004) sendo que 250 destas micotoxinas já tiveram sua estrutura química definida. No entanto, a maioria ainda não tem claramente definido seu impacto biológico sobre a saúde humana, animal e no ambiente (OSWEILLER, 1998; KNASMULLER *et al.*, 2004).

Entre as micotoxinas conhecidas, aproximadamente doze delas tem sido largamente investigadas e recebem atenção regular por serem consideradas de maior importância como ameaça a saúde humana e animal (PITTET, 1998; BENNETT *et. al.*, 2003). Dentre elas são destacadas as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* com *A. flavus* e *A. parasiticus*; ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium*; fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* e a citrinina, produzida pelo gênero *Penicillium citrinum* (BLANC *et. al.*, 1995; PITTET, 1998; BENNETT *et. al.*, 2002; PATERSON, *et. al.*, 2004).

Os principais órgãos afetados são conhecidos para algumas micotoxinas dentre elas estão: aflatoxinas o fígado; zearalenona o sistema reprodutor; ocratoxinas A e citrinina os rins, fumonisinas os pulmões; tricotecenos o trato digestório e sistema imunológico (TANAKA, 2001; KNASMULLER *et al.*, 2004; RICHARD, 2007).

2.4.1 Ocratoxina A

Os primeiros estudos sobre a origem da ocratoxina isolaram a toxina primeiramente do *Aspergillus alutaceus* (atualmente conhecido como *Aspergillus ochraceus*) e, posteriormente, foram identificados outros membros deste grupo que também a produziam (PITTET, 1998; PITT, 2000), como o *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, *A. ostianus*, *A. petrakii* e ainda *Penicillium viridicatum*, *P. palitans*, *P. cyclopium*, *P. commune*, *P. variabile* e *P. purpurescens* (PITTET, 1998). Os relatos da literatura mencionam a ocorrência natural de ocratoxina A em grãos e alimentos produzidos apenas em países de climas temperados ou continentais. No entanto, com o avanço das pesquisas, alguns fungos tiveram suas

classificações alteradas e observaram ainda que a contaminação por ocratoxina A encontrava-se muito mais disseminada do que descrito inicialmente (WHO, 2001; FURLONG *et al.*, 2003).

Entre o gênero *Penicillium*, foi descrito inicialmente a espécie *P. viridicatum* como principal produtora de ocratoxina e este conceito permaneceu por mais de uma década. Eventualmente, tornou-se claro que isolados considerados como *P. viridicatum* produtores de ocratoxina foram corretamente classificados em uma espécie separada, *Penicillium verrucosum*, sendo relacionado quase que exclusivamente aos grãos produzidos e armazenados em zonas temperadas (PITT, 2000).

Existem diferentes formas da ocratoxina, determinadas pelas letras A, B, C, D, estas são classificadas conforme os substituintes na base cumarina fenilalanina. Elas têm sido isoladas de culturas fúngicas, sendo que a ocratoxina A (OTA) é o metabólito primário mais abundante e mais tóxico dentre as ocratoxinas encontradas na natureza (BARISIC *et al.*, 2002; MULLER *et al.*, 2004), é classificada pelo IARC como um agente possivelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2B IARC, 1993). Também tem sido correlacionada com a Nefropatia Endêmica dos Bálcãs, doença caracterizada por progressiva redução das funções renais (CASTEGNARO *et al.*, 2006). Além disso, há demonstrações que ela é uma forte neurotoxina, teratogênica e dermatóxica. (KNASMULLER *et al.*, 2004; ELMHOLT *et al.*, 2005).

A OTA, 7-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina-7-L-β-fenilalanina, ilustrada na Figura 5, é composta por uma molécula de isocumarina, α ocratoxina (OTα), ligada em um grupo amida, L-β fenilalanina, onde entre eles há o ponto chave para o ataque de tratamentos físicos ou químicos resultando em compostos de menor toxicidade (van der MERWE *et al.*, 1965). Apresenta fórmula molecular C₂₀H₁₈ClNO₆, peso molecular de 403,82 g/mol, é cristalizada em xileno possui fluorescência verde, seu ponto de fusão é de 169°C. Com seu caráter ácido é moderadamente solúvel em solventes orgânicos como: clorofórmio, etanol, metanol, xileno. A ocratoxina A absorve luz ultravioleta. Em pH 4 sua absorção é em 215 nm e 333 nm, em pH 9 em 333 nm e 380 nm (CERAIN, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2006). Uma importante característica da ocratoxina A é sua estabilidade térmica.

Sua presença já foi detectada em muitos alimentos, sendo mais comum em alimentos vegetais secos e armazenados, onde geralmente encontram um substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento (FAO, 2001; DILKIN, 2002). A OTA ocorre naturalmente em diversos produtos vegetais, como milho, trigo, aveia, amendoim, arroz, cevada sorgo, semente

de algodão, café em grão, cacau, especiarias, frutas secas e outros (OSWEILLWER, 1998; WHO, 2001; COSTA *et. al.*, 2006).

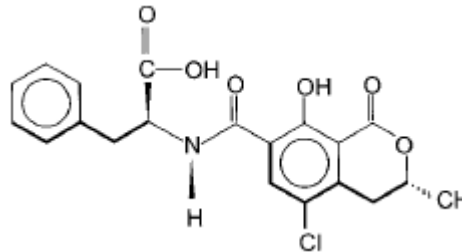


Figura 5. Estrutura da Ocratoxina A.
Fonte: Goldberg *et.al.*(2001).

É altamente estável em alimentos contaminados e estocados, podendo ser recuperada da amostra previamente contaminada, cerca de 45% da toxina após três meses de armazenamento. Na forma pura embora seja fotossensível, o efeito da luz sobre as toxinas aderidas aos cereais tem pouca importância, pois os níveis detectados são similares em amostras estocadas no escuro ou não. Isso indica que a remoção de ocratoxinas de cereais pode ser muito difícil, tendo como melhor forma a proteção, a prevenção da formação de toxina através de procedimentos de manipulação satisfatórios (RIBEIRO *et. al.*, 2006).

Os métodos físicos como os métodos de separação (eletrônicos ou físicos), podem contribuir para a eliminação e/ou redução de contaminação micotóxica (GARDA e BADIALE-FURLONG *et. al.*, 2003). De acordo com Yoshizawa *et. al.* (2001) e Caciamani *et al.* (2007), para OTA, o tratamento térmico úmido quando comparado ao seco é mais efetivo na sua degradação, encontrando índices de degradação de até 95%.

A degradação alcançada pela aplicação de agentes químicos como peróxido de hidrogênio com aquecimento e tratamento alcalino destrói a Ocratoxina A e a solução de amônia reduz consideravelmente sua concentração (GARDA e BADIALE-FURLONG, 2003). Outra forma de degradação é a utilização de métodos microbiológicos (RUHLAND *et.al.*, 1996) que, segundo Abrunhosa *et. al.* (2002), fungos do gênero *Aspergillus*, degradaram a OTA em até 90%. Experiências com esse *Aspergillus* demonstraram uma conversão quase completa de OTA em (OT α) dentro de 5 dias e depois de 7 dias uma degradação de 90% (VARGA *et. al.*, 2000). Além disso, esta foi mais rápida em amostras

sólidas do que líquidas. Para outro gênero fúngico, *Rhizopus*, e OTA, a degradação foi maior, apresentando índices de 95% (VARGA *et. al.*, 2005).

2.4.2 Citrinina

A citrinina (CIT) é um metabólito fúngico conhecido desde 1931, quando foi isolada da *Penicillium citrinum* e, em seguida, da planta australiana *Crotolaria crispata*. Dez anos mais tarde, foi caracterizada como um antibiótico e antibacteriano, depois foi testada e demonstrada sua atividade contra bacteriófagos, sarcomas, protozoários, células animais e células de plantas superiores (BERNDT, 1990; CHAGAS *et. al.*, 1992a, 1992b, 1995). Também foi identificada como implicada em casos de nefropatia porcina e foi encontrada como contaminante de milho, arroz, trigo e outros cereais (COMERIO *et. al.*, 1998; ABRAMSON *et. al.*, 1999; JANARDHANA *et. al.*, 1999; HEBER *et. al.*, 2001; SHU *et. al.*, 2002; MEISTER *et. al.*, 2004), em queijo (VAZQUEZ *et. al.*, 1996; VRABCHEVA *et. al.*, 2000; BAILLY *et. al.*, 2002) e no apodrecimento de frutas (SCHNEWEIS *et. al.*, 2001; AZZIS *et. al.*, 2002). Estes fatos permitem considerar a CIT uma micotoxina potencialmente importante do ponto de vista toxicológico, pois pode ser ingerida por animais e pelo homem e causar danos à saúde. Os efeitos adversos nos organismos afetados pela ação da CIT não são agudos, mas crônicos, uma vez que tem sido demonstrado que sua ingestão, em longo prazo, pode resultar em problemas hepáticos e renais (KNASMULLER *et al.*, 2004).

Apesar do caráter ácido pronunciado esta toxina é praticamente insolúvel em água, solúvel em hidróxido de sódio, carbonato de sódio e/ou acetato de sódio, além de metanol, acetonitrila, etanol e na maioria de solventes orgânicos mediantemente polares (DESHPANDE, 2002). A sua estrutura é caracterizada pela presença de uma metil quinona com duas ligações de hidrogênio intramoleculares, mas que pode ser degradada em soluções ácidas e alcalinas a quente. A citrinina cristaliza em uma forma desordenada, com o p-quinona e o-quinona duas formas tautoméricas dentro de um dinâmico equilíbrio no estado sólido como ilustra a Figura 6. Em metanol ou mistura de metanol e cloreto de metileno, a citrinina sofre uma reação de adição nucleofílica, que é reversível e em equilíbrio troca para a estrutura da p-quinona, com cloreto de metileno quente (POUPKO *et. al.*, 1997).

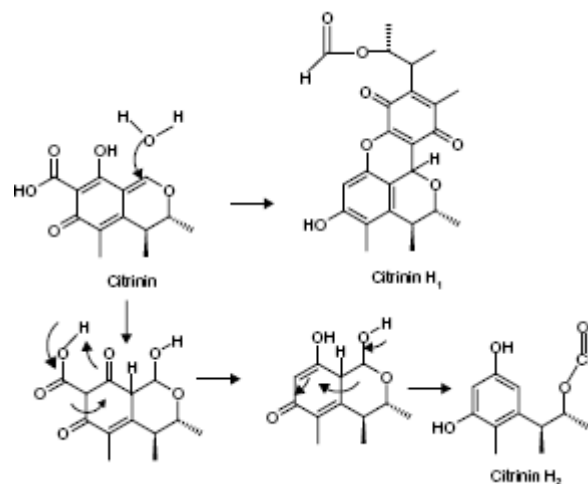


Figura 7. Estrutura da citrinina H₁ e H₂.

Fonte: HIROTA *et al.*, 2001.

2.5 Determinações de micotoxinas em arroz

O controle de níveis de micotoxinas em amostras de alimentos, com o objetivo de evitar os efeitos tóxicos na população exposta, pode ser realizado através da execução de determinação delas através de métodos analíticos que envolvem técnicas de separação. Em função dos avanços da instrumentação analítica dos últimos anos a sensibilidade, especificidade, rapidez e eficiência exigida pelos órgãos regulamentadores legais e de pesquisa que determinam os limites de tolerância para tais compostos vem sendo contempladas (PALLARONI *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2007). Como aparecem em quantidades muito pequenas são necessárias técnicas muito sensíveis para detectá-los e quantificá-los.

O desenvolvimento de um método para a análise de micotoxinas é dificultado por diversos fatores, tais como tempo, grande volume de solventes, várias etapas de extração, tornando a análise extremamente laboriosa. Um procedimento inclui normalmente quatro etapas: preparo de amostra, a extração, *clean up* e determinação cromatográfica para identificação e quantificação (HO & DURST, 2003; PALMA *et al.*, 2007). O preparo consta de quarteamento, trituração e homogeneização da amostra, seguida de extração com solvente apropriado. A extração das micotoxinas de suas matrizes é uma etapa crítica, pois depende das propriedades físico-químicas delas, bem como o tipo de matriz, além da escolha do solvente para isolamento. A análise de matrizes com teores variáveis de lipídios, carboidratos,

proteínas, pigmentos, exige muitas vezes, múltiplas fases de purificação durante a análise onde diferentes métodos podem ser utilizados (SORIANO *et al.*, 2004; MEISTER *et al.*, 2004; SYLOS *et al.*, 2003).

Os métodos mais utilizados para determinação das micotoxinas empregam técnicas cromatográficas e de imunoenaios. Os métodos de imunoenaios mais empregados são o de Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e a cromatografia por imunoafinidade. Os métodos cromatográficos podem ser: cromatografia de camada delgada (CCD ou TLC), cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE ou HPTLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) com diferentes detectores.

A escolha do detector mais adequado depende de vários fatores, principalmente aqueles relacionados com a estrutura química da micotoxina a ser analisada. Além disso, a finalidade da análise exige técnicas com suficiente sensibilidade e especificidade (FURLONG *et al.*, 2003; TANIWAKI *et al.*, 2004; SHEPHARD *et al.*, 2005). Uma tendência do século XXI para análise de micotoxinas tem incorporado novas tecnologias, que buscam minimizar impacto ambiental, tempo de exposição dos analistas a solventes tóxicos, apontando para o desenvolvimento de multimétodos que determinam uma ampla variedade de substâncias em uma única extração (URRACA *et al.*, 2005; HERNANDEZ-HIERRO *et al.*, 2008; ZOUGAGH & RÍOS, 2008; HANS *et al.*, 2008).

). Neste contexto, uma das tarefas do químico analítico é o desenvolvimento de novos métodos, que sejam rápidos, baratos, mas que ao mesmo tempo possam identificar e quantificar os analitos em amostras complexas em níveis de traços, com grau de confiança superior a 80 % de recuperação do analito.

A ocorrência das micotoxinas ocratoxina A e citrinina vem sendo relatada em diferentes matrizes empregando metodologias para extração, separação e detecção dessas micotoxinas: Macdonald *et al.* (1999) utilizaram os técnicas cromatografia por imunoafinidade e LC-MS e constataram a presença de ocratoxina A em frutas secas, o nível máximo encontrado foi de $53,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

Caldas *et al.* (2002) analisaram amostras de amendoim, castanhas, milho e farinha pelo método de TLC para separação e quantificação por fluorescência para detectar a presença de aflatoxinas e ocratoxina A. Sylos *et al.* (2003) utilizaram o método de Soares e Rodriguez-Amayas acrescido de partição para ciclohexano para determinar a presença de ocratoxina A e aflatoxinas em diferentes amostras de arroz. Foram analisadas 68 amostras e não foi encontrada a presença de ocratoxina A em nenhuma delas. Furlong *et al.* (2003) detectaram a

presença de OTA em arroz comercializado na região sul do RS, bem como a presença de *Penicillium* produtor em amostras não positivas para as condições do método analítico.

Taniwaki *et al.* (2004) adaptaram uma metodologia para extração de ocratoxina A em diferentes amostras de frutas secas, utilizaram CLAE para separação. No trabalho dos autores foi analisado os diferentes gêneros de fungos que produzem a ocratoxina A, foi constatado que o gênero *Aspergillus Ochraceus* foram produtores de ocratoxina e 27 % de *A. niger/carbonarius* também a produziram. Leszkowicz *et al.* (2004) utilizaram a metodologia de Molinié para extração de ocratoxina A e citrinina em diferentes amostras de alimentos entre eles frutas secas utilizadas para tabletes de cereais. O método para separação utilizado foi CLAE acoplada a fluorescência para quantificação. A metodologia utilizada para extração simultânea da ocratoxina A e citrinina mostrou-se eficiente para as amostras analisadas. Molinié *et al.* (2005) a presença de ocratoxina A e citrinina foi detectada em cereais comercializados. Em 69 % das amostras foi detectada a presença de ocratoxina A, sendo que 20 % apresentavam o limite de 3 µg/kg e em 20% foi detectada a presença de citrinina nos limites entre 1,5 µg/kg a 42 µg/kg. Almeida *et al.* (2006) utilizaram o método CLAE acoplado à fluorescência para separar e quantificar a presença de ocratoxina A em amostras de uvas secas comercializados em São Paulo. A concentração de ocratoxina A encontradas em 20 amostras de uvas passas pretas foi de 2 ng/g, 5 ng/g e 10 ng/g. Em nenhuma das amostras de uvas passas brancas foi detectado a presença da ocratoxina A.

Palma *et al.* (2007) compararam a estabilidade da ocratoxina A em diferentes métodos de extração, os resultados mostraram que a micotoxina pode ser extraída pela técnica de extração assistida por microondas (MAE) em até 150°C sem degradação. Foram utilizados os métodos CLAE acoplado a fluorescência para separação e detecção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho adaptou metodologia para avaliar simultaneamente a ocorrência de ocratoxina A e citrinina e a aplicou para verificar a incidência das micotoxinas em amostras de arroz e seus derivados produzidos no Rio Grande do Sul. O desenvolvimento experimental consistiu em padronizar um procedimento de extração através de comparação dos métodos descritos por Soares e Rodriguez-Amaya (1989), Tanaka (2001), Ultrassom (PALMA *et. al.*, 2007) e QuEChERS (ANASTASSIADES *et. al.*, 2003), os três primeiros consistem em extração líquida com solventes mediantemente polares, clarificação e partição, diferindo quanto ao solvente e forma de contato amostra solvente.

Para a identificação e quantificação foram empregadas as técnicas LC-MS e HPLC-DAD. O estabelecimento de condições de separação cromatográfica das micotoxinas foi realizado utilizando indicadores como os tempos de retenção de padrões, da resolução e tempo total de eluição. Os indicativos de desempenho adotados foram o limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade) e exatidão (recuperação). O trabalho foi desenvolvido no laboratório de micotoxinas onde as amostras foram preparadas e no laboratório de análise de compostos orgânicos e metais onde foram realizadas as determinações por HPLC-DAD e LC-MS.

3.1 Solventes e reagentes

- Água ultra-pura, purificada em sistema Direct-Q UV3[®]
- Millipore (resistividade de 18,2 MΩcm)
- Gás Argônio analítico 5.0; usado como gás de colisão no LC-ESI-MS/MS.
- Metanol grau HPLC Vetec[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Clorofórmio Quimex[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Acetonitrila grau HPLC Vetec[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Hexano LabSynth[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Nitrogênio comprimido White Martins[®] (Rio de Janeiro - Brasil)

- Cloreto de potássio NUCLEAR[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Cloreto de sódio NUCLEAR[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Acetato de sódio NUCLEAR[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Citrato de sódio NUCLEAR[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Sulfato de amônio NUCLEAR[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Sulfato de magnésio NUCLEAR[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Celite LabSynth[®] (Rio de Janeiro - Brasil).
- Ocratoxina A SIGMA CHEMICAL Co. (USA).
- Citrinina SIGMA CHEMICAL Co. (USA).

3.2 Equipamentos

- Destilador QUIMIS[®] 341-25 (Brasil).
- Sistema de purificação de água Milli – Q Direct –Q UV3[®] Millipore (Millipore, Belford, MA, USA).
- Balança analítica GIBERTINI[®] E42S-B (Italy).
- Blender WARING COMMERCIAL[®] 34BL97 (7012) (USA).
- MOINHO
- Banho Ultrassônico UNIQUE[®] Ultra Cleaner 700 (Brasil).
- Banho Maria BIOPAR[®] COEL TLK 48 (Brasil).
- Concentrador TECNAL[®] TE-019 (Brasil).
- Mesa Agitadora Orbital TECNAL[®] TE-141 (Brasil).
- Evaporador Rotativo QUIMIS[®] Q-344B2 (Brasil).
- Centrífuga Prevac[®] DCS-16-RV (Argentina).
- Agitador de tubos PHENIX[®] AP 56 (Brasil).
- Placas para cromatografia em camada delgada sílica gel 60, superfície específica ~ 500 m²/g, diâmetro médio dos poros de 60 Å, volume específico dos poros de 0,75 mL/g, partículas de 5-17 µm e 0,25 mm de espessura Merck[®] (Brasil).
- Lâmpada ultravioleta de alta intensidade, modelo UVGL 58, multibanda 254-366 nm MINERAL LIGHT[®] (Brasil).

- Cromatógrafo líquido Waters[®] (Milford, MA, USA) equipado com detector por arranjo de diodo 2996 (PDA), com bomba quaternária modelo 600, coluna analítica Synergi Fusion-RP 80 Å, phenomenex[®] (250 x 4,60 mm, 4µ) com sistema de aquisição de dados Software Empower, alça de injeção de 20 µL.

- Cromatógrafo Líquido *Alliance Separations Module 2695* (Waters, Milford, MA, USA) equipado com: Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação; Detector MS, Micromass[®] Quatro Micro™ API (Waters, Inglaterra) com fonte API, utilizando o modo de ionização por *Electrospray*; atuando no modo MRM; Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx 4.0 (Waters, Inglaterra); Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia) e coluna X Terra[®] MS C18 (50 X 3 mm de d.i.; 3,5 µM) (Milford, MA, USA).

3.3 Padrões de micotoxinas

Os padrões utilizados de ocratoxina A e citrinina foram adquiridos da Sigma Chemical Co., USA e as soluções padrão utilizadas foram preparadas conforme metodologia descrita por Scott (1990).

A partir de recipientes comerciais contendo em torno de 5 mg das micotoxinas, cada uma delas foi dissolvida em 100 mL da mistura benzeno:acetonitrila (98:2 v/v). As concentrações das soluções estoques foram calculadas através das massas obtidas por diferença após a lavagem e secagem dos frascos. Em seguida, estas soluções estoques foram diluídas de modo a resultar em soluções padrão cujas concentrações foram determinadas espectrofotometricamente.

A calibração do espectrofotômetro foi obtida através de uma curva padrão de soluções de dicromato de potássio para corrigir as leituras absorciométricas. Os valores da absorvidade molar (ϵ), 5440 mol cm⁻¹; 5490 mol cm⁻¹ e comprimentos de onda de máxima absorvância, 333 nm; 321 nm para OTA e CIT, respectivamente, dados pela literatura (IARC, 1993) foram utilizados para a estimativa da concentração das soluções de trabalho conforme a equação 1. A quantificação das soluções padrão de cada uma das duas micotoxinas foi realizada após varredura no espectro ultravioleta e verificação da pureza das soluções cada composto.

$$\mu \text{ g micotoxina mL}^{-1} = A.PM.1000.FC.\varepsilon^{-1} \quad \text{eq. 1}$$

onde: A = valor da absorbância da solução padrão;

PM = peso molecular da micotoxina em estudo;

FC = fator de correção do instrumento;

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

3.4 Otimização dos sistemas cromatográficos

3.4.1 Cromatografia de camada delgada

Segundo Collins *et. al.* (2006) a cromatografia de camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta técnica apresenta múltiplas vantagens, tais como, fácil compreensão e execução, separações em breve intervalo de tempo, versatilidade, grande repetitividade e baixo custo. O processo de separação está fundamentado, principalmente, na adsorção. Entretanto, pode ocorrer também por partição ou troca-iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas.

Para muitas separações, as placas pré-fabricadas, como sílica gel 60 (Merck), exigem sua ativação. O tempo e a temperatura utilizados para a ativação estão na dependência do adsorvente utilizado e a atividade desejada. No caso deste trabalho as cromatoplasmas de sílica foram ativadas a temperatura de 105 °C por 15 minutos e de conservadas, prontas para uso, em dessecadores.

Para a escolha da fase móvel foi considerados a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel, pois a separação está na dependência da competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra, pela superfície do adsorvente.

Para isso, toma-se como base a “série eluotrópica” (anexo A) diretamente relacionadas com o poder de eluição.

Foram testadas diferentes misturas para promover a separação das micotoxinas levando em consideração que pequenas variações na composição da fase móvel podem levar a grandes alterações no deslocamento das manchas.

- Tolueno:Acetato de Etila:Clorofórmio:Ácido Fórmico (70:50:50:0,5 v/v/v/v) expor a vapor de NH₃ por 10 segundos (MARTINS *et.al.*, 2002);

- Tolueno:Acetato de Etila:Clorofórmio:Ácido Fórmico (70:50:50:10 v/v/v/v) expor a vapor de NH₃ por 10 segundos(MARTINS *et.al.*, 2002);

- Tolueno:Acetato de Etila:Clorofórmio:Ácido Fórmico (70:50:50:20 v/v/v/v) expor a vapor de NH₃ por 10 segundos (GIMENO *et. al.*, 1983; MARTINS *et.al.*, 2002);

- Tolueno:Acetato de Etila:Clorofórmio:Ácido Fórmico (70:50:50:30 v/v/v/v) expor a vapor de NH₃ por 10 segundos (BLAC *et. al.*, 1995a 1995b);

- Éter Etilíco:Hexano:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (70:90:40:20 v/v/v/v) borrifar AlCl₃ em metanol 20% secar em estufa 105 °C por 5 min (MARTINS *et.al.*, 2002);

- Tolueno:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (50:40:10 v/v/v) (ABRUNHOSA *et. al.*, 2001);

- Tolueno:Acetato de Etila: Ácido Fórmico (50:40:20 v/v/v) (DAWLATANA *et. al.*, 1996; PEPELJNJAK *et. al.*, 2002);

- Tolueno:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (60:40:20 v/v/v) (ODHAV *et. al.*, 2002);

- Tolueno:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (60:40:10 v/v/v) (RASHEVA *et. al.*, 2003).

Para aplicação na placa, foram utilizadas microseringas para os volumes de 10, 15, 20 e 25 µL de cada micotoxina (em duplicata) em cromatoplacas (Merck®), sendo as duas, aplicadas no mesmo ponto, e dois pontos com aplicações individuais das mesmas. As gotas/manchas foram aplicadas a 2 cm acima da borda inferior, para que ficassem mergulhadas na fase móvel quando colocada a cromatoplaca na cuba. A distância entre cada gota/mancha foi de aproximadamente 1 cm para não ocorrer contato entre as gotas/manchas adjacentes pelo alargamento das bandas.

Durante a eluição, a fase móvel estava continuamente sendo evaporada da camada de líquido e da superfície da placa, ao mesmo tempo em que ocorria o processo inverso, ou seja, a condensação (Figura 8), pois as cubas cromatográficas foram perviamente saturadas.

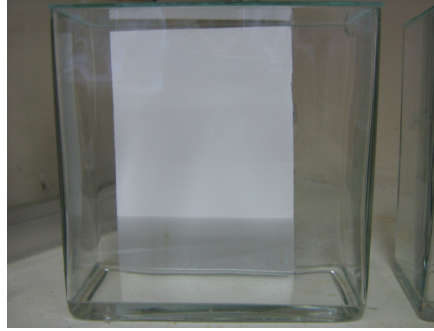


Figura 8. Eluição cromatográfica.

O processo de evaporação/condensação foi mantido reproduzível para que o fator de retardamento (R_f) também o fosse, pois através da manutenção da cuba cromatográfica perfeitamente vedada e saturada com a fase móvel. Uma vez eluídas, as placas foram secas nas condições ambiente e, em seguida, observadas sob a luz ultravioleta de alta intensidade de ondas curtas e longas (254 nm e 326 nm).

Tanto a análise quantitativa quanto a qualitativa das micotoxinas foi realizada através da cor da mancha e de seu fator de retardamento, R_f , estimado através da expressão:

$$R_f = \frac{d_r}{d_m}$$

Onde d_r refere-se a distância (cm) percorrida pelo composto e d_m , distância (cm) percorrida pela frente da fase móvel ou eluente. Na prática foi a distância percorrida pela micotoxina desde o ponto de aplicação até o centro da mancha, e a distância percorrida pela fase móvel, desde o ponto de partida até o ponto extremo atingido por ela.

3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos

A cromatografia líquida de alta eficiência requer que a amostra seja solúvel na fase móvel; ideal para a separação de compostos de alta massa molar e/ou baixa estabilidade térmica. A escolha da fase estacionária e da fase móvel teve como principal critério a polaridade das micotoxinas em estudo. O detector utilizado de arranjo de diodos consiste em uma série de detectores fotodiodo posicionado lado a lado em um cristal de silício, de modo que cada comprimento de onda difratado pela grade atinge um ponto deste arranjo, e

conseqüentemente um detector. Cada diodo tem um capacitor dedicado e está conectado por um interruptor tipo transistor para uma linha de saída comum a todos. Deste modo, a radiação que atravessa a amostra é integral e instantaneamente analisada determinando-se, portanto, a absorvância em todos os comprimentos de onda de modo simultâneo.

Neste trabalho foi utilizada a coluna Synergi Fusion-RP 80 Å, Phenomenex® (250 x 4,6 mm, 4µ), operando nos modos de eluição por gradiente ou isocrático. Foram realizados os seguintes testes (a,b): Coluna: Synergi Fusion-RP 80 Å, Phenomenex® (250 x 4,6 mm, 4µ); Fase Móvel: Acetonitrila:Água purificada, acidificada com ácido fosfórico até pH 3,0.

a) Modo: Gradiente (Quadro 1, 2,3 e 4).

Vazão	0,4 mL min ⁻¹							
Tempo (min)	0	3	6	9	12	15	18	25
Água	70	70	30	30	10	10	70	70
Acetonitrila	30	30	70	70	90	90	30	30

Quadro 1 – Proporção da fase móvel em modo de eluição por gradiente.

Vazão	0,6 mL min ⁻¹							
Tempo (min)	0	3	6	9	12	15	18	25
Água	70	70	30	30	10	10	70	70
Acetonitrila	30	30	70	70	90	90	30	30

Quadro 2 – Proporção da fase móvel em modo de eluição por gradiente.

Vazão	0,6 mL min ⁻¹					
Tempo (min)	0	3	7	16	18	20
Água	70	70	10	10	70	70
Acetonitrila	30	30	90	90	30	30

Quadro 3 – Proporção da fase móvel em modo de eluição por gradiente.

Vazão	0,8 mL min ⁻¹					
Tempo (min)	0	3	7	16	18	20
Água	70	70	10	10	70	70
Acetonitrila	30	30	90	90	30	30

Quadro 4 – Proporção da fase móvel em modo de eluição por gradiente.

b) Modo: Isocrático (Quadro 5).

Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Tempo (min)	20
Água	50
Acetonitrila	50

Quadro 5 – Proporção da fase móvel em modo de eluição isocrático.

Neste trabalho o detector utilizado foi o de arranjo de diodos que media continuamente o comportamento da fase móvel frente a uma fonte de radiação eletromagnética e enviava o sinal para o registro. No sistema de arranjo de diodos a luz emergente é dispersa por uma grade holográfica, sendo os comprimentos de onda resultantes focalizados sobre uma fila de fotodiodos (de 256 até 1024). Com isso, todo o espectro podia ser armazenado, usando um computador, sem a necessidade de deter a vazão da fase móvel para registrar um espectro de um dado componente (COLLINS *et. al.*, 2006).

Para encontrar o comprimento de onda de absorção máximo da citrinina e ocratoxina A, no detector de arranjo de diodos foram injetadas soluções em três diferentes concentrações nos seguintes comprimentos de onda escolhidos de acordo com a literatura: 250, 254, 265 e 331 nm (CARVALHO *et. al.*, 2004, SUNG *et. al.*, 2006).

3.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas apresenta como vantagens ser universal, alta seletividade, quando operado no modo de monitoramento de íons selecionados. Isto permite a quantificação de picos sobrepostos, ter boa detectabilidade, avaliar a pureza do pico, confirmar a presença do analito mediante a informação da massa molar e estrutural, sendo essa a característica mais relevante.

O sistema LC-MS foi condicionado passando-se a fase móvel a uma vazão de 0,4 mL min⁻¹ durante 7 minutos. Para otimização dos sinais das razões massa/carga foi injetada uma solução de cada micotoxina na concentração de 1 µg mL⁻¹.

O espectrômetro de massas é um instrumento constituído de três partes: fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons com aquisição de dados/processamento de dados. Após a injeção da amostra no espectrômetro de massas, ocorre a produção de íons pela fonte de ionização, uma vez que este só detecta espécies carregadas. Formados os íons, eles são analisados pelo analisador de massas de acordo com sua razão massa/carga, neste trabalho um quadrupolo. A detecção do íon foi realizada por meio do tubo multiplicador de elétrons, que determina a intensidade do feixe de elétrons, identificando o íon precursor e logo os íons produtos para sua quantificação escolhidos de acordo com a literatura (SUNG *et. al.*, 2006; TABATA *et. al.*, 2007). Por fim, a aquisição dos dados e seu processamento foram realizados através de programa computacional.

3.5 Amostras

3.5.1 Amostragem

O arroz (*Oryza sativa*, L.) e seus derivados destinados ao consumo humano foram coletados em campos experimentais do IRGA unidade Cachoeirinha, cultivados em campos tratados e não tratados com fungicida. Após a colheita os grãos foram beneficiados separando

em arroz com casca parboilizado tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), arroz branco natural polido tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), arroz com casca natural tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), arroz polido parboilizado tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), farelo parboilizado tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), farelo branco natural polido tratado (triplicata) e não tratado (triplicata) num total de 36 amostras, as triplicatas das amostras variam de acordo com o local do campo de cultivo em relação à fonte de água. Também foram analisadas amostras de arroz armazenadas em silos durante o período de dezoito meses, arroz com casca (1) e farelo (1), totalizando 38 amostras.

Uma amostra de arroz comercial foi empregada para os testes preliminares de efeito da granulometria na extração das micotoxinas. Esta foi moída, em moinho de facas, 500 g, seguida de separação em jogo de peneiras 14, 24, 28, 32, 35 e 42 tiler. As frações foram contaminadas com ocratoxina A e citrinina com 400 e 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de CIT e OTA, respectivamente, e posteriormente extração das mesmas pelo método QuEChERS modificado (ANASTASSIADES *et. al.*, 2003) quanto aos teores de umidade e conteúdo de sais seguido de identificação e quantificação realizadas através de cromatografia de camada delgada e confirmação por cromatografia líquida HPLC-DAD. Definida a granulometria foram realizados as comparações entre os sistemas de extração.

3.6 Comparação dos sistemas de extração

Foram testados nos quatro métodos a capacidade de extrair as duas micotoxinas simultaneamente, os métodos de Soares e Rodrigues-Amaya (1989), Tanaka (2001), Ultrassom (PALMA *et. al.*, 2007) e “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe” QuEChERS modificado (ANASTASSIADES *et. al.*, 2003). Foram utilizados amostras de arroz comercial. As micotoxinas (OTA e CIT) foram identificadas e quantificadas através de cromatografia de camada delgada.

Os resíduos secos obtidos após as extrações foram ressuspensos em benzeno p.a. e agitados em banho de ultrassom por 30 segundos. A triagem foi realizada mediante aplicação do extrato de cada extração (em triplicata) em cromatoplasmas simultaneamente com a aplicação das soluções padrões das micotoxinas em estudo.

Método Soares e Rodriguez-Amaya (1989): da amostra de arroz homogeneizada em moinho de facas foram pesadas 50,0000 g em balança analítica de precisão 4 casas decimais, seguido de agitação em Blender na velocidade máxima durante 5 minutos com 300 mL de metanol:cloreto de potássio 4%, 9:1 v/v. Após filtração foram recolhidos 150 mL do filtrado aos quais foram adicionados 150 mL de solução de sulfato do amônio 30% (clarificante) com 50 cm³ de celite. A mistura foi deixada em repouso por 5 minutos, filtrada e a 150 mL do filtrado foram acrescidos 150 mL de água destilada em funil de separação. Nesta fração foram realizadas três partições com 10 mL de extrato orgânico (clorofórmio). Os extratos orgânicos coletados foram separados em três porções de 10 mL, o solvente evaporado e os recipientes armazenados em freezer até a realização da triagem, confirmação e quantificação respectivamente em cada frasco separado.

Método Tanaka (2001): a amostra de arroz foi triturada em moinho de facas. Após a homogeneização foram pesadas 10,0000 g aos quais foram adicionados 100 mL de uma mistura de acetonitrila:água na proporção 3:1 (v/v). A extração foi realizada em mesa agitadora orbital a 200 rpm a 25 °C durante 30 minutos. A fração líquida foi separada por filtração, o extrato foi desengorduramento com 20 mL de hexano sob agitação lenta por 3 minutos e a fase acetonitrila:água foi recolhida, sendo esta operação repetida duas vezes. Ao extrato desengordurado foram adicionados 4 g de Cloreto de Sódio para a retirada de água. A acetonitrila foi recolhida em balão de fundo chato evaporada em evaporador rotativo a 70 °C. O balão seco foi lavado com 30 mL de clorofórmio:metanol 9:1 (v/v) homogeneizado em banho ultra-sônico durante um minuto, transferido o extrato para um tubo de centrífuga de 50 mL. Após a centrifugação a fase orgânica (clorofórmio) foi recolhida e seca sob corrente de nitrogênio em concentrador, e os frascos armazenados em freezer.

Método Ultrassom Palma *et. al.*, (2007): da amostra de arroz triturada em moinho de facas e homogeneizada, foram pesadas 5,0000 g de amostra, em tubo de centrífuga de 50 mL onde também foram adicionadas 40 mL da mistura acetonitrila:água 3:1 (v/v). O tubo foi homogeneizado em banho de ultrassom por 30 minutos na potência máxima. O extrato foi filtrado, para a retirada da água, usando 2 g de NaCl. A fase acetonitrila foi recolhida em funil de separação e desengordurada com 10 mL de hexano sob agitação lenta. A operação foi repetida duas vezes. O extrato foi seco em banho-maria a 50 °C sob corrente de nitrogênio.

Método QuEChERS modificado: o procedimento adotado foi desenvolvido por Anastassiades *et. al.*, (2003) para extração de pesticidas em arroz. O arroz foi triturado em moinho de facas e homogeneizado em peneiras. Foram pesadas 10,0000 g de amostra, em um tubo de centrífuga ao qual foram adicionado 10 mL de água destilada para umedecer a

amostra. Para a extração foram adicionados 10 mL de acetonitrila acidificada com 0,1 mL de ácido acético glacial. A agitação foi manual durante 1 minuto. Foram adicionados 3 g de sulfato de magnésio, 1,7 g de acetato de sódio e 1 g de citrato de sódio seguido de nova agitação durante 1 minuto. O material foi centrifugado 8 minutos e ao sobrenadante foram adicionados 0,6 g de sulfato de magnésio e 0,5 g de celite seguido de agitação manual durante 1 minuto e separado por centrifugação. O sobrenadante foi seco em concentrador sob corrente de nitrogênio. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

O eluente utilizado no desenvolvimento das placas foi uma mistura de Tolueno:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (50:40:20 v/v/v). Concluída a eluição aos 14 cm do ponto de partida as placas foram secas e observadas sob luz ultravioleta.

As amostras que apresentaram manchas fluorescentes semelhantes aos padrões, isto é, com o mesmo *R_f* e cor, foram consideradas como resultados indicativos de extração. A recuperação foi estimada através de outro cromatograma onde placas foram delineadas de modo a encaixar a intensidade de fluorescência da mancha suspeita com a intensidade de fluorescência dos padrões, isto é, 25 µL de cada extrato (triplicata) foram aplicados na placa simultaneamente com quantidades conhecidas dos padrões das micotoxinas e o cromatograma desenvolvido de maneira análoga.

3.7 Otimização do procedimento de extração QuEChERS

Um planejamento fatorial foi realizado para adequar o método de QuEChERS a extração simultânea de ocratoxina A e citrinina em amostras de arroz.

As variáveis: umidade da amostra (10; 15 e 20 mL), acidificação, com ácido acético glacial, da acetonitrila (0; 0,05 e 0,1 mL), quantidades de sais sulfato de magnésio (6; 4,5 e 3 g), acetato de sódio (3,4; 2,6 e 1,7 g) e citrato de sódio (2; 1,5 e 1 g) e celite (200 e 500 mg), foram avaliadas através de planejamento fatorial 2^4 , em dois níveis (-1 e +1) e seis pontos centrais (0), resultando em 22 experimentos. Os teores de micotoxinas extraídas foram quantificados através de cromatografia líquida e detector de massas.

A área relativa das duas micotoxinas (OTA e CIT) foram empregadas para estimar os percentuais de recuperação que constituíram as respostas das variáveis em estudo. A análise estatística dos efeitos foi realizada através do programa SAS - Statistical Analyses System

(SAS, 2003; RODRIGUEZ, 2005), observando as combinações das variáveis descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Variáveis para o planejamento fatorial 2^4 .

<i>Experimentos</i>	<i>Adição de água (mL)</i>	<i>Ácido acético (mL)</i>	<i>Sulfato, acetato e citrato (g)</i>	<i>Celite (mg)</i>
1	-1 (10)	-1 (0)	-1 (3 + 1,7 + 1)	-1 (200)
2	-1 (10)	-1 (0)	-1 (3 + 1,7 + 1)	+1 (500)
3	-1 (10)	-1 (0)	+1 (6 + 3,4 + 2)	-1 (200)
4	-1 (10)	-1 (0)	+1 (6 + 3,4 + 2)	+1 (500)
5	-1 (10)	+1 (0,1)	-1 (3 + 1,7 + 1)	-1 (200)
6	-1 (10)	+1 (0,1)	-1 (3 + 1,7 + 1)	+1 (500)
7	-1 (10)	+1 (0,1)	+1 (6 + 3,4 + 2)	-1 (200)
8	-1 (10)	+1 (0,1)	+1 (6 + 3,4 + 2)	+1 (500)
9	+1 (20)	-1 (0)	-1 (3 + 1,7 + 1)	-1 (200)
10	+1 (20)	-1 (0)	-1 (3 + 1,7 + 1)	+1 (500)
11	+1 (20)	-1 (0)	+1 (6 + 3,4 + 2)	-1 (200)
12	+1 (20)	-1 (0)	+1 (6 + 3,4 + 2)	+1 (500)
13	+1 (20)	+1 (0,1)	-1 (3 + 1,7 + 1)	-1 (200)
14	+1 (20)	+1 (0,1)	-1 (3 + 1,7 + 1)	+1 (500)
15	+1 (20)	+1 (0,1)	+1 (6 + 3,4 + 2)	-1 (200)
16	+1 (20)	+1 (0,1)	+1 (6 + 3,4 + 2)	+1 (500)
17	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (200)
18	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (200)
19	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (200)
20	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (500)
21	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (500)
22	0 (15)	0 (0,05)	0 (4,5 + 2,6 + 1,5)	0 (500)

-1 e +1: Níveis estudados e 0: pontos centrais.

Foram também realizados seis ensaios, levando em consideração o ponto com melhor recuperação do planejamento fatorial anterior. Os ensaios realizados tiveram como variáveis: acidificação com ácido acético glacial (0,1 e 0,2 mL), quantidade dos sais sulfato de magnésio (3; 1,5; 0,85; 0,5 e 0 g), acetato de sódio (1,7; 0,85 e 0 g) e citrato de sódio (1; 0,5 e 0 g).

Depois de otimizado o sistema de extração, houve a necessidade de aprimorar a forma de agitação do tubo de centrifuga, passo essencial para a eficiência da extração. Assim foram realizados mais quatro ensaios utilizando diferentes sistemas de homogeneização, manual, em banho de ultrassom, em mesa agitadora orbital e em agitador tipo vortex em diferentes tempos. Os testes realizados estão ilustrados na Tabela 5.

O efeito destas variáveis foram identificados e quantificados através de cromatografia líquida e detector por espectrometria de massas.

Tabela 5 – Formas de homogeneização analito/solvente.

<i>Agitações</i>	<i>Tempos (minutos)</i>		
Manual	0,5	1	1,5
Banho de ultrassom	5	10	30
Mesa Agitadora Orbital (shaker)	5	10	30
Agitador de Tubos (vortex)	5	10	15

3.8 Validações dos sistemas CCD, HPLC-DAD e LC-MS

Definidas as melhores condições de separação e extração das micotoxinas estudadas, em CCD, HPLC-DAD e LC-MS, o passo seguinte foi a validação das técnicas cromatográficas para análise de citrinina e ocratoxina A, segundo indicativos de desempenho descritos a seguir.

3.8.1. Curva analítica e linearidade

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a facilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais a concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2003). As curvas analíticas são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito (RIBANI *et. al.*, 2004).

A variável independente (eixo horizontal) relaciona-se às várias concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e a variável dependente (eixo vertical) relaciona o sinal analítico obtido para cada concentração do padrão. Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que é válida para um determinado intervalo de concentração do analito, independente da técnica instrumental utilizada. O coeficiente angular a , expressa a inclinação do gráfico em relação aos eixos, enquanto que o coeficiente linear b expressa a interseção do gráfico com os eixos (RIBANI *et. al.*, 2004).

O número mínimo de pontos geralmente aceito nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos ou mais. Essas concentrações devem ser escolhidas de forma a cobrir uma faixa de 50 a 150 % do valor que se espera encontrar na amostra de estudo (INMETRO, 2003).

Também é possível calcular o coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação r^2 , que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 (RIBANI *et. al.*, 2004). Valores de r iguais ou superiores a 0,99 são recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003).

Os testes de linearidade realizados neste trabalho para os sistemas CCD, HPLC-DAD e LC-MS estão descritos abaixo.

Cromatografia de camada delgada

Foram preparadas soluções nas concentrações de $5,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para CIT e $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para OTA e aplicados quantidades crescentes, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 15 μL , destes padrões em placas de sílica gel 60 (Merck[®]) que foram eluídas em cuba de vidro com a mistura dos solventes tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:2 v/v/v). Os equivalentes em gramas aplicados estão ilustrados na Tabela 6. As placas eluídas foram secas em condições ambiente e observadas sob a luz ultravioleta de ondas curtas e longas (254 e 366 nm).

Como limite de detecção foi considerado o nível no qual, as toxinas adicionadas podiam ser visualizadas de forma inequívoca por, no mínimo, 2 analistas treinados. O limite de quantificação foi avaliado considerando $\text{LOD} \times 3,33$ como descrito por Ribani *et. al.*, (2004). Esses procedimentos foram realizados com 3 repetições.

Tabela 6 – Concentrações abrangidas pela curva analítica das micotoxinas em CCD.

<i>Pontos (μL)</i>	<i>Citrinina ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)</i>	<i>Ocratoxina A ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)</i>
1	5,1	2
2	10,2	4
3	15,3	6
4	20,4	8
5	25,5	10
6	30,6	12
7	35,7	14
8	40,8	16
10	51	20
15	76,5	30

A linearidade das micotoxinas estudadas em HPLC-DAD cobriu a faixa de 1,5 a 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ num total de seis pontos e o registro do sinal resposta foi traçado com o auxílio do sistema de aquisição de dados Empower Software, que fornece o coeficiente de determinação (r^2) e equação de concentração versus sinal. Cada ponto foi injetado três vezes e a partir dos valores das médias das áreas foram calculados os coeficientes de variação.

Para o LC-MS foram preparadas soluções na faixa de 0,001 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para ambas as micotoxinas. O registro do sinal foi traçado com o auxílio do sistema de aquisição de dados ManLynx 4.1, que forneceu o coeficiente de determinação e equação da concentração versus sinal. As seis concentrações de padrão testadas foram injetadas três vezes. Com os valores das áreas registradas foram calculados os coeficientes de variação.

3.8.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, ambos, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et. al.*, 2004).

Para determinação deste indicativo de mérito foi utilizado o procedimento descrito por Thompson *et. al.* (2002) que pode ser calculado empregando as equações (2) e (3), respectivamente.

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas, de cada uma das micotoxinas estudadas, foi realizada a determinação da estimativa do LOD do instrumento

(LOD_i) e do método (LOD_m), bem como o do LOQ do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m).

A partir das áreas e dos valores dos desvios padrão relativos (RSD), de cada micotoxina presente nas seis soluções analíticas estudadas, aplicando-se a Equação 2, foi estimado o LOD_i .

$$LOD_i = 3 \times RSD \times C \quad \text{eq. 2}$$

onde: C: concentração da solução;

RSD (%): desvio padrão relativo

O valor estimado do LOD_i multiplicado pelos fatores de diluição para o método de extração foi estimado o LOD_m em $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

A partir do LOD_i , foi aplicada a Equação 3, e obtido o LOQ_i .

$$LOQ_i = LOD_i \times 3,33 \quad \text{eq. 3}$$

O LOQ_i multiplicado pelos fatores de diluição para o método de extração resultou no LOQ_m estimado.

3.8.3. Exatidão (recuperação)

Esta figura de mérito representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referencia aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações, então, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse (RIBANI *et. al.*, 2003). De acordo com ANVISA isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, próximos ao limite de quantificação. Neste trabalho foram realizadas contaminações em três diferentes níveis 10, 12, 14 e 35, 40, 51 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para ocratoxina A e citrinina, respectivamente, para avaliar a recuperação em CCD.

Para avaliar a exatidão da metodologia proposta em HPLC-DAD e LC-MS, foram fortificadas amostras de farelo de arroz em três diferentes níveis 3, 4 e 6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$; 0,1; 0,4 e 0,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para ocratoxina A e 8, 10, 15 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para citrinina, e a recuperação foi avaliada.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de traço estão entre 70 e 120% com precisão de até $\pm 20\%$ (GARP, 1999).

3.8.4. Precisão (repetitividade)

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Ela é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s) (RIBANI *et. al.*, 2004), demonstrado na equação 4.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\chi_i - \bar{\chi})^2}{n-1}} \quad \text{eq.4}$$

A precisão, é expressa através do coeficiente de variação (CV), demonstrado na equação 5.

$$CV(\%) = \frac{s}{x} \times 100 \quad \text{eq.5}$$

Em métodos de análise de traço ou impurezas, são aceitos CV de até 20%. Neste trabalho a precisão foi avaliada com três níveis diferentes de contaminações, para todos os sistemas. No caso da CCD os resultados foram avaliados de acordo com a intensidade da fluorescência característica das micotoxinas, e, calculando a média das áreas para HPLC-DAD e LC-MS.

3.9 Aplicação do procedimento desenvolvido

Para avaliar a aplicabilidade do procedimento de extração, separação e quantificação de ocratoxina A e citrinina, simultaneamente, desenvolvidos, foram utilizadas 38 amostras de arroz (*Oryza sativa*, L.) constituídas por arroz cultivado nos campos experimentais do IRGA, unidade de Cachoeirinha e arroz armazenado em silos.

As amostras analisadas estavam distribuídas conforme as frações de beneficiamento da variedade BR IRGA 417 da safra 2007/2008 das mais utilizadas nas culturas do RS conforme seguinte separação: arroz branco tratado e não tratado, arroz branco com casca tratado e não tratado, arroz parboilizado sem casca tratado e não tratado, arroz parboilizado com casca tratado e não tratado. As amostras provenientes de silos foram: farelo de arroz, arroz com casca coletadas em silos das unidades IRGA de Cachoeirinha, provenientes da safra de 2006/2007.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adequações dos sistemas cromatográficos

4.1.1 Cromatografia em camada delgada

Foram preparadas soluções analíticas das duas micotoxinas na concentração de 10 µg mL⁻¹ em benzeno:acetonitrila (98:2 v/v). As misturas de solventes testadas para separação da citrinina e ocratoxina A simultaneamente, foram escolhidas de acordo com a série eluotrópica (COLLINS, 2006) ilustrada no anexo A, considerando que as duas micotoxinas possuem caráter mediamente polar, sendo a citrinina menos polar que a ocratoxina A. Os fatores de retenção determinados nas diferentes fases móveis estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Eficiência da eluição de OTA e CIT em diferentes solventes.

<i>Mistura de Solventes</i>	<i>Revelação</i>	<i>Rf OTA</i>	<i>Rf CIT</i>
Tolueno:Acetato de Etila:Clorofórmio:Ácido Fórmico (7:5:5:0,5)	Vapor de NH ₃ por 10'	0,8	0,8
Tolueno:Acetato de Etila:Clorofórmio:Ácido Fórmico (7:5:5:1)	Vapor de NH ₃ por 10'	0,46	-
Tolueno:Acetato de Etila:Clorofórmio:Ácido Fórmico (7:5:5:2)	Vapor de NH ₃ por 10'	0,69	0,76
Tolueno:Acetato de Etila:Clorofórmio:Ácido Fórmico (7:5:5:3)	Vapor de NH ₃ por 10'	0,92	0,92
Éter Etílico:Hexano:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (7:9:4:2)	AlCl ₃ :MeOH 20% seco 105°C por 5'	0,84	-
Tolueno:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (5:4:1)	Sem revelação	0,69	0,65
Tolueno:Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:2)	Sem revelação	0,69	0,63
Tolueno:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (6:4:1)	Sem revelação	0,69	0,66
Tolueno:Acetato de Etila:Ácido Fórmico (6:4:2)	Sem revelação	0,69	0,65

(-): não foi visualizado.

A mistura de solventes selecionada foi a de tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:2 v/v/v) utilizada por Dawlatana *et. al.* (1996) para ocratoxina A e posteriormente testada para citrinina por Pepeljnjak *et. al.* (2002). Em um ambiente ácido, conferido pelo ácido fórmico a fluorescência fraca da citrinina foi acentuada, sendo visualizada com o tom amarelo que lhe confere o nome, (VÁZQUEZ *et. al.*, 1997) sem afetar a fluorescência verde da ocratoxina A (RIBEIRO *et. al.*, 2006). Além disso, este eluente, proporcionou a melhor separação das micotoxinas, como pode ser observado na Figura 9, onde a fluorescência de maior R_f é a ocratoxina A e a de menor a citrinina.

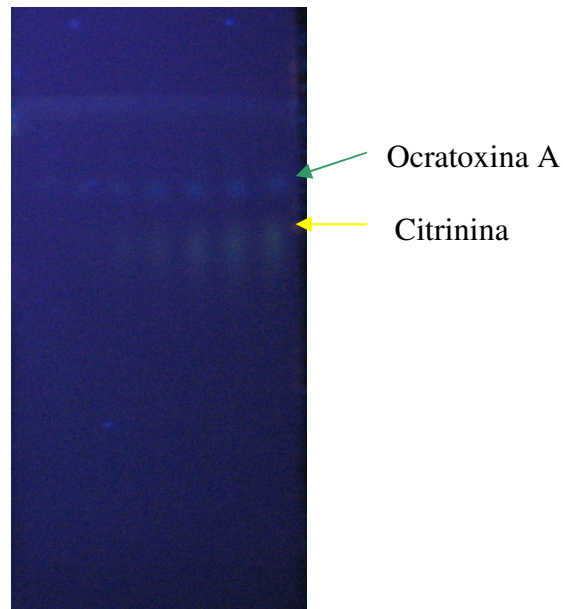


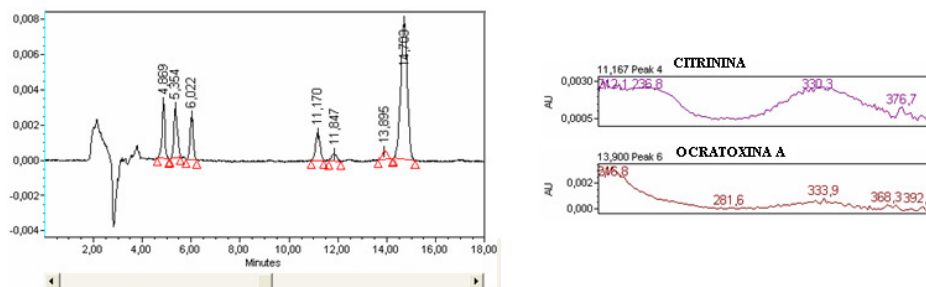
Figura 9. Curva analítica em CCD.

4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos

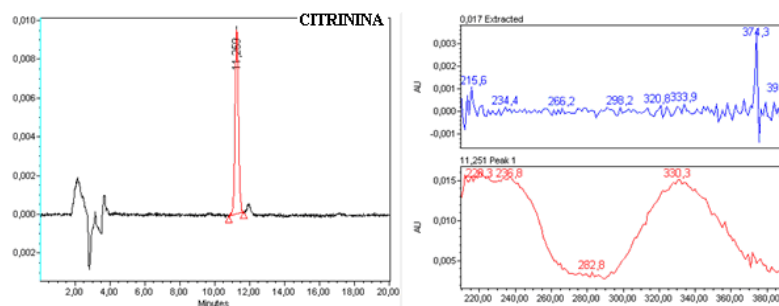
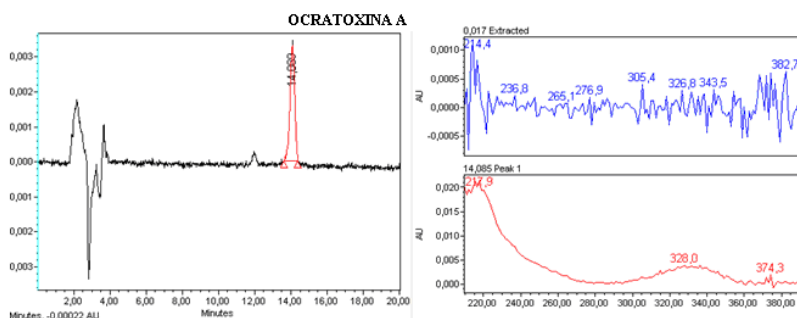
Para estabelecer as melhores condições cromatográficas para detecção das micotoxinas (Tabela 8) foram feitas seis injeções da mistura delas. O comprimento de onda escolhido foi o universal, isto é, de 254 nm. Na tabela 8 aparecem às condições que proporcionaram a melhor resolução e na Figura 10 estão os perfis da absorção delas a 254 nm.

Tabela 8 – Condições cromatográficas para as micotoxinas OTA e CIT

Parâmetros	HPLC-DAD
Coluna	Synergi Fusion – RP 80 A (250 x 4,6 mm d. i. 4 μ)
Fase Móvel	Acetonitrila:Água Purificada pH 3,0 (50/50 v/v)
Vazão da fase móvel	1 mL min ⁻¹
Alça de injeção	20 μ L
Tempo de corrida	20 minutos
Detector	Arranjo de Diodos (DAD), 254 nm

**Figura 10.** Cromatogramas de citrinina e ocratoxina e seus espectros em 254 nm.

Devido ao detector de arranjo de diodos também foi possível verificar o cromatograma de cada micotoxina no seu máximo de absorção. Para a citrinina em 330 nm e 217 para ocratoxina A, como mostra as Figura 11 e 12.

**Figura 11.** Cromatogramas da citrinina em 330 nm.**Figura 12.** Cromatogramas da ocratoxina A em 217 nm.

4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectro de massas

Foram realizadas quatro injeções para estabelecer as melhores condições cromatográficas para detecção da citrinina e ocratoxina A esses dados para as melhores condições operacionais para o detector de massas estão ilustradas na Tabela 9. Com estas condições, o perfil do cromatograma das duas micotoxinas pode ser observado na Figura 13.

Tabela 1 – Condições cromatográficas e parâmetros estabelecidos.

<i>Parâmetros</i>	<i>LC-MS</i>
Coluna	Waters® X Terra MS C ₁₈ (3,0 x 50 mm d. i. 3,5 µm)
Fase Móvel	Acetonitrila:Água purificada (60:40 v/v)
Vazão da fase móvel	0,4 mL min ⁻¹
Alça de injeção	10 µL
Tempo de Corrida	7 minutos
Análise	MRM – Monitoramento de reações múltiplas
Voltagem do capilar (KV)	4,0
Voltagem do cone (KV)	30
Temperatura da fonte (° C)	120
Desolvatação (° C)	350
Pressão gás de colisão	Argônio 3,5 10 ³ bar
Ionização	ESI – (Citrinina) e ESI+ (Ocratoxina A)
Energia de Colisão (eV)	12 (Citrinina) e 15 (Ocratoxina A)
Íon precursor	249 (Citrinina) e 404 (Ocratoxina A)
Íon produto	205 (Citrinina) e 239 (Ocratoxina A)

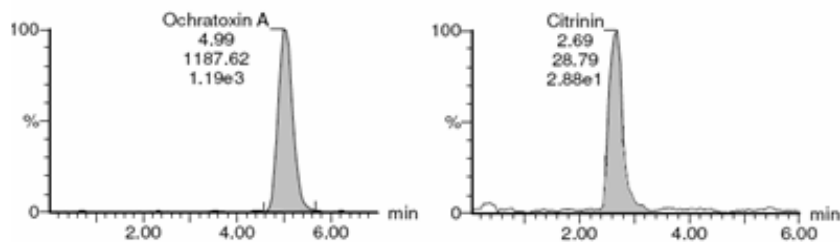


Figura 13. Cromatogramas da ocratoxina A (A) e citrinina (B).

De acordo com a Figura 13 a intensidade do pico da ocratoxina A (1.19×10^3) foi superior ao da citrinina (2.88×10^1) do mesmo modo que a força de colisão do gás 1187,62 para ocratoxina A e 28.79 para a citrinina.

4.2 Efeito da granulometria na recuperação das micotoxinas

Os resultados do efeito da granulometria na recuperação das micotoxinas usando a extração pelo método QuEChERS (ANASTASSIADES *et. al*, 2003), identificação e quantificação em sistema LC-MS estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Efeito da granulometria das amostras na recuperação da OTA e CIT.

Granulometria (Tiler)	Recuperação OTA (%)	CV _{OTA} (%)	Recuperação CIT (%)	CV _{CIT} (%)
14	97,7 ^d	0,8	83,5 ^c	2,8
24	96,7 ^f	2,3	97,5 ^d	4,7
28	103,7 ^c	0,1	106,1 ^c	2,0
32	110,2 ^b	0,1	115,5 ^b	1,1
35	118 ^a	1,8	96,7 ^d	5,6
42	111,7 ^b	0,7	131,6 ^a	0,6
> 42	77,5 ^e	1,0	76,9 ^f	4,0

CV (%): Coeficiente de variação.

a,b,c,d,e,f: Teste de Tukey (SAS, 2003).

O tiler 42 resultou num extrato escuro atribuído a interferentes tais como açúcares e lipídios presentes no grão que ocasionaram uma superestimação nos níveis recuperados superior a 100% o que não é recomendável pela possibilidade de detectar falsos positivos.

Para citrinina a distribuição amostral foi considerada normal e homocedástica (independente), isto é, a curva analítica pode ser construída pelo método dos mínimos quadrados e para a ocratoxina A normal e heterocedástica (dependente) demonstrando a variância das respostas com as granulometrias 32 e 42 para OTA e 24 e 35 para CIT, assim de acordo com a utilização da ANOVA e teste de Tukey (BOX 1953) onde $p < 0,05$ não havia diferença significativa entre esses resultados, como ilustra a Figura 14.

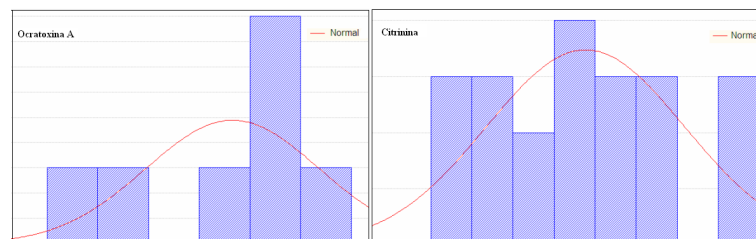


Figura 14. Distribuição amostral da normal da OTA e CIT.

Devido à pequena diferença em relação ao tamanho da partícula entre os tiler 32 e 35, foi adotada a granulometria 32 tiler para determinação simultânea das micotoxinas de interesse, faixa granulométrica que proporcionou melhor recuperação e um rendimento em massa maior.

4.3 Recuperações das micotoxinas pelos diferentes métodos

Nesta etapa a estimativa dos teores das micotoxinas presente na amostra foi efetuada através da comparação visual da intensidade de fluorescência das manchas suspeitas após eluição delas em cromatografia de camada delgada (Tabela 11), com as dos padrões, utilizados em concentrações crescentes na faixa de linearidade. Os percentuais de recuperação foram estimados em função da contaminação inicial da amostras.

Tabela 11 – Recuperação (%) de CIT e OTA em CCD

<i>Extrações</i>	<i>Soares e Rodrigues-Amaya</i>	<i>Tanaka</i>	<i>QuEChERS</i>	<i>Ultrassom</i>
Citrinina	60	80	70	50
Ocratoxina A	90	100	90	60

Para a ocratoxina A, com exceção do método que emprega ultrassom, todos os métodos apresentaram recuperação entre 90 e 100 %, e estão conforme relatos dos autores Sylos *et. al.* (2003) e Furlong (2003). Para citrinina as melhores condições para a recuperação foi verificada com o método Tanaka. Em vista da recuperação promissora do método QuEChERS e das vantagens dele em termos de geração de resíduo e tempo de exposição do analista este foi escolhido para otimização.

4.4 Otimização do procedimento de extração QuEChERS

Apesar da simplicidade e recuperação promissora do método QuEChERS a agitação manual para extração (LEHOTAY *et. al.*, 2005, ANASTASSIADES *et. al.*, 2003) tornando dependente do analista, e constitui um parâmetro de difícil controle. Então a otimização começou com esta etapa através de quatro ensaios realizados em amostras fortificadas com $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e/ou $0,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ tendo como variáveis a forma e o tempo de agitação. Os resultados estão na Tabela 12. A agitação contínua com a utilização de um equipamento facilitou o controle desta variável, mantendo-a uniforme e com uma recuperação de 95 % se empregado agitação em agitador orbital durante 10 minutos, 1600 rpm, a temperatura ambiente.

Tabela 12 – Efeito das condições de agitação na recuperação.

<i>Agitação (min)</i>	<i>Média</i>	<i>S</i>	<i>CV (%)</i>	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g Kg}^{-1}$	<i>Rec. (%)</i>
<i>Manual</i>						
0,5	799,85	64,34	8,04	0,29	43	43
1	1013,70	71,66	7,07	0,36	54	54
1,5	681,43	7,36	1,08	0,24	37	37
<i>Agitador tubos</i>						
5	668,85	8,79	1,31	0,24	36	36
10	742,42	44,08	5,94	0,27	40	40
30	1361,35	37,68	2,77	0,49	73	73
<i>Agitador orbital</i>						
5	1180,75	20,16	1,71	0,42	63	63
10	1759,62	18,59	1,06	0,63	95	95
30	1646,67	51,92	3,15	0,59	88	88
<i>Ultrassom</i>						
5	1557,59	49,95	3,21	0,56	84	84
10	1672,68	14,22	0,85	0,60	90	90
30	1618,61	82,37	5,09	0,58	87	87

S: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Rec.: recuperação.

Os dados comprovam que a agitação manual não é uniforme além de tornar o trabalho penoso para o analista. Além disso, o aumento do tempo de agitação manual tendeu a diminuir o nível de recuperação em 68 %. Nos demais sistemas de agitação, onde houve um aumento do contato soluto/solvente, não foram verificadas diminuição significativa da

recuperação. As melhores recuperações foram verificadas aos 10 minutos tanto para agitador orbital como em banho de ultrassom, com valores de 95 e 90 %, respectivamente. Foi selecionado o uso de agitador orbital durante 10 minutos.

Para validar o método QuEChERS foi realizado um planejamento fatorial na ordem de 2^4 (RODRIGUEZ, 2005), tendo como variáveis: água adicionada (10 (-1), 15 (0) e 20 mL (+1)), acidificação do solvente de extração (sem adição (-1), 0,05 (0) e 0,1 mL (+1)), proporção dos sais utilizados (sulfato de magnésio 6 (+1), 4,5 (0) e 3 g (-1), acetato de sódio 3,4 (+1), 2,6 (0) e 1,7 g (-1) e citrato de sódio 2 (+1), 1,5 (0) e 1 g (-1)) e celite (200 (-1) e 500 mg (+1)). Uma contaminação de $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de ocratoxina A e citrinina, foi utilizada para a realização destes experimentos em amostras de arroz, as recuperações e desvio padrão relativo encontram-se na Tabela 12.

A análise estatística dos dados do planejamento experimental foi realizada através do programa Statistical Analyses System 6.0, considerando o desvio padrão relativo e a recuperação da ocratoxina A como resposta das variáveis em estudo (Tabela 13). Não foi possível, realizar a leitura para a citrinina devido a um imprevisto no equipamento.

Tabela 13 – Recuperação do planejamento em relação a recuperação da OTA.

<i>Exp.</i>	<i>Média</i>	<i>S</i>	<i>CV%</i>	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g Kg}^{-1}$	<i>Rec %</i>
1	39,09	5,11	13,08	0,01	2,1	42
2	64,84	9,81	15,14	0,02	3,5	70
3	54,60	5,24	9,60	0,02	2,9	59
4	76,11	6,34	8,33	0,03	4,1	82
5	97,63	7,62	7,81	0,03	5,2	105
6	14,55	2,91	20,01	0,01	0,8	16
7	68,20	10,48	15,36	0,02	3,7	73
8	35,32	3,60	10,20	0,01	1,9	38
9	76,92	7,01	9,11	0,03	4,1	83
10	85,54	11,76	13,74	0,03	4,6	92
11	67,45	4,20	6,22	0,02	3,6	72
12	84,76	7,84	9,24	0,03	4,6	91
13	97,36	8,92	9,16	0,03	5,2	105
14	92,86	6,57	7,08	0,03	5,0	100
15	82,00	4,27	5,21	0,03	4,4	88
16	47,90	0,93	1,95	0,02	2,6	51
17	55,80	3,29	5,89	0,02	3,0	60
18	63,87	4,49	7,03	0,02	3,4	69
19	54,23	4,22	7,79	0,02	2,9	58
20	79,69	1,95	2,45	0,03	4,3	86
21	72,73	4,88	6,71	0,03	3,9	78
22	78,30	1,23	1,57	0,03	4,2	84

Exp.: Experimento; S: Desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Rec.: Recuperação.

Os dados da Tabela 13 permitiram verificar que os pontos que obtiveram a melhor recuperação, aproximadamente de 100 a 105% foram: 5, 13 e 14. Nestas condições a quantidade de água ótima adicionada foi de 20 mL, com acetonitrila acidificada a 0,1 % de ácido acético e a menor quantidade dos sais, 3 g de sulfato de magnésio; 1,7 g de acetato de sódio; 1 g de citrato e 200 mg de celite empregados. Na Tabela 14 aparecem especificados os coeficientes dos efeitos de cada variável estudada em relação ao desvio padrão obtido no planejamento.

Tabela 14 – Efeitos e coeficientes para as variáveis estudadas em relação ao RSD.

<i>Fatores</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>P</i>
Média	8,75818	0,552210	0,000018
Umidade	-4,72750	1,295048	0,014741
Acidificação	-0,96000	1,295048	0,491847
Sais	-3,62750	1,295048	0,037946
Celite	1,26750	1,295048	0,402663

A eficiência da metodologia para as amostras de arroz pode ser verificada através da análise do coeficiente de variação (CV), permitindo observar que os fatores, umidade e níveis de sais, influenciaram significativamente ($p < 0,05$). Para estas duas variáveis, a repetitividade dos dados, menor CV, foi observada quando utilizada uma amostra com maior volume de água adicionado (20 mL) e menor quantidade de sais (3 g sulfato de magnésio, 1,7 g acetato de sódio e 1 g citrato de sódio) para separação da fase orgânica da aquosa, como demonstrado na Figura 15.

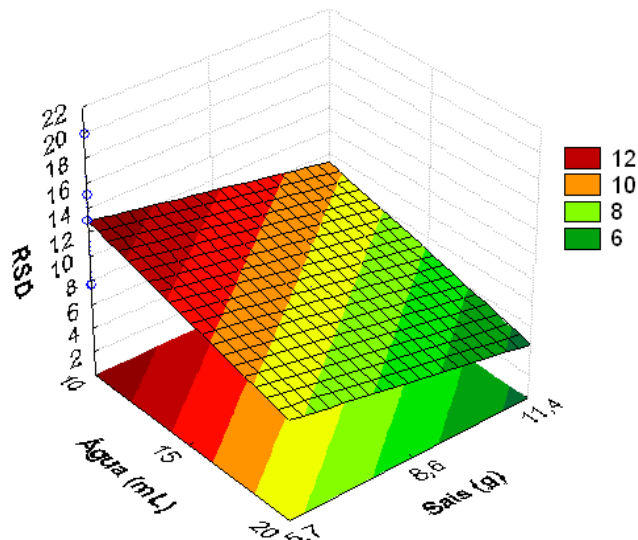


Figura 15. Superfície de resposta para os resultados em relação ao CV.

Estas informações foram importantes indicadores para adaptação de metodologia, pois os níveis recuperados eram confiáveis para aplicação em levantamento de ocorrência de contaminação e estimativa de risco de dano no consumo, uma vez que as figuras de mérito atendem a especificada por legislação da Comunidade Européia. Na Tabela 15 estão apresentados os resultados do efeito da recuperação obtido no planejamento.

Tabela 15 – Efeitos e coeficientes para as variáveis estudadas em relação à recuperação.

<i>Fatores</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>p</i>
Média	72,8182	2,564619	0,000001
Umidade	24,6250	6,014566	0,009408
Acidificação	-1,8750	6,014566	0,767816
Sais	-7,3750	6,014566	0,274721
Celite	-10,8750	6,014566	0,130389

O índice de recuperação para esta metodologia adaptada também indicou a variável umidade como significativa aumentando o efeito da recuperação em 24,6% ($p < 0,05$) quando utilizado o maior volume de água adicionada. Estes dados sugerem que a maior eficiência da extração decorreu da hidratação do tecido celular facilitando a migração do solvente para o interior da matriz. Quando se trata de analito presente em quantidades traços, é importante verificar efeitos com significância de até $p = 0,3$ (CAULCUTT *et. al.*, 1983), como foram os verificados para a concentração de sais e celite associados ao efeito na diminuição da recuperação de 7,4 e 10,8%, respectivamente. Devido a isto, foram realizadas ensaios para verificar as avaliações em relação aos sais e celite utilizados, os resultados estão apresentados na Tabela 16 e 17.

Foram realizados seis experimentos que utilizaram como base a melhor condição do planejamento, ou seja, o ponto de maior recuperação (experimento 13, Tabela 13), no qual foi utilizada a maior quantidade de água. As variáveis empregadas foram acidificação com ácido acético glacial (0,1 e 0,2 mL), sulfato de magnésio (3; 1,5; 0,85; 0,5 e g), acetato de sódio (1,7; 0,85 e 0 g) e citrato de sódio (1; 0,5 e 0 g), a contaminação estudada foi de 5 ppb.

Tabela 16 – Combinação das variáveis do experimento 13.

<i>Ensaio</i>	<i>Acidez (mL)</i>	<i>Sulfato de magnésio (g)</i>	<i>Acetato de sódio (g)</i>	<i>Citrato de sódio (g)</i>	<i>Celite (g)</i>
1	0,1	3	1,7	1	0,2
2	0,2	-	-	-	0,2
3	0,2	1,5	0,85	-	0,2
4	0,1	1,5	0,85	-	0,2
5	0,2	0,85	-	-	0,2
6	0,2	0,5	-	0,5	0,2

(-) Sem adição.

O ensaio 3 foi o que apresentou a melhor combinação de concentração salina (1,5 g de sulfato de magnésio e 0,85 g de acetato de sódio), acidificação (0,2 mL) e quantidade de celite (0,2 g) adicionada, resultando em 98% de recuperação da micotoxina, como mostra a Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados do efeito das variáveis do planejamento na recuperação.

<i>Ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>S</i>	<i>CV%</i>	$\mu\text{g mL}^{-1}$	<i>ppb</i>	<i>Rec %</i>
1	73,38	0,83	1,13	0,03	4	78,9
2	61,87	0,79	1,28	0,02	3	66,5
3	91,20	2,51	2,75	0,03	5	98,1
4	55,75	0,13	0,23	0,02	3	60,0
5	23,63	1,14	4,81	0,01	1	25,4
6	52,93	1,02	1,93	0,02	3	56,9

S: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Rec.: Recuperação.

A acidificação da acetonitrila para extração teve como fim minimizar a instabilidade dos compostos estudados em meio básico, ficando demonstrado seu efeito benéfico nos resultados do terceiro ensaio. A menor instabilidade também foi observada com o tamponamento decorrente da adição de 0,1% de ácido acético glacial e acetato de sódio no mesmo ensaio. A adição de sulfato de magnésio e citrato de sódio promoveram uma eficiente partição líquido-líquido, facilitando a remoção de componentes polares da matriz (LEHOTAY *et. al.*, 2005). No entanto não foi observada diferença significativa quando da adição do citrato de sódio.

A centrifugação, que fornece uma separação física perfeita das fases, o *clean up* e a remoção de água residual foram executadas simultaneamente utilizando a extração em fase sólida dispersiva, onde o sulfato de magnésio, como descrito na metodologia para pesticida

(ANASTASSIADES *et. al.*, 2003), foi também adequado para emprego neste caso. Extratos mais limpos foram verificados após a adição de celite (CALDAS *et. al.*, 2002), que limita a quantidade de componentes extraídos da matriz, tais como lipídios e açúcares (BADIALE-FURLONG *et. al.*, 1995). Estas etapas seguidas da agitação e centrifugação do extrato possibilitaram a análise cromatográfica.

4.4.1 Método QuEChERS adaptado

O método QuEChERS adaptado para a extração simultânea das micotoxinas, ocratoxina A e citrinina, neste trabalho consistem no procedimento (ilustrado no anexo C) a seguir descrito. Foram tomada 10,0000 g da fração de amostra de arroz triturado em moinho de facas e proveniente da fração granulométrica 32 tiler em um erlenmeyer ao qual foi adicionado 20 mL de água destilada e 20 mL de acetonitrila acidificada com 0,2 mL de ácido acético glacial. A homogeneização da mistura foi realizada em mesa agitadora orbital durante 5 minutos a 800 rpm, adição de 1,5 g de sulfato de magnésio; 0,85 g de acetato de sódio e nova agitação durante 5 minutos, 800 rpm. O material foi centrifugado por 8 minutos, ao sobrenadante foram adicionados 0,3 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de celite, agitados manualmente durante 1 minuto e nova centrifugação por 8 minutos. O sobrenadante foi seco em concentrador sob nitrogênio. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

4.5 Validações dos procedimentos

4.5.1 Cromatografia de camada delgada

Estabelecido o eluente da cromatografia de camada delgada que melhor separou as micotoxinas, tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:2 v/v/v), foram avaliados os limites

de detecção e quantificação da ocratoxina A e citrinina. Na Tabela 18 estão apresentados a performance característica da separação de OTA e CIT em camada delgada.

Tabela 18 – Indicativos para análise em CCD.

<i>Indicativos analisados</i>	<i>Citrinina</i>	<i>Ocratoxina A</i>
Curva analítica ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	34 a 76,5	20 a 30
LOD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	10,2	6
LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	34	20
Recuperação (%)	74	84
<i>R_f</i>	0,63	0,69

De acordo com estudos realizados em diferentes matrizes utilizando cromatografia de camada delgada os limites de detecção e quantificação foram aceitáveis. Autores como Caldas *et. al.* (2002), utilizaram CCD para determinar ocratoxina A em amostras de amendoim, o limite de quantificação encontrado foi de $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Sylos *et. al.* (2003) analisaram a presença de ocratoxina A, aflatoxina B₁ e B₂ a partir de CCD em 68 amostras de arroz distribuídas entre integral e polido, encontrando para ocratoxina A valores de LOD de 4 e $9 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para arroz polido e LOQ de 9 e $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para arroz integral, de todas as amostras nenhuma apresentou contaminação com ocratoxina A.

4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A Tabela 19 apresenta as áreas relativas à concentração ($1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) capaz de gerar um sinal três vezes maior que a menor concentração ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). A Tabela 20 apresenta os indicativos de mérito para determinação das micotoxinas em estudo no sistema HPLC-DAD e nas Tabelas 21 e 22 para LC-MS. A maior área observada para a citrinina está conforme a sua absorvidade sob o 250 nm em metanol.

Tabela 19 – Áreas relativas para CIT e OTA em HPLC-DAD.

<i>Micotoxina</i>	<i>Concentração</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>	<i>Área 3</i>	<i>Média</i>
Citrinina	1,5	14547,61	14486,99	14839,28	14624,63
Ocratoxina A	1,5	8337,74	8321,19	8190,64	8283,19

Tabela 20 – Indicativos de desempenho do HPLC-DAD

<i>Indicativos</i>	<i>Citrinina</i>	<i>Ocratoxina A</i>
Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,5 a 7,5	1,5 a 5
Equação da curva	$y = 8 \cdot 10^3 \cdot x + 3,54 \cdot 10^{-3}$	$y = 4,9 \cdot 10^3 \cdot x + 1,78 \cdot 10^{-3}$
Coefficiente de determinação	0,994	0,995
LOD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	0,73	0,89
LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	2,4	3
Recuperação	90	102
Desvio padrão	188,35	80,58
Desvio padrão relativo	1,3	0,97

Autores como Juan *et. al.* (2008) analisaram a presença de ocratoxina A em 83 amostras de cereais utilizando o sistema HPLC-FLD, os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,05; 0,19 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente. Soriano *et. al.* (2004) avaliaram a presença de ocratoxina A em 60 amostras de cereais pelo sistema HPLC-FLD e encontraram o limite de detecção de 0,25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e quantificação de 0,75 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Monaci *et. al.* (2005) analisaram ocratoxina em 30 amostras de salame italiano utilizando o sistema HPLC-FDL, o limite de detecção encontrado foi de 0,06 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Meister *et. al.* (2004) utilizaram o sistema HPLC-FLD para analisar a presença de citrinina em amostras de cereais e obtiveram como limite de detecção e quantificação entre ~ 1 -2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e 3-5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, Leszkowicz *et al.* (2007) analisaram a presença de ocratoxina A e citrinina em cereais comercializados na França utilizando HPLC-FLD, os limites de detecção e quantificação encontrados foram 0,11; 0,35 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para citrinina e 0,08; 0,25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para ocratoxina A. Outros detectores também foram estudados como por Goldberg *et. al.* (2001) utilizou HPLC-DAD para determinação de ocratoxina A em amostras de vinho e cerveja e encontrou limites de detecção e quantificação de 0,05 e 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Embora fosse esperados limites de detecção e quantificação superiores aos que se esperariam empregando detector de fluorescência, os estabelecidos neste trabalho permitem cumprir as exigências legais para estas micotoxinas.

Tabela 21 – Áreas relativas a CIT e OTA em LC-MS.

<i>Micotoxina</i>	<i>Concentração</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>	<i>Área 3</i>	<i>Média</i>
Citrinina	0,025	1,83	1,87	1,68	1,79
Ocratoxina A	0,005	15,59	16,56	15,79	15,98

No caso deste detector as maiores áreas foram verificadas para a ocratoxina A, possivelmente decorrentes de sua fragmentação no detector gerando íons de maior massa (anexo D) concentração versus sinal. Este aspecto reflete nos menores limites de detecção e quantificação mostrada na Tabela 22.

Autores como Degelmann *et. al.* (1999) determinaram ocratoxina A utilizando LC-MS em amostras de cerveja, os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,01; 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, semelhantes a Zoellner *et. al.* (2000) que analisaram a presença de ocratoxina A em amostras de vinhos utilizando o sistema LC-MS, com limite de detecção de 0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, Spanjer *et. al.*, (2008) analisaram a presença de 33 micotoxinas em diversas matrizes, empregando este detector e os limites de quantificação encontrados para ocratoxina A e citrinina foram: 1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, superiores ao deste trabalho.

Tabela 22 – Indicativos de desempenho do LC-MS

<i>Indicativos</i>	<i>Citrinina</i>	<i>Ocratoxina A</i>
Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25 a 500	5 a 500
Equação da curva	$y = 55,61 \cdot x + 0,12$	$y = 2684,69 \cdot x + 2,93$
Coefficiente de determinação	0,986	0,992
LOD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	2,16	0,02
LOQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	7,2	0,07
Recuperação (%)	80	105
Desvio Padrão	0,003	0,51
Desvio Padrão Relativo (%)	1,6	3,2

Analisando as equações das curvas analíticas, dos dois procedimentos cromatográficos, concluiu-se que o modelo linear (Figura 16 e 17) é adequado para as micotoxinas em estudo, pois fornecem coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,98, demonstrando que os sistemas fornecem resultados diretamente proporcionais à concentração das micotoxinas em estudo, dentro da faixa de aplicação.

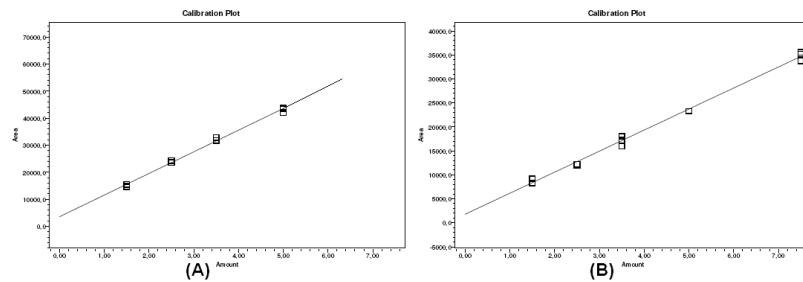


Figura 16. Linearidades da citrinina (A) e ocratoxina A (B) em HPLC-DAD.

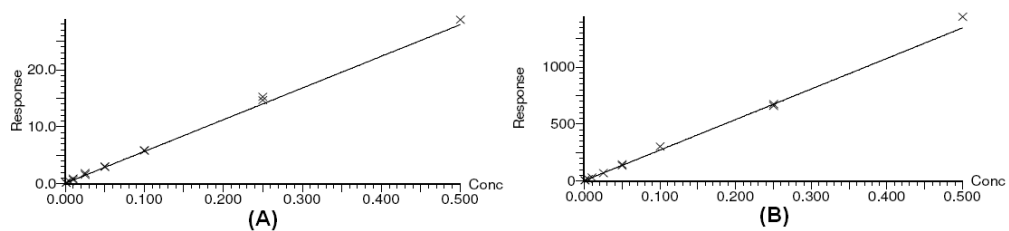


Figura 17. Linearidade da citrinina (A) e ocratoxina A (B) em LC-MS.

Os resultados encontrados demonstram que os limites de detecção encontrados para citrinina e ocratoxina A em camada delgada foram 4,7 e 6 vezes maior que para cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e 14 e 300 vezes maior que cromatografia líquida acoplada a detector de massas. Os limites de quantificação das duas micotoxinas ficaram dentro do exigido pela legislação europeia para OTA de $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para HPLC-DAD e LC-MS. Na cromatografia de camada delgada esse valor ficou 4 vezes acima do estabelecido para ocratoxina A.

Dentre os critérios estabelecidos para avaliação da exatidão e precisão está a faixa aceitável estabelecida pela ANVISA que aceita valores de recuperações entre 70-120 % e para coeficiente de variação (CV) não superiores a 20 %. Os resultados da precisão em termos de repetitividade foram aceitáveis, uma vez que estão dentro do limite para as duas micotoxinas, variando entre 1,3 e 1,6 % para citrinina e 0,96 e 3,2 % para ocratoxina A. A exatidão em termos de recuperação seguiu o mesmo comportamento com valores que variaram entre 74 e 90 % para citrinina e 84 e 105 % para ocratoxina A.

4.6. Aplicação do procedimento em amostras

Depois de efetuada a validação do método, este foi aplicado em amostras de arroz (*Oryza sativa*, L.) e os derivados destinados ao consumo humano provenientes de campos experimentais do IRGA unidade Cachoeirinha na safra de 2007/2008, e de silos da unidade cultivados em duas safras anteriores.

Apesar da superioridade do desempenho dos sistemas cromatográficos HPLC a triagem da ocorrência de micotoxinas foi realizada em cromatografia de camada delgada por ser um método de fácil realização e pelos seus limites de detecção encontrada ser superiores ao HPLC-DAD e LC-MS. Os resultados da triagem estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Contaminação com OTA e CIT detectada em amostras analisadas por CCD.

Amostras	Nº de amostras	Nº de amostras positivas (%)	
		OTA	CIT
Arroz com casca parboilizado tratado	3	3 (100)	nd
Arroz com casca parboilizado não tratado	3	1 (33)	nd
Arroz branco natural polido tratado	3	nd	nd
Arroz branco natural polido não tratado	3	nd	nd
Arroz com casca natural tratado	3	nd	nd
Arroz com casca natural não tratado	3	nd	nd
Arroz polido parboilizado tratado	3	nd	nd
Arroz polido parboilizado não tratado	3	nd	nd
Farelo parboilizado tratado	3	nd	nd
Farelo parboilizado não tratado	3	nd	1 (33)
Farelo branco natural polido tratado	3	nd	nd
Farelo branco natural polido não tratado	3	nd	nd
Farelo de arroz branco armazenado em Silo	1	nd	nd
Arroz natural com casca armazenado em Silo	1	1 (100)	nd

(nd) não detectado

Do total de amostras 33 (87%) não apresentaram contaminação com ocratoxina A e 37 (97%) com citrinina. A contaminação de ambas na mesma amostra não foi verificada pela triagem.

4.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

Os resultados encontrados para a análise da presença de ocratoxina A e citrinina nas amostras encontram-se apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Contaminação por OTA e CIT nas amostras analisadas por HPLC-DAD.

<i>Amostras</i>	<i>Nº de amostras positivas</i>	<i>CV%</i>	<i>µg mL⁻¹</i>	<i>Micotoxina (µg Kg⁻¹)</i>	
				<i>OTA</i>	<i>CIT</i>
<i>Farelo parboilizado não tratado</i>	1 (33%)	7,41	0,83	nd	120
<i>Arroz Nat. com casca armazenado em silo</i>	1 (100%)	3,37	3,73	560	nd

(CV): coeficiente de variação; (nd) não detectado.

Na safra 2007/2008 no total de 38 amostras analisadas a presença de ocratoxina A ocorreu na amostra de arroz natural com casca armazenado em silo com uma contaminação de 560 µg Kg⁻¹, 112 vezes acima do recomendado pela Legislação da União Européia que prevê para cereais a contaminação de ocratoxina A de no máximo 5 µg Kg⁻¹. A citrinina ocorreu em uma das amostras de farelo parboilizado não tratado, com uma contaminação de 120 µg Kg⁻¹. A concentração determinada pode ser considerada elevada se comparada aos LMT estabelecidos pela mesma legislação para micotoxinas de efeito semelhante como a ocratoxina A.

Comparativamente ao procedimento de CCD este se mostrou eficiente para detecção da contaminação que foi coincidente com os dados do sistema HPLC-DAD.

4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência LC-MS

Os resultados encontrados para análise de ocratoxina A e citrinina nas amostras de arroz em LC-MS/MS encontram-se ilustradas na Tabela 25.

Tabela 25 – Contaminação por OTA e CIT determinados por LC-MS

<i>Amostra</i>	<i>CV</i> (%)	$\mu\text{g mL}$	<i>Micotoxinas ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)</i>	
			<i>OTA</i>	<i>CIT</i>
Arroz com casca parboilizado tratado 1	14,70	0,03	4	nd
Arroz com casca parboilizado tratado 2	4,36	0,02	3	nd
Arroz com casca parboilizado não tratado	0,88	0,02	3	nd
Farelo parboilizado não tratado	6,17	0,86	nd	129
Farelo de arroz branco armazenado em silo	3,49	0,08	nd	12
Arroz natural com casca armazenado em silo	3,07	3,73	560	nd

(CV): Coeficiente de variação; (nd): não detectado.

Do total das 38 amostras, 4 delas apresentaram contaminação com ocratoxina A, sendo que 3 estavam com níveis abaixo do limite estabelecido pela União Européia ($5\mu\text{g Kg}^{-1}$). Em uma única amostra o nível alcançou 560 ppb, estando 112 vezes acima do LMT estabelecido. Ainda, 2 delas apresentaram contaminação por citrinina nos níveis de 12 e 129 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e nenhuma amostra apresentou contaminação simultânea com ambas as micotoxinas.

Este sistema cromatográfico, conforme o esperado, permitiu a verificação de um percentual maior de amostras contaminadas, inclusive abaixo dos níveis recomendados, que não isenta o risco de consumo crônico.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as modificações empregadas ao método de extração QuEChERS realizadas neste estudo, refletiam suas vantagens principais: rapidez, simplicidade, confiabilidade, robustez, baixo custo, baixo consumo de solventes, não necessitando de equipamentos e vidrarias especiais.

O método omite ou substitui muitas etapas analíticas complicadas empregadas geralmente nos métodos tradicionais tais como Soares e Rodrigues Amaya (1989), Tanaka (2001) e ultrassom (Palma *et. al.*, 2007). A etapa de extração e homogeneização foi otimizada com a utilização de agitador orbital e acidificação do solvente extrator, a partição foi otimizada pela quantidade de adição dos sais sulfato de magnésio e acetato de sódio, bem como a adição de 300 mg de sulfato de magnésio e 200 mg de celite na etapa de *clean up* onde estes são misturados diretamente com o extrato e agitado manualmente. Deste modo, pode-se afirmar que o método mostrou-se muito eficiente para os compostos estudados.

O uso dos sistemas CCD, HPLC-DAD e LC-MS, proporcionou grande especificidade, precisão e sensibilidade, de modo que os limites de detecção e quantificação, obtivessem valores inferiores ao limite máximo estabelecido por órgãos reguladores internacionais, com diferenças em relação ao limite de detecção e quantificação da citrinina em HPLC-DAD 14 vezes mais sensível que CCD, sendo o LC-MS 5 vezes mais sensível que o HPLC-DAD. Em relação a ocratoxina A os limites de detecção e quantificação em LC-MS foram 300 vezes mais sensíveis que o CCD e 7 vezes em relação ao HPLC-DAD.

A ocorrência de ocratoxina A e citrinina foi verificada em 16 % das amostras estando os teores detectados entre 3 e 560 ppb. Destas amostras 8% apresentaram níveis de contaminação inferiores ao limite máximo aceitável pela Comunidade Européia. O nível máximo encontrado foi de 560 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para ocratoxina A encontrado em amostra de arroz natural com casca armazenado em silo e 129 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para citrinina na amostra de farelo arroz branco parboilizado não tratado, com fungicida, mostrando a necessidade de verificação de ocorrência destas micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, D., HULASARE, R., WHITE, N. D. G., JAYAS, D. S., & MARQUARDT, R. R. Mycotoxin formation in hulless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. *Journal of Stored Products Research*, 35(3):297-305, 1999.

ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R. M., KOZAKIEWICZ, Z., LIMA, N., & VENANCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4): 240–242, 2001.

ALMEIDA A.; ALABURDA J.; RUVIERI V.; SABINO M. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 65(3): 171-175, 2006.

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

ARROZ BRASILEIRO. Disponível em <http://www.arroz.agr.br>, acessada, novembro 2007.

Arroz Irrigado - Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil – V Congresso Brasileira de Arroz Irrigado XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado – 7 a 10/08/07 p27.

Arroz Irrigado - Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil – IV Congresso Brasileira de Arroz Irrigado XXVI Reunião da Cultura do Arroz Irrigado – 9 a 12/08/05 p159.

Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP); *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos* (apostila), 1999.

AZZIZ, N. H., & MOUSSA, L. A. A. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control*, 13(4-5):281–288, 2002.

BADIALE-FURLONG, E. Manejo operacional para micotoxinas em arroz. In: ELIAS, M. C.; LORINI, I. *Qualidade de arroz na pós-colheita*. Anais do II Simpósio Sul – Brasileiro de qualidade de arroz. Pelotas: Abrapós/UFPel, 2005, p 660.

BADIALE-FURLONG, E.; SOARES, L. M. V.; J. AOAC Int., 78, 386, 1995.

BAILLY, J. D., QUERIN, A., LE BARS-BAILLY, S., BENARD, G., & GUERRE, P. Citrinin production and stability in cheese. *Journal of Food Protection*, 65(8):1317-1321, 2002.

BARISIC, K; PETRIK, J.; RUMORA, L.; CEPELAK, I.; GRUBISIC, T.Z., Expression of Hsp 70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. *Archives of toxicology* 76(4): 218-226, 2002.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Micotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3):497-516, 2003.

BERNDT, W. O., Ochratoxin-citrinin as nephrotoxins. *Biodeterioration Research*. 3:55-56, 1990.

BLANC P. J., LORET M. O., GOMA G. "Production of citrinin by various species of *Monascus*"; *Biotechnology Letters*. 17 (3), 291-294, 1995.

BLANC, P. J., LAUSSAC, J. P., LE, J. B., LE, B. P., LORET, M. O., PAREILLEUX, A., PROMÉ, D., PROMÉ, J. C., SANTERRE, A. L., & GOMA, G. Characterisation of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *International Journal of Food Microbiology*, 27:201–213, 1995b.

BRASIL. Portaria no. 269 de 17 de novembro de 1988. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova a norma de identidade, qualidade, embalagem e apresentação do arroz. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis>. Acesso em: fevereiro 2008.

BRASIL. Resolução Mercosul no. 5, de 25 de abril de 1997. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova o regulamento técnico MERCOSUL de identidade e de qualidade de arroz beneficiado. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis>. Acesso em: fevereiro 2008.

CACCIAMANI J. M., PERES G. L., GARDA-BUFFON J., BADIALE-FURLONG E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais. *B. CEPPA*, 25(1):157-164, 2007.

CALDAS E. D., SILVA S. C., OLIVEIRA J. N., Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health, *Revista Saúde Pública*, 36(3): 319-323, 2002.

CASTEGNARO M., CANADAS D., VRABCHEVA T., PETKOVA-BOCHAROVA T., CHERNOZEMSKY I. N., PFOHL-LESZKOWICZ A.; Balkan edemic nephropathy: role of ochratoxin A through biomarkers. *Molecular Nutrition Food Research*. 50: 519-529, 2006.

CAULCUTT R.; BODDY R.; *Statistic for analytical Chemists*, Chapman and Hall: London, 1983.

CERAIN, A.L.; JIMÉNEZ, A.M.; EZPELETA, O.; BELLO, J. Efectos tóxicos de La ocratoxina A. *Reviews in Toxicology* 17:61-69, 2000.

CHAGAS, G. M., CAMPELLO, A. P., & KLUPPEL, M. L. W., Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. *Journal of Applied Toxicology*. 12:123-129, 1992a.

CHAGAS, G. M., OLIVEIRA, M. B. M., CAMPELLO, A. P., & KLUPPEL, M. L.W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of liver mitochondria. *Cell Biochemistry Function*. 10:209-216, 1992b.

CHAGAS, G. M., OLIVEIRA, M. B. M., CAMPELLO, A. P., & KLUPPEL, M. L.W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondria swelling. *Journal of Applied Toxicology*, 15:91-95, 1995.

COMERIO, R., FERNANDEZ PINTO, V. E., & VAAMONDE, G. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 42:219-223, 1998.

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

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento, disponível em <http://www.conab.gov.br>, acessada, janeiro 2009.

COSTA, T.P., GERMANO, P.M.L., GERMANO, M.I.S. Segurança alimentar e a cerveja: o perigo das micotoxinas. *Higiene Alimentar*. 19(137):39-46, 2006.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*. 127(1-3): 19-28, 2002.

DAWLATANA M., COKER R.D., NAGLER M.J., BLUNDEN G., *Chromatographia* 42(25), 1996.

DEGELMANN P, BECKER M, HERDERICH M, HUMPF HU. Determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 49:543–546. 1999.

DESHPANDE S. S., *Handbook of Food Toxicology*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, p. 424, 2002.

DILKIN, P., *Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos*. *Biológico*. 64(2):187-191, 2002.

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*. 42:433-437, 2009.

EHRlich K., LEE L., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (1984) 963.

ELMHOLT S., RASMUSSEN P. H.; *Mycopathologia*, 150: 421-432, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em <http://www.cnpaf.embrapa.br>, acessada, setembro 2007.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <http://www.embrapa.br>, acessada, novembro 2008.

FAO. Organização para Agricultura e Alimentação., *Food and Nutrition Paper*, Nº 64, Roma, 2007.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in food and feeds. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E. B.; ARORA, D. K. *Handbook of Applied Mycology: Foods and feeds*. New York: Marcel Dekker, INC, 3(2):31-67, 1992.

FROHLICH, A.A.; MARQUARDT, R.R.; OMINSKI, K.H., Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: A Canadian perspective. *International agency for research on cancer* 115: 139-143, 1991.

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

GARDA J., BADIALE-FURLONG E. Descontaminação de micotoxinas: uma estratégia promissora. Revista Vetor, 13(2):7-15, 2003.

GARP – Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos, 1999.

GIMENO, A., & MARTINS, M. L. Rapid thin layer chromatographic determination of patulin, citrinin, and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 66(1): 85–91, 1983.

GOLDBERG D. M., SOLEAS G. S., YAN J., Assay of Ochratoxin A in Wine and Beer by High-Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array and Gas Chromatography Mass Selective Detection. Journal Agriculture Food Chemystre. 49:2733-2740, 2001.

HANS G. J. MOL, PATRICIA PLAZA-BOLAN~ OS, PAUL ZOMER, THEO C. DE RIJK, ALIDA A. M. STOLKER, AND PATRICK P. J. MULDER, Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes, Anal. Chem, 80(24):9450-9459, 2008.

HEBER, D., LEMBERTAS, A., LU, Q. Y., BOWERMAN, S., & GO, V. L. W. An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: implications of variability in chemical profile and contents. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 7(2):133-139, 2001.

HERNÁNDEZ-HIERRO, J.M.; GARCÍA-VILLANOVA, R.J.; GONZÁLEZ-MARTÍN, I. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. Anal. Chim. Acta 2008, 622, 189–194.

HIROTA, M., MENTA, A. B., YONEYAMA, K., & KITABATAKE, N. A major decomposition product, citrinin H2, from citrinin on heating with Moisture. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 66(1):206-210, 2002.

HO, J.A.; DURST, R.A. Detection of fumonisin B1: Comparison of flow-injection liposome immunoanalysis with high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 2003, 6, 7–13.

HUNT, J.R.; JOHNSON, L.K.; JULIANO, B.O. Bioavailability of zinc from cooked Philippine milled, undermilled, and brown rice, as assessed in rats by using growth, bone zinc, and zinc-65 retention. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(18): 5229-5235, 2002.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabelas de composição de alimentos. 5 ed. Rio de Janeiro, 1999. 137 p. (Estudo Nacional da Despesa Familiar).

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, disponível em <http://www.ibge.br>, acessado em novembro, 2007.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008,2003.

IRGA. Instituto Rio Grandense do Arroz, disponível em <http://www.irga.com.br>, acessado em novembro, 2007.

JANARDHANA, G. R., RAVEESHA, K. A., & SHETTY, H. S. Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). *Food and Chemical Toxicology*, 37(8):863-868, 1999.

JUAN C., MOLTÓ J. C., LINO C. M., MAÑES J.; Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food Chemistry*, 107: 525-530, 2008.

JULIANO, B. O.; HICKS, P.A., Rice functional properties and Rice food products. *Food Rev. Int.*, 12(1):71-103, 1996.

KADAN, R.S.; BRYANT R. J.; BOYKIN, D. L., Rice fry texture as affect by gum application and mechanical perforation. *Journal of Food Science*, 66(8):1084-1088, 2001.

KITABATAKE, N., TRIVEDI, A. B., & DOI, E. Thermal decomposition and detoxification of citrinin under various moisture conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(12):2240–2244, 1991.

KNASMULLER S.; CAVIN C.; CHAKRABORTY A.; DARROUDI F.; MAJER B.; HUBER W.; EHRLICH V.; “Structurally Related Mycotoxins Ochratoxin A, Ochratoxin B, and Citrinin Differ in Their Genotoxic Activities and in Their Mode of Action in Human-Derived Liver (Hep G2) Cells: Implications for Risk Assessment”; *Nutrition and Cancer*, 50(2): 190-197, 2004.

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

LAWLOR, P.G.; LYNCH, P.B., Micotoxins in pig feeds 2: clinical aspects. *Irish Veterinary Journal*. 54(4):172-176, 2001.

LEHOTAY S. J., KOK A., HIEMSTRA M., BODEGRAVEN P.; *J. AOAC Int.* 88(2): 595, 2005.

MACDONALD S.; WILSON P.; BARNES K.; DAMANT A.; MASSEY R.; MORTBY E.; SHEPHERD M.; *Food Additives and Contaminants*, 16 (6): 253-260, 1999.

MARTINS, M. L., GIMENO, H. M., MARTINS, H. M., & BERNARDO, F., Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 568–574, 2002.

MEISTER U.; “New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up”; *Eur Food Res Technol*, 218: 394-399, 2004.

MENDEZ, M.H.M.; DERIVI, S.C.N.; RODRIGUES, M.C.R.; FERNANDES, M.L. *Tabela de composição de alimentos*. EDUFF, 1995.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I., *Toxicologia de alimentos*. São Paulo: Varela editora e livraria LTDA, p.295, 2000.

MILANEZ, V.T.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; OKINO, L.K. Evaluation of Brazilian terrestrial *Aspergillus* strains for mycotoxin production. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 61(1): 7-11, 2002.

MOLINÉ A.; FAUCET V.; CASTEGNARO M.; LESZKOWIEZ A. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinina and fumonisin B₁: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry* 92: 391-400, 2005.

NIELSEN K. F., SMEDSGAARD J., Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology., *Journal of Chromatography*, 1002:111-136., 2003.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Tabela brasileira de composição de alimentos. NEPA-UNICAMP, 2006. 113 p

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

ODHAV, B., & NAICKER, V., Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. Food Additives and Contaminants, 19(1): 55–61, 2002.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Informe de una Reunión Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU. Necesidades de energía y de proteínas. Ginebra, 1985. (OMS Série de Informes Técnicos, 724).

OSWEILLER, G. D., Micotoxinas. In: OSWEILLER, G. D., Toxicologia Veterinária. São Paulo: Ed. Artes Médicas, 29:440-468, 1998.

PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. Food Microbiology 21(3): 267-274, 2004.

PALLARONI L.; HOLST C. V.; ESKILSSON C. S.; BJÖRKLUND E.; “Microwave-assisted extraction of zearalenone from wheat and corn”; Anal Bioanalítica Chemistry, 374: 161-166, 2002.

PALMA M.; LIAZID A.; BRIGUI J.; BARROSO C. G.; “Investigation on Ochratoxin A stability using different extraction techniques”; Talanta, 71: 976-980, 2007.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. Research in Microbiology. 155(7):507-513, 2004.

PEPELJNJAK, S., SEGVIC, M., & OZEGOVIC, L., Citrinotoxinogenicity of *penicillium* spp. isolated from decaying apples. Brazilian Journal of Microbiology, 33, 134–137, 2002.

PFOHL-LESZKOWICZ A., MOLINIE´, A., FAUCET, V., CASTEGNARO, M.; Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. Food Chemistry, 92: 391–400, 2005

PHILIPPI, S.T. Tabela de composição de alimentos. Suporte para decisão nutricional. 2. ed. São Paulo, Coronário, 2002.

PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Science*. 70(12):3964-3967, 1992.

PIER, A. C.; RICHARD, J. L.; CYSEWSKI, S. J., Implications of mycotoxins in animal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 176(8):719-724, 1980.

PITT, J. I., Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*. 56(1):184-192, 2000.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Revue de Médecine Veterinaire*. 149:479-492, 1998.

POUPKO, R., LUZ, Z., & DESTRO, R. Carbon-13 NMR of citirmin in the solid state and in solutions. *Journal of Physical Chemistry A*, 101, 5097–5102, 1997.

PUSSEMIER, L.; PIERARD, J.Y.; ANSELME, M.; TANGNI, E.K.; MOTTE, J.C.; LARONDELLE, Y. Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. *Food Addit. Contam.* 2006, 23, 1208–1218.

PSZCZOLA D. E. Rice: not Just for throwing. *Food Technology*. 55(2):53-59, 2001.

RASHEVA, T. V., NEDEVA, T. S., HALLET, J. N., & KUJUMDZIEVA, A. V., Characterization of a non-pigment producing *Monascus purpureus* mutant strain. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 333–340., 2003.

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* 27(5):771-780, 2004.

RIBEIRO, J.M.M. et. al. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. *Letters in Applied Microbiology*. 42(1): 179-184, 2006.

RICHARD, J. J. Some major mycotoxins and their mycotoxicoese-An overview. *International Journal of Food Microbiology*. 119:3-10, 2007

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.; Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos, 1a ed., SP: Casa do Pão Editora: Campinas 2005.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *J. Chromatogr. A* 2007, 1152, 97–115.

ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de nefropatia micotóxica suína causada pela ingestão de cevada contaminada com citrinina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 7:87-91, 1985.

RUHLAND M., ENGELHARDT G., WALLNÖFER P. R. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspended cultures of different crop plants. *Mycopathologia*, 134: 97-102, 1996.

SAS INSTITUTE. SAS. Cary, 2003.

SCHNEWEIS, I., MEYER, K., HOORMANSDORFER, S., & BAUER, J. Metabolites of *Monascus ruber* in silages. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85:1-2, 38-44, 2001.

SGARBIERI, V.C. Fontes de proteínas na alimentação. In: SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos. São Paulo: Varela, p.139-257, 1996.

SHEPHARD, G.S.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; GATYENI, P.M.; KATERERE, D.R.; MARASAS, W.F.O. Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 9293–9296.

SHU, P. Y., & LIN, C. H. Simple and sensitive determination of citrinin in monascus by GC-selected ion monitoring mass spectrometry. *Analytical Sciences*, 18(3):283-287, 2002.

SLOAN, A. E. Wholly grain!. *Food Technology*. 59(6):16, 2005.

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. *J Assoc Off Anal Chem*,72:22-6, 1989.

SORIANO J. M.; BLESA J.; BERRADA H.; MOLTÓ J. C.; MAÑES J.; “Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1046: 127-131, 2004.

SYLOS, C. M.; SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; “Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice”; *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 62(2): 123-130, 2003.

SZCZECH, G. M.; CARLTON, W. W.; TUIITE, J.; CALDWELL, R., Ochratoxin A toxicosis in swine. *Veterinary Pathology*, 10(4):347-364, 1973.

TABATA S.; IIDA K.; KIMURA K.; IWASAKI Y.; NAKAZATO M.; KAMATA K.; HIROKADO M., Simultaneous Determination of Ochratoxin A, B and Citrinin in Foods by HPLC-FL and LC/MS/MS. *Tokyo Metropolitan Institute*, 49(2): 100-105, 2007.

TAIRA, H. Grain quality: physicochemical properties and quality of rice grains. In: MATSUO, T.; KUMAZAWA, K.; ISHII, R.; ISHIHARA, K.; HIRATA, H. (Ed.). *Science of the rice plant*. Tokyo: Food and Agriculture Police Research Center, V2 (Physiology). cap. 6.1, p.1063-1089, 1995.

TANAKA K., YUKI S., ZHENG Y., NAKAGAWA H., KUSHIRO M.; Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 59-66, 2007.

TANIWAKI M.; MARTINS C.; IAMANAKA B.; LEITE R.; VICENTE E.; OKAZAKI M.; “Aspergillus niger e Aspergillus carbonarius produtores de ocratoxina A em alimentos: ocorrência, significado e fatores que afetam a sua presença”; *Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos*, 4 (1), 2004.

TEDRUS, G. A. S.; ORMENESE, R.C.S.; SPERANZA, S. M.; CHANG, Y. K.; BUSTOS, F. M., Estudo da adição de vital glútem a farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade dos pães. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(1), 2001.

THOMPSON, M.; ELLION, S. R.; WOOD, R. *Pure and Applied Chemistry*. 74:835-855, 2002.

TRENK, H. L.; BUTZ, M. E.; CHU, F. S., Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. *Applied microbiology*. 21(6):1032-1035, 1971.

TRIVEDI, A. B., HIROTA, M., DOI, E., & KITABATAKE, N. Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transaction*. 2167-2171, 1993.

URRACA, J.L.; BENITO-PEÑA, E.; PÉREZ-CONDE, C.; MORENO-BONDI, M.C.; PESTKA, J.J. Analysis of zearalenone in cereal and swine feed samples using an automated flow-through immunosensor. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3338–3344.

USP. Universidade de São Paulo. Tabela brasileira de composição de alimentos. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br>, acessada, junho 2008.

VAZQUEZ, B. I., FENTE, C., FRANCO, C., CEPEDA, A., PROGNON, P., & MAHUZIER, G. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminescence using terbium. *Journal of Chromatography A*, 727:185-193, 1996.

VARGA J., RIGÓ K., TÉREN J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int J Food Microbiol*, 59:1-7, 2000.

VARGA J., PÉTERI Z., TÁBORI K., TÉREN J., VÁLGVÖLGYVI C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxin by *Rhizopus* isolates. *Int J. Food Microbiol.*, 99: 321-328, 2005.

VÁZQUEZ, B. I., FENTE, C., FRANCO, C. M., QUINTO, E., CEPEDA, A., & PROGNON, P., Rapid semi-quantitative fluorimetric determination of citrinin in fungal cultures isolated from cheese and cheese factories. *Letters in Applied Microbiology*, 24(5): 397–400, 1997.

VRABCHEVA, T., USLEBER, E., DIETRICH, R., & MARTLBAUER, E. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:2483-2488, 2000.

WATT, B.K.; MERRILL, A. L. *Composition of foods: raw, processed, prepared.* Agriculture Handbook, 8. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture, 1975.

WHITNEY, E.N.; ROLFES, S.R. Table of food composition. In: WHITNEY, E.N.; ROLFES, S.R. *Understanding nutrition.* Belmont: ITP, cap. H (appendix), p. H-1–H-89, 1999.

WHO – WORD HEALTH ORGANIZATION. Executive board EB110/6. Report on meetings of expert committees and study groups. 19/04/2002. 110th session. Report by the Secretariat.

WILKES, J.G.; SUTHERLAND, J.B. Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. *J. Chromatogr. B* 1998, 717, 135–156.

WOOD, G. E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *Journal of Animal Science*. 70(12):3941-3949, 1992.

YOSHISAWA T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil, Training Course, Japão, p 253, 2001.

ZOELLNER P, LEITNER A, LUBDA D, CABRERA K, LINDNER W. Application of a Chromolith SpeedROD RP-18e HPLC column: Determination of ochratoxin A in different wine samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 52:818–820. 2000.

ZOUGAGH, M.; RÍOS, A. Supercritical fluid extraction of macrocyclic lactone mycotoxins in maize flour samples for rapid amperometric screening and alternative liquid chromatographic method for confirmation. *J. Chromatogr. A* 2008, 1177, 50–57.

ZHAI, CK.; LU, C.M.; ZHANG, X.Q.; SUN, G.J.; LORENZ, K.J. Comparative study on nutritional value of Chinese and North America wild rice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(4):371-382, 2001.

ZHOU, Z.; BLANCHARD, C.; HELLIWELL, S.; ROBARDS, K. Fatty acid composition of three rice varieties following storage. *Journal of Cereal Science*, 37(3): 327-335, 2003.

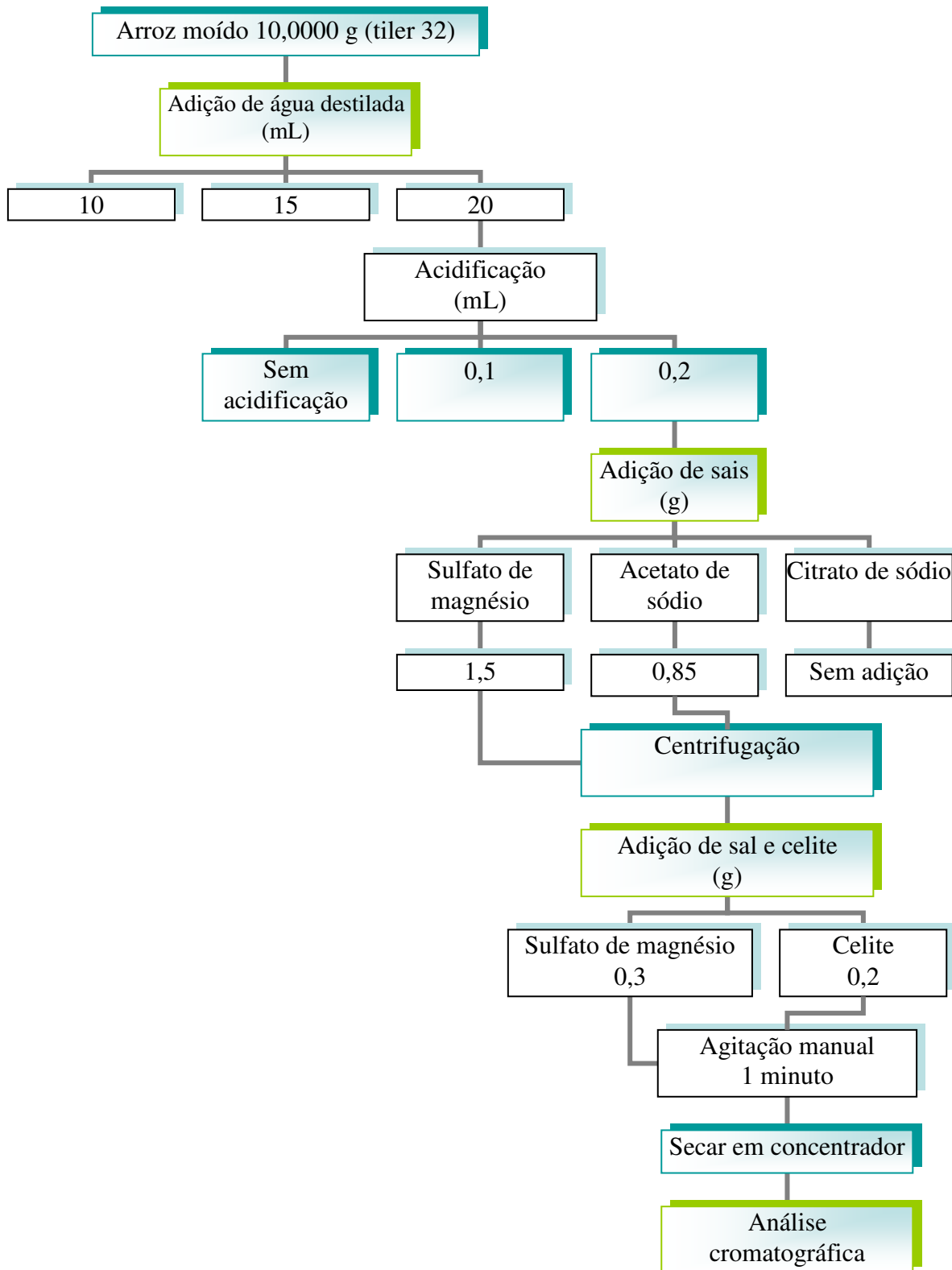
ZINEDINE A., SORIANO J. M., JUAN C., MOJEMMI B., MOLTO J. C., BOUKLOUZE A.; Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruit from Rabat and Sale arca Morocco. *Food Additives and Contaminants*, 24(3): 285-291, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Série Eluotrópica

Solvent	Polarity, $\epsilon^{\circ}(Al_2O_3)$	Viscosity (mPa s)(20 °C)	Refractive index, n_D^{20}	UV cutoff ² (nm)	Boiling point (°C)
Fluoroalkane	-0.25		1.25	210	
n-Pentane	0.00	0.23	1.3575	195	36
n-Hexane	0.00	0.33	1.3749	190	69
Isooctane	0.01	0.50	1.3914	200	99
Light petroleum	0.01	0.3		210	
n-Decane	0.04	0.92	1.4119	200	174
Cyclohexane ⁶	0.04	1.00	1.4262	200	81
Cyclopentane	0.05	0.47	1.4064	200	49
Diisobutylene	0.06		1.411	210	
Pent-1-ene	0.08	0.24 (0 °C)	1.3715	210	30
Carbon disulphide	0.15	0.37	1.6280	380	46
Carbon tetrachloride	0.18	0.97	1.4652	265	77
Amyl chloride	0.26	0.43	1.4120	225	108
n-Butyl chloride	0.26	0.47	1.4021	220	78
Xylene	0.26	0.62-0.81	≈ 1.50	290	138-144
Diisopropyl ether	0.28	0.37	1.3681	220	68
2-Chloropropane	0.29	0.33	1.3777	255	36
Toluene	0.29	0.59	1.4969	285	111
n-Propyl chloride	0.30	0.35	1.3879	225	47
Chlorobenzene	0.30	0.80	1.5248	290	132
Benzene	0.32	0.65	1.5011	280	80
Ethyl bromide	0.37	0.39	1.4239		38
Diethyl ether	0.38	0.24	1.3524	205	34.5
Ethyl sulphide	0.38	0.45	1.4429	290	92
Dichloromethane	0.39	0.44	1.4242	230	40
Chloroform	0.40	0.57	1.4457	245	61
Isobutylmethyl ketone	0.43	0.54	1.3957	330	116.5
1,2-Dichloroethane	0.49	0.79	1.4448	230	83
Ethylmethyl ketone	0.51	0.4	1.3788	330	80
1-Nitropropane	0.53	0.77	1.4016	380	131
Acetone	0.56	0.32	1.3587	330	56
Dioxane	0.56	1.54	1.4224	220	101
Methyl acetate	0.60	0.37	1.3614	260	56
Amyl alcohol	0.61	4.1	1.4100	210	138
Tetrahydrofuran	0.62	0.46	1.4072	220	66
<i>tert</i> -Butylmethyl ether	0.62	0.35	1.3689	220	53
Ethyl acetate	0.62	0.45	1.3724	260	77
Dimethyl sulphoxide	0.62	2.24	1.4783	270	189
Aniline	0.62	4.4	1.5863		184
Diethylamine	0.63	0.38	1.3854	275	55
Nitromethane	0.64	0.67	1.3819	380	101
Acetonitrile	0.65	0.37	1.3441	190	82
Pyridine	0.71	0.94	1.5102	305	115
Butylcellosolve	0.74	3.1	1.4198	220	170
Iso- + n-propanol	0.78	2.3	1.3772, 1.3856	210	82, 97
Ethanol	0.88	1.20	1.3614	210	78
Methanol	0.95	0.60	1.3284	205	65
Ethylene glycol	1.11	19.9	1.4318	210	197
Acetic acid	High	1.26	1.3719		118
Water	Higher	1.00	1.3330	< 190	100
Salt solutions and buffers	Highest				

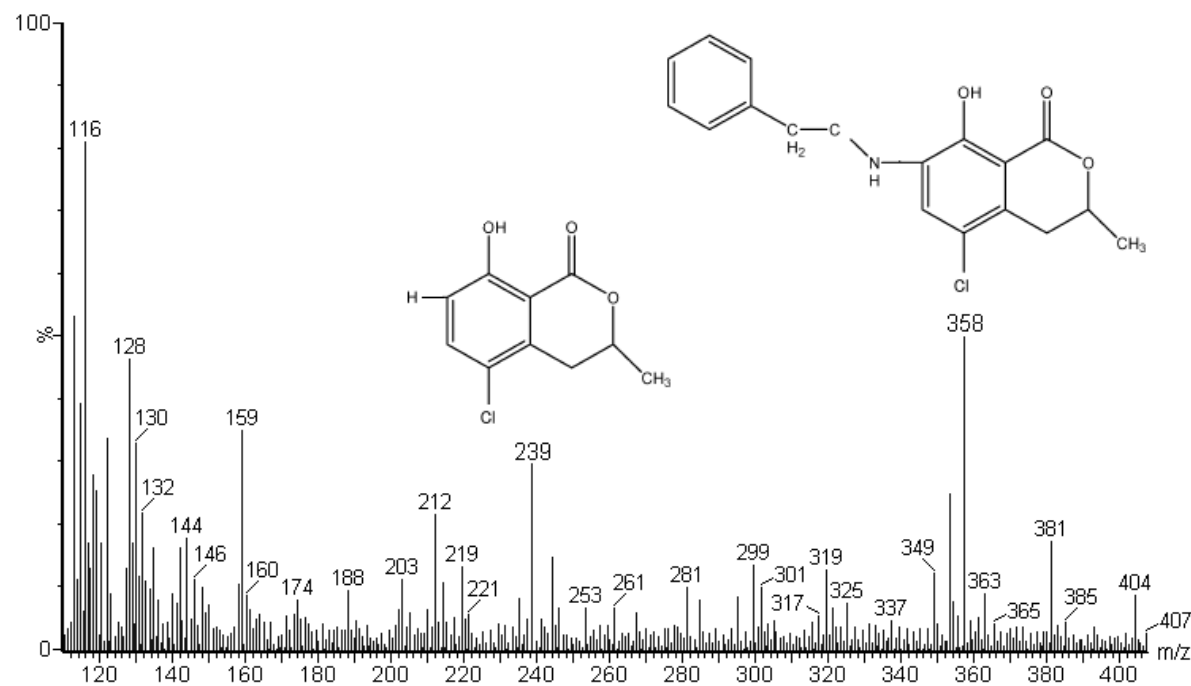
ANEXO B – Fluxograma da adaptação do método de extração



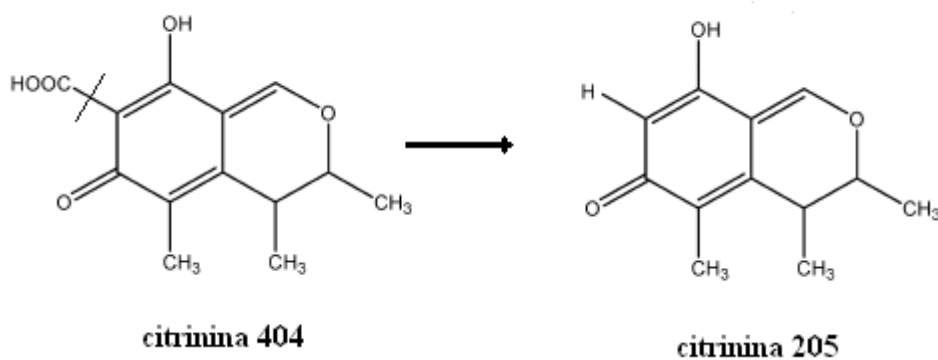
ANEXO C – Fragmentação da ocratoxina A e citrinina em LC-MS

Fragmentações da ocratoxina A

OCHATOXIN A SCAN 239 139 (1.400) Cm (92:152)



Fragmentação da citrinina



ANEXO D – Resumos e trabalhos apresentados

Padronização de metodologia para determinação de Ocratoxina A e Citrinina em frutas secas e derivados da região Sul do Brasil. – MPU- 2007.

Aplicação de HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS na determinação de micotoxinas em arroz – COLCACRO – 2008.

Determinação de ocratoxina A em arroz empregando LC-ESI-MS/MS – SBQ – 2008.

Comparação de métodos de extração de micotoxinas em arroz – SBQ – 2008.

Comparação de métodos para extração de micotoxinas em arroz – MPU – 2008.

Efeito da granulometria na extração da ocratoxina A e citrinina em arroz – SIAL – 2009.

Determinação de micotoxinas em aveia e trigo por HPLC-DAD – SIAL – 2009.