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

PERFIL DE SOLUTOS E MICOTOXINAS NAS ÁGUAS DO CULTIVO E BENEFICIAMENTO DO ARROZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Clarice Caldeira Leite

Rio Grande/RS-Brasil
2010

PERFIL DE SOLUTOS E MICOTOXINAS NAS ÁGUAS DO CULTIVO E BENEFICIAMENTO DO ARROZ

por

Clarice Caldeira Leite

Dissertação apresentada ao programa de Pós–Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Metodologia e Caracterização Físico-Química de Compostos Orgânicos, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dra. Eliana Badiale-Furlong

Co-Orientador: Prof. Dra. Jaqueline Garda-Buffon

Rio Grande, RS, Brasil

2010

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

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

PERFIL DE SOLUTOS E MICOTOXINAS NAS ÁGUAS DO CULTIVO E BENEFICIAMENTO DO ARROZ

Elaborado por

Clarice Caldeira Leite

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

Comissão Examinadora

_____

Profª. Drª. Eliana Badiale-Furlong
(Presidente-Orientador)

_____

Profª. Drª. Jaqueline Garda-Buffon(FURG)
(Co-Orientador)

_____

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG)

_____

Prof. Drª. Janaina Medeiros Fernandes Burkert (FURG)

Rio Grande, 25 de junho de 2010.

A minha Vó Olga in memoriam
A minha mãe Vera Lucia, por me mostrar
que os sonhos podem ser reais,
por ter sido meu apoio,
por acreditar em mim. Eu te amo!
A minha irmã Claudia, pelo incentivo,
paciência por ter sido a minha força.
Ao meu amado Irmão e afilhado José Antônio
pela compreensão nos momentos difíceis,
pelo carinho e pela torcida A Dinda te ama!!

Agradecimentos

A minha orientadora **professora Drª Eliana Badiale-Furlong**, pela orientação, pelo apoio, incentivo em todos os momentos no decorrer deste trabalho. Obrigada.

A minha co-orientadora **professora Drª Jaqueline Garda-Buffon**, pela sua contribuição e valiosas sugestões no decorrer desta caminhada. Obrigada.

Ao **professor Dr. Ednei Gilberto Primel**, pela participação no exame de qualificação, e pelos ensinamentos enquanto professor.

Ao **professor Dr. Marcio Raimundo Milani** pela participação no exame de qualificação e pelo conhecimento transmitido no decorrer de suas aulas.

A **professora Drª Janaina Medeiros Fernandes Burket** pela partição na defesa da dissertação, e pela suas importantes sugestões para o final deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Ciência de Alimentos LCA- FURG.

As colegas **Michele Souza e Vivian Feddern**, pela ajuda e disponibilidade de compartilhar seus conhecimentos.

A **Caroline da Silva Godois** pela ajuda, companheirismos e amizade ao longo desta trajetória.

A Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e aos professores do Programa de **Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental** pelos ensinamentos durante o Curso de Mestrado.

Ao **Irga** por ceder às amostras.

A **CNPq** pela bolsa.

A Deus por ter me concedido mais essa vitória.

RESUMO

Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Escola de Química e Alimentos – EQA

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental – PPGQTA

Perfil de solutos e micotoxinas nas águas do cultivo e beneficiamento do arroz

Autor: Clarice Caldeira Leite

Orientador: Prof. Dra Eliana Badiale-Furlong

Co-orientador: Prof. Dra Jaqueline Garda-Buffon

Rio Grande, junho de 2010.

O cultivo do arroz no RS é fortemente relacionado com recursos hídricos, pois este se faz sob irrigação e durante o beneficiamento, especialmente no caso da parboilização, são necessários volumes consideráveis de água. Em vista disso, os solutos presentes nestas águas permitem estimar o impacto desta cultura e sua industrialização na qualidade do ambiente hídrico no RS. Foi desenvolvida uma rotina analítica para caracterização físico-química das águas da cadeia produtiva do arroz, onde foram analisados nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, açucares redutores, açucares redutores totais, sólidos totais, sólidos fixos, sólidos voláteis, ácidos voláteis, alcalinidade, pH, nitrato, nitrito e fósforo. Também um método multimicotoxinas foi desenvolvido avaliando a eficiência de cinco sistemas de extração-partição para aflatoxina B_1 (AFA B_1), aflatoxina B_2 (AFA B_2), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON). A partição liquido-liquido com clorofórmio foi a mais eficiente recuperando 89; 96; 89; 97 e 72%, respectivamente de cada micotoxina. A comparação entre volumes de solventes, onde o número de etapas envolvidas e o tempo necessário para efetuar a determinação confirmaram a simplicidade, a economia e a rapidez deste sistema de partição a ser adotado para extrair micotoxinas de água da cadeia produtiva de arroz. O método foi aplicado para determinação de micotoxinas em amostras de águas de irrigação e parboilização de arroz de diferentes procedências verificando-se que as últimas aparecem contaminadas com micotoxinas, AFA B_1 9,0 ng mL^{-1} e DON 110 ng mL^{-1}. Foi realizado também um estudo de migração de micotoxinas AFA B_1, OTA, ZEA e DON e outros solutos sob condições de encharcamento (4 e 6 h) em dois níveis de fortificação, durante a parboilização do grão ficando demonstrado que durante o processo ocorria a lixiviação de solutos e micotoxinas para água de encharcamento do arroz.

Palavras-chave: micotoxinas; água de irrigação e parboilização; migração de solutos

ABSTRACT

Federal University of Rio Grande - FURG

School of Chemical and Food - EQA

Graduate Program in Environmental Chemistry and Technology - PPGQTA

Profile of solutes and mycotoxins in the waters of the cultivation and processing of rice

Author: Clarice Caldeira Leite

Advisor: Prof. Dra. Eliana Badiale-Furlong

Co-Advisor: Prof. Dra Jacqueline Garda-Buffon

Rio Grande, June 2010.

The cultivation of rice in RS is strongly related to water resources, as this is done under irrigation and during processing, especially in the case of the parboiling are required great volumes of water. In this wary level of theses solutes in indicate the evaluation of the impact of this culture and its industrialization in the quality of water environment in RS. It was developed analytical routine for characterization the water in the rice production chain. It worle were analyzed total nitrogen, ammonia nitrogen, organic nitrogen, reducing sugars, total reducing sugars, total solids, fixed solids, volatile solids, volatile acids, alkalinity, pH, nitrate, nitrite and phosphorus. Also a method was developed to evaluate the efficiency of extraction systems to mycotoxins it were tested five systems to obtain partition aflatoxin B_1 (B_1 AFA), aflatoxin B_2 (AFA B_2), ochratoxin A (OTA), zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON). The liquid-liquid partition with chloroform was the most efficient recovering 89, 96, 89, 97 and 72% respectively of each mycotoxin. The comparison among the volume of the solvents, the steps and time required to make the determination confirmed the simplicity, economy and speed of this system partition to be adopted for extracting mycotoxins water for rice production chain. The method was applied to determination of the mycotoxins fron samples of irrigation and parboiled rice water and to verify the occurrence of contaminated samples with mycotoxins, AFA B_1 9.0 ng mL^{-1} and DON 110 ng mL^{-1}. It was also carried out a study of mycotoxins and other solutes migration under conditions of waterlogging (4 e 6 h) during the parboiling process, being demonstrated that occurred leaching of the others and mycotoxins solutes and mycotoxins to the wate

Keywords: mycotoxins; irrigation water and parboiled; migration of solutes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química das principais Aflatoxinas 14

Figura 2- Estrutura química da Ocratoxina A (OTA).....16

Figura 3- Estrutura química da Zearalenona (ZEA).....17

Figura 4- Estrutura química do Deoxinivalenol (DON).....18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Arroz beneficiado - Produção, consumo e estoque final - Total mundial Safras 1984/85 - 2008/09 (milhões de t).....05
Tabela 2- Arroz - Quantidade produzida nos países do MERCOSUL.....06
Tabela 3 - Limites mínimos de umidade para crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas.....12
Tabela 4- Propriedades físico-químicas e algumas características das micotoxinas.....19
Tabela 5- Relação das amostras analisadas e seus respectivos códigos.....26
Tabela 6- Peso molecular, absortividade molar e comprimento de onda máximo de absorção das micotoxina.....27
Tabela 7- Concentrações abrangidas pelas curvas analíticas em CCD e CCDAE.....28
Tabela 8- Níveis de fortificação da amostra empregados para padronização da extração..... 29
Tabela 9 - Massa das micotoxinas adicionados nas amostras.....31
Tabela 10- Indicativos de eficiência do método de determinação de nitrato e nitrito.....33
Tabela 11- Indicativos de eficiência do método de determinação de Fósforo como Fosfato..34
Tabela 12- Características físico-químicas da água de parboilização de arroz, safra 2008 e 2009.....36
Tabela 13-Características físico-químicas da água de irrigação de arroz, safra 2008.....38
Tabela 14-Características físico-químicas da água de irrigação de arroz, tratadas e não tratadas com fungicidas da safra de 2009 do período de dezembro.....39
Tabela 15- Características físico-químicas da água de irrigação de arroz, tratadas e não tratadas com fungicidas da safra de 2009 do período de janeiro de 2009.....40

Tabela 16- Características físico-químicas da água de irrigação de arroz, tratadas e não tratadas com fungicidas da safra de 2009 do período de março.....41
Tabela 17- Estudo da migração de solutos para água de encharcamento do arroz.....43
Tabela 18- Características das técnicas cromatográficas 44
Tabela 19- Recuperação percentual de micotoxinas nos sistemas de partição e seus coeficientes de variação.....46
Tabela 20- Características da técnica de partição líquido-líquido com clorofórmio em água de parboilização.....47
Tabela 21- Migração de micotoxinas em dois níveis de fortificação e em dois tempos diferentes de encharcamento.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AFA B_1 – Aflatoxina B_1

AFA B_2 – Aflatoxina B_2

AFAs - Aflatoxinas

APPCC - Análise de perigos e pontos críticos de controle

ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

Bw - body weight

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CCDAE – Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

CONAMA- Conselho Nacional do meio ambiente

DNS- 3,5 dinitrosalicilico

DON- Deoxinivalenol

EC- Comunidade Européia

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – Organização para Agricultura e Alimentação, do inglês, *Food and Agriculture Organization*

HPTLC – do inglês, *high performance thin layer chromatography*

IRGA – Instituto Sul Rio-grandense do Arroz.

JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives

LC – Cromatografia líquida

LC-MS - Cromatografia líquida espectrometria de massas

LC-MS/MS - Cromatografia líquida-espectrometria de massas seqüencial

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

Ls^{-1}- Litros por segundo

NO^{-}_{3} - Nitrato

NO^{-}_{2} - Nitrito

MERCOSUL- Mercado comum do Sul

OD- Oxigênio dissolvido

OTA – Ocratoxina A

PTWI- Provisional Tolerable Weekly Intake

PO_4^{-3} - Fosfato

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

RS – Rio Grande do Sul

TCT- Tricotecenos

USDA- United States Department of Agriculture

WHO - World Health Organization

ZEA- zearalenona

LISTA DE APÊNDICES

APEDICE A-. Os principais parâmetros da qualidade estabelecidos conforme RESOLUÇÃO CONAMA N° 357.....66
APEDICE B- Caracterização físico-química do efluente.....68
APEDICE C- Fluxograma do Método Tanaka.....79
APÊNDICE D - Concentrações empregadas pelas curvas padrão de nitrato, nitrito, fósforo como fosfato e suas absorvâncias médias e Representação da recuperação do método empregado para determinação de nitrato e nitrito e fósforo como fosfato.....80
APÊNDICE E – Concentrações empregadas paras curvas padrão de glicose e suas respectivas absorvâncias.....83
APEDICE F- Esquema do método empregado para extração de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz.....84

ANEXOS

ANEXO 1. PRODUÇÃO CIENTIFICA REFERENTE AO TRABALHO.....91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 01
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA 02
3 OBJETIVO 04
3.1 Objetivo geral 04
3.2 Objetivos específicos 04
4 REVISÃO BIBLIOGRAFICA 05
4.1 Arroz produção e consumo 05
4.2 Arroz e o processo de parboilização 07
4.3 Efluente de parboilização de arroz 08
4.4 Parâmetros de qualidades das águas para irrigação de culturas cerealíferas 09
4.5 Importância das micotoxinas em alimentos 09
4.6 Os principais fatores físico-químicos e biológicos que influenciam no desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas 10
4.7 Micotoxinas e suas características 12
4.7.1 Aflatoxinas (AFAs) 13
4.7.2 Ocratoxina (OTA) 15
4.7.3 Zearalenona (ZEA) 16
4.7.4 Tricotecenos 17
4.7.5 Determinação de micotoxinas 18
4.7.6 Ocorrência de fungos e micotoxinas em arroz 20
5 MATERIAIS E MÉTODOS 22
5.1 Reagentes, Solventes e Soluções 22
5.2 Equipamentos 24
5.3 Amostras 24

5 3.1 Preparo e armazenamento das amostras 25
5.4 Caracterização físico-química do efluente 25
5.5 Situação Micotoxicologica 27
5.5.1.Condições cromatográficas para determinação de micotoxinas por Cromatografia de camada delgada e cromatografia de camada delgada de alta eficiência.....27
5.5.2 Procedimentos de extração partição para determinação de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz 28
5.5.3 Ocorrência de micotoxinas nas amostras de água.....30
5.6 Estudo da migração de solutos para água de encharcamento do arroz durante a parboilização..... 30
5.6.1 Amostra.....30
5.6.2 Contaminação das amostras de arroz.....31
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....32
6.1 Caracterização físico-química 32
6.1.1 A eficiência da metodologia da determinação de nitrato e nitrito.....32
6.1.2 A eficiência da metodologia da determinação de fósforo.....34
6.1.3 A eficiência da metodologia da determinação de açucares redutores.....35
6.1.4 Características físico-químicas da água de parboilização e irrigação de arroz, safra 2008 e 2009.....35
6.1.5 Estudo da migração de solutos para água de encharcamento do arroz.....42
6.2 Caracterização Micotoxicologica 44
6.2.1 As características das técnicas cromatográficas 44
6.2.2 Extração de micotoxinas na matriz 45
6.2.3 Aplicação dos procedimentos desenvolvidos 47
6.3 Estudo da migração de micotoxinas para água de encharcamento do arroz 47
7 CONCLUSÃO..... 50
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 51
9 REFERÊNCIAS 53

1. INTRODUÇÃO

De acordo com United States Departament of Agriculture (USDA, 2010) o arroz é o segundo produto mais importante em volume produzido em todo mundo, responsável por 29% da produção mundial dos grãos. Em levantamento realizado pela Food and Agriculture Organization (FAO, 2008) mostrou que a produção de arroz na safra de 2007/08 foi de 14.741 milhões de toneladas. A participação brasileira passou a ser de 81, 8% no MERCOSUL, sendo considerado o maior produtor deste bloco.

A lavoura de arroz irrigado no RS, é responsável pela produção de cerca de 5 milhões de toneladas, sendo considerado estabilizador da safra nacional, responsável por cerca de 50% da produção brasileira, a maior entre os Estados da Federação (EMBRAPA, 2010).

Um dos principais fatores que influenciam a qualidade deste grão é a incidência de micro-organismos nas fases de sua pré e pós-colheita, destacando-se entre eles os fungos filamentosos. Estes podem causar o comprometimento do produto final, pelo fato de quando submetidos a uma provável situação de estresse, podem produzir micotoxinas, denominação dada a metabólitos secundários por eles produzidos. As micotoxinas são potencialmente perigosas, pois provocam, dependendo dos níveis ingeridos, efeitos tóxicos, carcinogênicos e teratogênicos, tanto em animais quanto em humanos que consumam alimentos contaminados.

As micotoxinas, quando presentes, encontram-se principalmente nas camadas mais externas dos grãos sendo que a etapa de irrigação e o processo de encharcamento (uma das etapas do processo de parboilização) poderiam proporcionar a migração destas para água agregadas a outros solutos comprometendo a qualidade do efluente a ser descartado.

Em vista disso, torna-se necessário a disposição de procedimentos analíticos acessíveis e confiáveis, para determinação e quantificação das micotoxinas em água, pois a partir da disponibilidade destas informações seria possível realizar o controle ambiental levando em consideração que a água de irrigação é retirada da cultura ao final de uma etapa do cultivo e o tipo de efluente proveniente especificadamente do processo, antes de seu retorno ao meio ambiente. Estas avaliações propiciariam as tomadas de providencias para minimizar o impacto do aporte de micotoxinas nos recursos hídricos naturais.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O volume de água consumido na irrigação do arroz depende da textura, declividade do solo, temperatura e umidade relativa do ar que determinam vazões continuas de 1,5 a 2,0 Ls^{-1} ha^{-1} num período médio de irrigação de 80 a 100 dias (EMBRAPA, 2010). A composição Química desta água depende de sua origem, que pode ser lagoas ou correntes, conforme a localização geográfica. Em regiões industrializadas esta água pode estar contaminada com resíduos industriais orgânicos, inorgânicos e biológicos ao passo que em regiões agrícolas com resíduos de insumos de cultivo, e de contaminantes microbianos tanto um quanto outro podem ser absorvidos pelo vegetal e causar perda de rendimento ou danos à saúde dos consumidores da matéria prima processada.

A região sul do Rio Grande do Sul contribui com boa parte da produção de arroz do estado que é o principal produtor do país. Nela também estão concentradas as principais empresas produtoras de arroz parboilizado e onde estão à maioria dos recursos lagunares do estado, para onde são escoados os efluentes tratados e não tratados de diversas empresas. As beneficiadoras de arroz são o foco deste trabalho porque os grãos em função de sua riqueza em carboidratos e cultivo em sistema irrigado em períodos do ano em que a alternância de temperaturas é característica, consiste num fator determinante para a manifestação do potencial toxigênico da micota natural.

O estudo do efluente da parboilização vem sendo realizado por outros autores (GUTKOSKI, 1991; QUEIROZ *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al*,. 2002; QUEIZOZ *et al*,. 2007), mas o diferencial deste estudo esta na avaliação da ocorrência de micotoxinas. Quanto a este aspecto no agronegócio do arroz já foram realizados experimentos que estudaram a migração de micotoxinas para o interior do grão durante o processo de parboilização de arroz, verificando que os teores migrados foram menores que 60% em algumas condições, e que foram fortemente determinados pela estrutura de cada micotoxina. Estes resultados sugerem que parte dela pode ter ficado na casca ou na água de encharcamento do grão na primeira etapa do processo de parboilização. Ainda estão disponíveis na literatura dados sobre a contaminação de arroz produzidos no R.S e seus derivados com micotoxinas (COELHO *et al*., 2000; NUNES *et al.*, 2003; DORS *et al*., 2009) que indicam o risco de disseminação destas durante o processamento do grão.

O armazenamento do grão pode abranger período de outono, inverno, primavera e parte do verão onde as condições climáticas são as mais diversas propiciando a variação da microbiota contaminante. Esta microbiota ao ser manuseada pode migrar para outros compartimentos do ambiente e assim disseminar tanto os micro-organismos como seus metabólitos.

A etapa de encharcamento durante a parboilização é considerada a de maior risco desta migração, pois consiste em deixar o grão em contato com água em excesso a 60 ºC entre três e seis horas, o que é uma condição excelente para arrastar solutos das porções superficiais do grão que por sua vez são as mais susceptíveis a contaminação química e microbiana. Esse efluente que nem sempre é tratado antes do descarte no ambiente.

Caso entre estes solutos estejam as micotoxinas é importante salientar que a maioria delas é fortemente resistente a tratamentos físicos e químicos drásticos, o que sugere que elas podem permanecer, ainda que em quantidades residuais, em bateladas isoladas se difundir pelo ambiente hídrico e atingindo níveis capazes de produzir danos com a rotina dos descartes.

A ingestão de alimentos ou água que contenham micotoxinas pode causar efeitos nocivos a saúde humana e animal, dentre estes danos pode se destacar depressão no sistema imunológico e neurológico, distúrbios gastro-intestinais, renais e até câncer (ASTOVIZA; SUÁREZ, 2005; FERREIRA *et al.*, 2006; VOGUEL; JIMÉNEZ, 2006).

Ressalta-se que este estudo se torna imprescindível como forma de proteção à saúde pública da população, diante da inexistência de dados que informem a composição físico-química e micotoxicologica destes efluentes que são despejados sem controle específico no ambiente. Além de disponibilizar uma metodologia analítica validada empregando uma técnica simples, rápida, de baixo custo para a extração e determinação de micotoxinas em laboratórios com infraestrutura de rotina básica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o perfil de solutos em águas da cadeia produtiva do arroz enfatizando as micotoxinas.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método multimicotoxinas para extração de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz.
- Determinar a ocorrência de aflatoxina B_1, aflatoxina B_2, ocratoxina A, zearalenona e deoxinivalenol em águas de irrigação e parboilização de arroz.
- Estudar processo de migração de micotoxinas e outros solutos sob diferentes condições de encharcamento, durante a parboilização de arroz.
- Estudar as características físico-químicas em águas de irrigação e parboilização de arroz e correlacionar com a existência de micotoxinas.

4. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

4.1 Arroz produção e consumo

Nos últimos 18 anos, a produção mundial de arroz alcançou um crescimento de 21% ultrapassando a marca de 420.65 milhões de toneladas na safra 2006/07. Sendo que o consumo mundial de arroz atingiu um total de 434.12 milhões de toneladas em 2009, mostrando um expressivo crescimento de 38,1% no período. O Continente Asiático é o maior consumidor de arroz, com 79 kg/hab/ano, seguido pela América do Sul, com 30 kg/hab/ano, o Africano, com 19 kg/hab/ano, América Central e Caribe e Oceania, com 17 kg/hab/ano e finalmente a Europa, com 4 kg/hab/ano

Os estoques mundiais que se apresentavam na safra de 1984/85 com cerca de 22 milhões de toneladas subiram para 146 milhões de toneladas em 2000/01. Na safra de 2008/09 foi estimado em 84 milhões de toneladas (Tabela 1).

Tabela 1- Arroz beneficiado: Produção, consumo e estoque final - Total mundial - Safras 1984/85 - 2008/09 (milhões de t)

Ano	Produção	Consumo	Estoque
1984/85	319.15	314.23	22.17
1989/00	344.51	337.93	54.53
1994/95	360.62	362.12	48.53
1999/00	408.39	398.44	143.06
2000/01	397.76	396.91	146.17
2001/02	398.60	411.14	136.92
2002/03	377.81	407.05	110.18
2003/04	391.51	415.67	86.15
2004/05	400.49	407.74	78.14
2005/06	417.55	415.45	76.83
2006/07	420.65	421.43	74.90
2007/08	432.13	428.47	78.55
2008/09	439.74	434.12	84.60

Fonte: USDA.

Cabe salientar que na safra de 2008/09, as maiores produções pertencem a China, responsável por 30,8%, seguida pela Índia, com 22,2%; Indonésia, com 8,3%; Vietnã, com 5,4%; Tailândia, com 4,4%; Filipinas, com 2,4% e Brasil, com 1,9%.

Com uma produção de 14.741 milhões de toneladas de arroz na safra 2007/08, a participação brasileira passou a ser de 81,8% no MERCOSUL, seguido pela Uruguai, com 8,8%, Argentina, com 8,5% e Paraguai, com apenas 0,9% (Tabela 2)

Nos últimos nove anos, os maiores rendimentos médios desses países pertencem ao Uruguai e a Argentina, com 6.732 e 6.614 quilos por hectare, respectivamente. O Brasil fica em 3º lugar nessa disputa, com 3.816 kg/hectare influenciado pelo cultivo de arroz de sequeiro em alguns estados da Federação. Entretanto ao computar somente o arroz irrigado explorado nos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, responsáveis por cerca de 70% da produção nacional, a produtividade destes dois estados se aproxima bastante daqueles países.

Tabela 2- Arroz - Quantidade produzida nos países do MERCOSUL - Safras 1999/00 - 2007/08 (mil t)

Safra	1999/00	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08
MERCOSUL	13.304	15.466	13.992	13.487	14.741
Brasil	11.090	13.193	11.527	11.080	12.060
Uruguai	1.209	1.215	1.146	1.200	1.300
Argentina	904	956	1.193	1.075	1.246
Paraguai	101	102	126	132	135

Fonte: FAO 2008.

4.2 O arroz e o processo de parboilização

A parboilização é um processo de beneficiamento industrial do arroz que requer operações hidrotérmicas para ocasionar a gelatinização e a retrogradação do amido e torna-lo mais resistente a operação de descascamento. Este processo foi introduzido no Brasil em 1953, com a instalação de uma planta no RS (AMATO; SILVEIRA, 1991).

A legislação brasileira define a parboilização como sendo ´´um processo hidrotérmico no qual o arroz em casca é submerso em água potável à temperatura de 58°C, o que propicia a gelatinização parcial ou total do amido, seguido de secagem e beneficiamento``. Em

decorrência deste tratamento pode ocorrer uma redução de perdas nutritiva no beneficiamento e rendimento de grãos inteiros (AMATO, 2002). A melhora das características físicas do grão neste processo propcia a intensificação dos fenômenos biológicos durante o processo, aumentando os percentuais de defeitos que esses possam ter em sua origem em função da presença de patógenos (BIANCHINI, 2003).

Este processo também pode ocasionar impactos ambientais, principalmente na etapa de encharcamento, causado pela própria temperatura de saída da água de operação, que pode sair do processo com valores em torno de 60 °C, causando a diminuição de oxigênio dissolvido OD com danos a vida aquática, especialmente em peixes mais sensíveis (AMATO, 2002). Outro risco é que, os contaminantes da casca e das porções mais externas tais como pesticidas, esporos microbianos e micotoxinas, podem migrar para água descartada e se disseminar no ambiente (DORS *et al*., 2009).

O processo de parboilização emprega como matéria prima arroz com casca, água e calor sem qualquer agente químico e pode ser divido em três operações, segundo Amato, (2002):

A- Encharcamento

O arroz em casca é colocado em tanques com água quente por algumas horas. Nesta etapa os compostos químicos presentes nas porções externas podem migrar para o interior do grão ou para água de descarte conforme suas propriedades físicas e químicas.

B- Gelatinização do amido

Nesta operação o arroz úmido é autoclavado para propiciar a gelatinização que decorre da transformação do amido da forma cristalina para forma amorfa. Em função disto os compostos migrados para o interior são fixados.

C- Secagem

Operação necessária para reduzir atividade de água do grão para garantir a conservação e possibilitar o descascamento e o polimento do grão para comercialização.

4.3 Efluente de parboilização do arroz

Segundo Queiroz, (1997) os efluentes líquidos gerados por uma indústria de parboilização do arroz constituídas principalmente por águas residuais do processo de encharcamento, geração de vapor e limpeza geral da indústria.

Na água residual, o nitrogênio provém da proteína do grão do arroz que é liberada durante o processo de parboilização. O fósforo pode ser decorrente do acúmulo de resíduos de adubação, defensivos agrícolas, ou da hidrólise da ftina, das cascas dos grãos, que com encharcamento pode ser hidrolizada, liberando fósforo como fosfato.

As perdas dos constituintes estruturais do arroz no processo de parboilização são bastante significativas. Subramanian e Dakshinamurthy (1977) relatam que o processo de encharcamento prolongado ocasiona perdas de proteínas e carboidratos solúveis na água de maceração. Estes mesmos autores demonstram que as perdas de sólidos são maiores quando a parboilização é realizada durante um curto período de encharcamento, seguido por um longo período de cozimento.

A transferência de sólidos solúveis para água de maceração está entre 0,3 e 0,6% e que nestes sólidos a proteína representa 0,5% das proteínas totais do grão. Portanto a cadeia de compostos nitrogenados deste efluente caracteriza-se por apresentar predominância em nitrogênio orgânico (LERICA; TORTOSA, 1977).

Gutkoski e Elias, (1994), avaliando o efeito das condições de maceração e autoclavagem na parboilização do arroz concluíram que os teores de sólidos totais e cinzas da água de maceração aumentam com o tempo de encharcamento, o que é explicado pelas perdas de componentes do grão para a água.

Em efluentes, em geral, as forma de nitrogênio em ordem decrescente de oxidação são: nitrato, nitrito, amônia, e nitrogênio orgânico, onde estão incluídos proteínas, lipídios, ácido nucléico, uréia e outros compostos sintéticos.

Um efluente, para poder ser descartado em um corpo receptor, deve estar enquadrado em padrões estabelecidos por um órgão de Legislação Ambiental. No Brasil, temos o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que estabelece o limite de concentrações dos constituintes químicos isolados e de outros parâmetros, por exemplo, o pH que pode abranger uma faixa entre 5 e 9, a temperatura que deve ser inferior a 40 °C, sendo que a variação no corpo receptor não deverá exceder a 3 °C na zona da mistura e os materiais sedimentáveis que tem um limite de 1 mL L^{-1} para seu lançamento em lagoas e lagos, cuja a

velocidade de circulação seja praticamente nula, e deverão estar virtualmente ausentes. O regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vezes a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente.

4.4 Parâmetros de qualidades das águas para irrigação de culturas cerealíferas

A qualidade da água pode ser representada através de diversas propriedades que traduzem as suas principais características físicas, químicas e microbiológicas. Os principais parâmetros da qualidade estabelecidos conforme RESOLUÇÃO CONAMA N° 357, de MARÇO de 2005 e seu significado encontram-se no apêndice A em sua forma completa.

4.5 Importância das micotoxinas em alimentos

O campo das micotoxinas é complexo e interdisciplinar, envolvendo muitos conhecimentos que implica na necessidade de inter-relacionar diferentes áreas, abrangendo aspectos relacionados com a produtividade, metabolismo, toxicologia, saúde e oferta e distribuição na natureza.

As formas de controle compreendem a prevenção, análise da micotoxina e segregação do material contaminado e detoxificação, tendo análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) como excelente ferramenta e por fim, a análise do sistema sócio-econômico que relaciona e envolve a conjuntura cultural, política e econômica estudada (PARTERSON *et al.*, 2004).

As micotoxinas compõem uma mistura de compostos tóxicos, carcinogênicos e mutanogênicos resultantes da atividade metabólica secundária dos fungos toxigênicos que podem ser produzidas em uma ampla variedade de produtos de origem vegetal por contaminação primária ou animal por contaminação secundária. Nos primeiros são produzidas sob uma grande variedade de situações bióticas e abióticas, sendo reconhecidamente tóxicas para outras formas de vida (FERNANDES, 2004). São compostos orgânicos de baixo peso molecular e não possuem imunogenicidade. A presença de micotoxinas nos alimentos é potencialmente perigosa para a saúde humana e animais de criação, pois além de deprimir o

sistema imune, possui vários efeitos tóxicos e grande estabilidade frente ao aquecimento (BOK *et al.*, 2004; FERNANDES, 2004; RICHARD, 2007).

São reconhecidas mais de cem espécies de fungos produtores de micotoxinas em diferentes substratos destinados, tanto a alimentação humana, quanto a animal (MIDIO; MARTINS 2000). No entanto o número de micotoxinas produzidas é desconhecido, embora alguns autores afirmem que existam cerca de 400 micotoxinas reconhecidas como ocorrência natural (PIER *et al.*, 1980; MIDIO; MARTINS, 2000; PATERSON *et al* ., 2004).

As principais micotoxinas podem ser dividas em: aflatoxinas (AFAs), produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *Aspergillus. flavus* e *Aspergillus. paraziticus*; Ocratoxina A (OTA), produzidas pelo *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium;* Fusariotoxinas, que possuem como principais representantes deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA). As fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium;* A Patulina, produzidas espécies do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e *Biossochamys*, (BOTTALICO; PERRONE, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002.; BENNETT; KLICH, 2003; PATERSON *et al.*, 2004; BELLÍ *et al.*, 2005; MACHINSKI JR, 2006).

4.6 Fatores físico-químicos e biológicos que influenciam no desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas

Os fatores que levam ao desenvolvimento de micotoxinas em cereais, antes da colheita e após ela estão totalmente entendidos, mas não são de particular importância na manutenção da qualidade dos grãos. Assim muitas relações de causa efeito ainda vem sendo investigadas (BAPTISTA *et al.*, 2004).

As condições climáticas dos países tropicais (temperatura e umidade elevadas) favorecem a proliferação de fungos em grãos podendo trazer dificuldades para a exportação destes produtos, ocasionando impactos negativos para economia dos países que tem o equilíbrio de sua balança comercial baseada na exportação de grandes quantidades de grãos (LEUNG *et al.*, 2006).

Fungos produtores de micotoxinas podem ser classificados em três grupos de acordo com o substrato e o habitat oferecido para seu desenvolvimento: fungos de campo, que geralmente contaminam as plantas antes mesmo de se realizarem a colheitas; fungos de armazenamento, que se desenvolvem no armazenamento do alimento; e fungos de

decomposição, que como o próprio nome sugere, levam o alimento a um estado de decomposição tornando-o impróprio para o consumo (MIDIO e MARTINS, 2000; TANIWAKI e SILVA, 2001; BAPTISTA *et al.*, 2004; HOELTZ, 2005). Os fatores que afetam a formação de micotoxinas são: temperatura, umidade, tempo, atividade de água do produto, composição do substrato, e a presença de linhagens toxigênicas (TANIWAKI e SILVA, 2001; BAPTISTA *et al.*, 2004; HOELTZ, 2005). As toxinas não são freqüentemente produzidas em temperaturas ótimas para o crescimento da espécie envolvida. A faixa de temperatura para formação de AFAs é de 25 °C a 32 °C, embora a temperatura de 13 °C por mais de dois dias permite a formação de aflatoxina (OSWAILLE, 1998).

No entanto, produção de ZEA por espécies de *Fusarium* ao contrário de outros tipos de fungos não se dá na temperatura ótima, de crescimento, nem em temperaturas próximas. *Fusarium* cresce na faixa de 0 °C a 40 °C, sendo que a temperatura ótima para produção de ZEA se dá entre 20 e 25 °C mas também verificada a temperaturas baixas, em torno de 12 °C (LOGRIECO *et al*., 2002).

Pitt e Misclambe, (1994) avaliaram o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, em temperaturas de 25, 30 e 37 ºC e diferentes atividades de água (entre 0,75 a 0,996). Foram utilizadas glicose e frutose para o controle da atividade de água no meio, sendo que a relação atividade de água entre as espécies mostrou-se similar. O mínimo de atividade de água para germinação e crescimento das espécies estudadas foi de 0,82 a 25 ºC, 0,81 a 30 ºC e 0,80 a 37 ºC sendo que o *Aspergillus nomius* foi ligeiramente menos xerofílico que as demais espécies.

Na Tabela 3 são apresentados os limites de umidade mínimos para o crescimento e a produção de toxinas por *Aspergillus flavus* em diversos substratos naturais.

Tabela 3 - Limites mínimos de umidade para crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas

Umidade	Produtos
18%	Trigo, milho e sorgo
16,5%	Arroz não beneficiado
17,5%	Arroz beneficiado
17-18%	Soja
9-10%	Amendoim

Fonte: Taniwaki, e Silva, 2001

O comportamento microbiano frente à atividade de água (aw) é extremamente variável. Os substratos com aw inferior a 0,60 estão assegurados quanto à contaminação microbiana. A partir do aw 0,65 começa a ocorrer a proliferação de micro-organismos específicos sendo que até 0,75 somente leveduras osmofílicas e fungos xerofilícos podem se desenvolver. A atividade de água para a produção de micotoxinas varia de 0,80 a 0,99, normalmente maior que para o desenvolvimento do fungo. Para a produção de OTA A*spergillus ochraceus* tolera atividades de água tão baixas como 0,80 (TANIWAKI e SILVA, 2001; CABAÑES, 2006).

Segundo Taniwaki e Silva (2001) os fungos são muito pouco afetados pela variação de pH e sobrevivem e se desenvolvem entre pH 3 e 8. Entretanto, quando o pH afasta-se do ótimo (geralmente próximo 5,0) a velocidade do crescimento diminui e se houver outros fatores de inibição como, por exemplo, a temperatura e atividade de água, seu efeito restritivo sobre a velocidade de crescimento torna-se mais acentuado.

4.7 Micotoxinas e suas características

Micotoxinas são metabolitos secundários de fungos filamentosos de diferentes linhagens que se desenvolveram em diversos produtos de origem agrícola, ainda na lavoura e também no período de estocagem. Estas espécies provocam efeitos tóxicos, imunológicos, carcinogênicos e teratogênicos, tanto em animais quanto em humanos que consumam alimentos contaminados (MALLMANN; DILKIN, 2007).

A produção de micotoxinas é influenciada por diversos fatores que podem ser classificados como biológicos físicos e químicos ainda macro e micro ambientais tais como; conteúdo de umidade, temperatura, injuria mecânica, tempo, aeração (dióxido de carbono e oxigênio) (MELLO; MCDONALD, 1999; YOSHIZANA, 2001; GUIRAUD *et al.*, 2004; BAPTISTA *et al*., 2004; CABAÑES *et al*., 2006). As micotoxinas podem estar presentes em um alimento independente deste apresentar crescimento fúngico aparente e podem persistir mesmo após a morte do fungo (OSBORNE, 1982; MOSS, 2002).

A exposição indireta de humanos a micotoxinas ocorre quando os resíduos tóxicos destas toxinas ou ainda seus derivados persistem em produtos de origem animal ou vegetal empregados na dieta (UENO, 1986; MELLO e MCDONALD, 1999**;** YOSHIZAWA, 2001 BAPTISTA *et al*., 2004).

4.7.1 Aflatoxinas (AFAs)

As micotoxinas de maior significância em alimentos e rações são AFAs, produtos tóxicos resultantes do metabolismo secundário de espécies do fungo *Aspergillus*, principalmente de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus paraziticus*, *Aspergillus nomius* (CREPPY, 2002; MOSS, 2002; BOK *et al.*, 2004; YU *et al*., 2005). Estas micotoxinas são contaminantes naturais de alimentos, sendo detectada sua maior incidência em regiões tropicais e subtropicais, devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento fúngico, como umidade e temperaturas elevadas (RUSTON, 1997; MOSS, 2002).

A contaminação dos produtos por essas micotoxinas pode ocorrer praticamente em todas as fases de sua obtenção, desde a contaminação no campo, durante a colheita, no transporte e no armazenamento (FERREIRA *et al*, 2006). Os seres humanos e animais são sensíveis aos seus efeitos tóxicos que podem ser agrupados como: mutanogênicos, carcinogênicos e teratogênicos (ASTOVIZA; SUÁREZ, 2005; FERREIRA *et al.*, 2006; VOGUEL; JIMÉNEZ, 2006). Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer em seres humanos estejam diretamente relacionados a dieta e a presença de AFAs em alimentos, sendo considerada um fator importante na produção de câncer hepático. (CALDAS *et al.*, 2002, FERREIRA *et al*., 2006).

Somente quatro AFAs foram identificadas como contaminantes naturais de produtos agrícolas. São denominadas de Aflatoxina B_1 (AFA B_1), Aflatoxina B_2 (AFA B_2), Aflatoxina

G_1 (AFA G_1) e Aflatoxina G_2 (AFA G_2). A AFA B_1 é a mais tóxica do grupo, seguida pela AFA G_1, AFA B_2 e AFA G_2 com toxicidade de 50%, 20% e 10% em relação à primeira, respectivamente (CREPPY, 2002).

Essas micotoxinas principais são dividas nos grupos B e G, que se referem ás suas propriedades fluorescentes. Sob luz ultravioleta de ondas longas, as aflatoxinas B_1 e B_2 apresentam florescência azul e as aflatoxinas G_1 e G_2 apresentam fluorescência verde (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A intensidade da emissão de fluorescência varia entre elas, constituindo-se assim como base para técnicas de detecção e quantificação. (TANGO, 1974; MIDIO e MARTINS, 2000). As AFAs são substâncias medianamente polares, solúveis em solventes como o clorofórmio, metanol, benzeno, acetonitrila, etc. Em estado puro, são extremamente estáveis a altas temperaturas superando até 200 ºC e não são afetadas pelo frio.

Quimicamente, as aflatoxinas apresentam um grupo de compostos heterocíclicos altamente oxigenados; sua estrutura consiste de um núcleo cumarínico fundido com um anel bifurano e mais um anel pentanona ou 6-lactona.

As AFAs B apresentam o anel pentanona, enquanto as AFAs G possuem o anel 6-lactona. A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das principais AFAs.

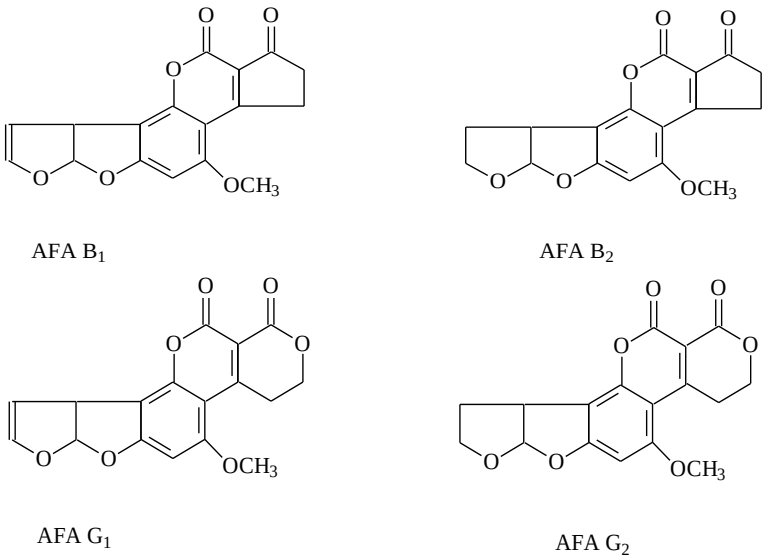


Figura 1- Estrutura química das principais Aflatoxinas

No Brasil, as AFAs são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação (CALDA *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2006). O Ministério da Saúde através da resolução RDC n° 274, da ANVISA, de 25 de outubro de 2002, estabelece os seguintes limites para alimentos de consumo humano:

- ✓ Amendoim e pasta de amendoim: $B_1 + B_2 + G_1 + G_2 = 20$ µg kg $^{-1}$
- ✓ Milho em grão: $B_1 + B_2 + G_1 + G_2 = 20$ µg kg $^{-1}$
- ✓ Leite Fluido: $M_1 = 0,5$ µg kg $^{-1}$
- ✓ Leite em pó: $M_1 = 0,5$ µg kg $^{-1}$

Esta em estudo o estabelecimento de limites para outras micotoxinas, em especial para o deoxinivalenol.

4.7.2 Ocratoxina A (OTA)

Espécies fúngicas produtoras de OTA podem colonizar grande variedade de alimentos. A OTA é uma micotoxina que possui uma beta-fenilalanina ligada a uma isocumarina. O grupo isocumarina é formado de acetato e malonato via poliquetídio. Um átomo de cloro (clorina) é incorporado ao pentaquetídio pela ação de uma cloroperoxidase. A unidade C_1 é adicionado e oxidada por um grupo carboxil do C_8.. (SWEENWEY; DOBSON, 1999; YOSHIZAWA, 2001).

A OTA é principalmente produzida pelo *Aspergillus alutaceus* (*Aspergillus ochraceus*), embora também a produzam *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium commune*, *Penicillium purpurecens*, *Penicillium palitans*, *Penicillium verrucosum*, entre outros. A ocratoxina A é predominantemente produzida pelo *Penicillium viridicatum* em climas frios e *Aspergillus alutaceus* em climas quentes (LARSEN *et al*., 2001; BAYMAN *et al*., 2002; GUIRAUD *et al.*, 2004).

As informações disponíveis hoje na literatura referem-se à OTA, como a micotoxina mais abundante em alimentos. Esta se hidrolisa originando a fenilalanina e isocumarina. É estável sob refrigeração, mas não sob luz fluorescente. Apresenta-se como um composto incolor e cristalino, com ponto de fusão de 168 a 173 °C. Solúvel e solventes orgânicos polares e ligeiramente solúvel em água (MIDIO e MARTINS, 2000).

Uma importante característica da OTA é a sua estabilidade térmica e sua resistência ao tratamento térmico. Também 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. Apesar da OTA pura ser foto-sensível, o efeito da luz sobre a toxina aderida em cereais tem pouca importância, apresentando níveis similares em amostras estocadas no escuro ou não (TRENK; BUTZ; CHU, 1971; MIDIO e MARTINS, 2000).

A OTA representada na Figura 2 é classificada pela International Agency for Research on Cancer como substância do grupo 2 B devido sua carcinogenicidade,além de sua reconhecida ação nefrotoxica, imunossupressora e teratogênica (CALDAS *et al.*, 2002).

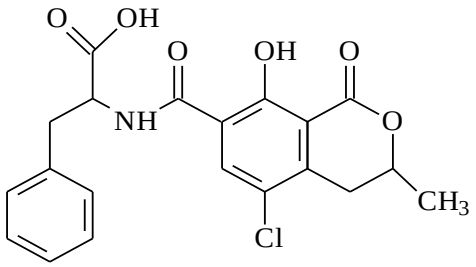


Figura 2- Estrutura química da ocratoxina A

4.7.3 Zearalenona (ZEA)

A Zearalenona é uma micotoxina com atividade estrogênica produzida apenas por espécies de fungos do gênero *Fusarium*. O maior produtor é a espécie *Fusarium graminearum*, estágio adulto da *Gibberella zeae* (HAGLER *et al*., 2001).

Segundo Shier (1998), a ZEA é sintetizada pela via do acetato-polimalonato, resultando na condensação de unidades de acetato dentro de um poliquetideo, que requer relativamente pequenas modificações para completar a conversão para a molécula final.

A ZEA ocorre em praticamente todos os cereais, especialmente em culturas de inverno. A contaminação natural aparece em cevada, milho, sorgo, aveia e rações produzidas com base nestes produtos (DILKIN, 2002). A denominação de toxina para a ZEA é considerada inadequada uma vez que, embora biologicamente potente, pois sua estrutura

assemelha-se ao 7ß-estradiol, principal hormônio produzido no ovário feminino humano, portanto seria melhor classificada como estrógeno não esteroidal ou um micoestrógeno (BENNETT e KLICH, 2003).

Muitas espécies animais, além de suínos, são suscetíveis a ação da ZEA, como por exemplo, gado leiteiro, aves carneiros e animais de experimentação tiveram seus processo de reprodução alterados após a ingestão de rações contaminadas (CAZENAVE e MIDIO, 1998)

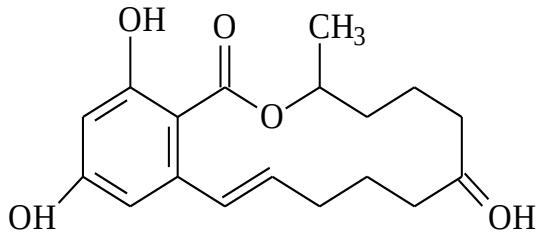


Figura 3- Estrutura química da zearalenona

4.7.4 Tricotecenos

Os tricotecenos formam um grupo químico de metabólitos fúngicos, com a mesma estrutura básica, sesquiterpenóides substituídos por éter e álcool produzidos principalmente por fungos do gênero *Fusarium* como *Fusarium graminearum* e *Fusarium tricinctum* (MILLER *et al.*, 2001).

Mundialmente, DON é o contaminante de cereais mais comum, acompanhado em certas regiões por nivalenol (NIV). Poderá haver a presença concomitante de outros TCT e outras toxinas de *Fusarium* no mesmo lote de cereais (MILLER, 1995).

Tricotecenos do grupo B, como o DON, são compostos sólidos e cristalinos, são mediamente polares que podem ser solúveis em soluções aquosas formadas com metanol e acetonitrila. Apresentam certa estabilidade química, podendo ser armazenados em solventes orgânicos, como acetato de etila sem se decompor. Também não se decompõem em meio ácido (MIDIO e MARTINS, 2000).

Ainda sobre as micotoxinas pertencentes ao grupo B pode-se dizer que apresentam grupamentos funcionais que provavelmente são responsáveis pelas suas propriedades tóxicas,

assim a biotransformação leva quase sempre, a compostos de menor atividade e, portanto menos tóxicos. No caso mais específico do DON, este possui o grupamento epóxido em sua estrutura química que em experimentos in vitro mostrou-se ser o responsável pela toxicidade da micotoxina (NEAL, 1998).

Os tricotecenos atuam inibindo a enzima peptiltransferase, desta forma diminuindo a síntese protéica, o que afeta principalmente células em divisão ativa, como as do trato gastrintestinal, pele e células linfóides, eritróides e órgãos vitais. Os tricotecenos são imunossupressores e também são associados a hemorragias, sendo que o tempo da protrombina é aumentado significativamente, porém o fator primário da hemorragia é pela diminuição do fator VII da coagulação sangüínea. As intoxicações por TCT acarretam recusa de alimentos, vômito, redução na conversão alimentar e diarréia (UENO, 1983). A Figura 4 representa a estrutura química do deoxinivalenol.

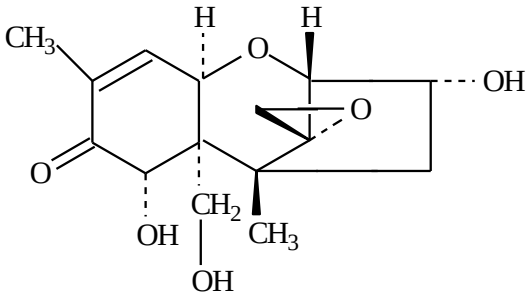


Figura 4- Estrutura química do Deoxinivalenol

4.7.5 Determinação de micotoxinas

O desenvolvimento da Química Analítica tem propiciado a popularização de técnicas relativamente novas e a readequação de outras já fundamentadas. No caso de análises micotoxicológicas não é diferente. O resultado disto é a ampliação de uma série de alternativas para a determinação de diferentes micotoxinas, em várias matrizes e em concentrações cada vez menores.

Entretanto, a obtenção de resultados exatos para determinação micotoxinas não é tarefa muito fácil. Existem vários fatores que dificultam este tipo de análise como, por

exemplo, distribuição não uniforme das micotoxinas nos lotes contaminados, concentrações das micotoxinas serem baixas da ordem de ng kg^{-1}. Também deve-se considerar o fato de que as micotoxinas são um grupo de substâncias que apresentam uma certa variabilidade em suas propriedades físico-químicas conforme demonstrado na Tabela 4 e por isso o desenvolvimento de métodos para determinação simultânea tem sido um desafio para os analistas.

Tabela 4- Propriedades físico-químicas e algumas características das micotoxinas

Micotoxina	F.M	M. M	Polaridade	Outras características
AFA B_1 AFA B_2	$C_{17}H_{12}O_6$ $C_{17}H_{14}O_6$	312,06 314,08	medianamente polares	solúveis em solventes como clorofórmio, metanol, benzeno e acetonitrila, bastante solúveis em temperaturas acima de 100°C
OTA	$C_{20}H_{18}O_6$	403,08	medianamente polar	È estável sob refrigeração. Solúvel em solventes orgânicos polar e ligeiramente solúvel em água.
ZEA	$C_{18}H_{22}O_5$	318,15	medianamente polar	Muito estável a hidrolise.
DON	$C_{14}H_{21}O_6$	285,0	Polar	Solúveis em soluções aquosas metanol e acetonitrila. Não se decompõe em pH ácido.

F.M= Fórmula molecular; M. M= Massa molecular
Fontes = COLE & COX, 1981; SCOTT, 1993. MIDIO e MARTINS, 2000

Um grande número de métodos para triagem, inspeção e controle de micotoxinas em alimentos tem sido desenvolvido. As micotoxinas também têm sido determinadas através de técnicas imunoenzimáticas. Anticorpos são altamente específicos para compostos que diferem acentuadamente em termos estruturais. Entretanto, em se tratando de compostos análogos, são comuns reações cruzadas, o que é o caso de micotoxinas. O tipo mais comum de imunoensaio é o chamado ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) que usa como forma de detecção desde simples comparação visual de cores até métodos mais complexos como espectrofotometria, amperometria e voltametria de pulso diferencial (NAKAJIMA, 2001).

Em análises micotoxicológicas é também comum o uso da técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) podendo ser considerada uma técnica tradicional de determinação (DOMINGUEZ *et al.,* 1987; SABINO *et al*., 1989; PRADO *et al*., 1994; SYLOS *et al.,* 1996), fácil e de rápida execução, não requer o uso de equipamentos dispendiciosos e ser de baixo custo (MIDIO e MARTINS, 2000). Por isso a Cromatografia de Camada Delgada é o método mais utilizado para a determinação de micotoxinas em muitos países, principalmente em países, em desenvolvimento.

Em CCD há uma estimativa visual da comparando a intensidade de fluorescência da mancha das micotoxinas extraídas da amostra e do padrão em uma mesma cromatoplaca, sendo um método semi-quantitativo (SYLOS *et al.,* 1996).

Também pode-se citar outros métodos desenvolvidos para proceder as análises quantitativas e qualitativas de toxinas tais como: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS), Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (LC-MS), (PESTKA, 1994; SCOTT, 1997; SOLEAS, 2001; PALLARONI, 2003).

A etapa final da determinação de micotoxinas é a confirmação. A confirmação da identidade pode ser realizada com derivações químicas especificas, que alteram o tempo de retenção ou o Rf do analito, espectrometria de massas ou infravermelho. Outras técnicas como o uso de colunas de imunoafinidade na limpeza ou detecção por fluorescência já são consideradas confirmatórias (VALENTE SOARES, 2001).

4.7.6 Ocorrência de fungos e micotoxinas em arroz

Segundo dados da FAO (2008), cerca de 15 a 16% da safra de arroz é perdida anualmente, principalmente durante operações críticas de pós-colheita como secagem e armazenamento e processamento. Neste contexto os fungos estão entre os principais contaminantes responsáveis pelas perdas da qualidade do arroz durante o armazenamento (DRUVEFORS; SCHWURES, 2004). A incorreta armazenagem e processamento dos grãos podem propiciar condições favoráveis à contaminação fungica, que além de causarem alterações de caráter nutricional e sensorial no produto são capazes de produzir micotoxinas potencialmente perigosas a saúde humana (PATKAR, 1994; BAPTISTA *et al*, 2004; HOELTZ *et al*,.2008).

A literatura mundial e a comprovação experimental de levantamentos realizados na região sul do Brasil demonstram a susceptibilidade das matérias-primas tais como, arroz e farelo de arroz à contaminação fúngica. Dentre a micota identificada foram encontradas espécies toxigênicas que podem produzir micotoxinas sob condições bastante diversas e complexas (SABINO, 1996; COELHO *et al*., 1998; FURLONG *et al*., 1999; YOSHIZAWA 2001; BIANCHINI, 2003; NUNES *et al.*, 2003; DORS *et al.*, 2009).

Atentando para a contaminação do arroz parboilizado Coelho *et al.*, (1999) estudaram a migração de AFAs e OTA durante a parboilização do arroz sob diferentes condições de encharcamento (60 °C durante quatro e seis horas) autoclavagem (121 °C durante 15 e 30 minutos) e secagem em camada delgada (60 °C durante 6 e 7 horas). Foi constado que ocorria migração das micotoxinas da casca para o endosperma do amiláceo nas seguintes proporções: 32% de AFA $B_{1;}$ 44% AFA $B_{2;}$ 36 % de AFA $G_{1;}$ 22% de AFA $G_{2.}$ A avaliação estatística dos dados permitiu estabelecer equações preditorias do comportamento das micotoxinas em função do tempo de encharcamento e autoclavagem. No entanto não foi avaliada a ocorrência das micotoxinas na água de parboilização do arroz.

Lima *et al*., (2000) pesquisando arroz com casca e derivados (arroz, brunido, farelo e palha) armazenados em silo, não verificaram a presença de AFAs, mesmo com a detecção de 52,6% dos 19 isolados de *Aspergillus flavus* produtores de aflatoxinas do grupo B.

Ao analisar arroz com casca durante a secagem e o armazenamento em silo metálico, quanto à presença de AFAs, OTA e ZEA, Bianchini, (2003) encontrou ZEA em níveis de 5850 e 1840 µg kg^{-1}. Além disso, de um total de 137 isolados de *Aspergillus flavus* apenas dois se mostraram produtores de AFAs B_1 e B_2.

Avaliando AFAs e OTA em 68 amostras de arroz polido e integral, Sylos *et al.*, (2003) não encontraram OTA em nenhuma delas porém, AFA B_1 foi detectada em duas amostras de arroz polido, com níveis de 9 e 6 µg kg^{-1}.

Silva *et al*., (2008) analisaram a ocorrência de AFAs em arroz consumido pelo exercito brasileiro por CCD e CLAE sendo que na avaliação por CCD não foi verificada a presença de nenhuma micotoxina, no entanto por CLAE seis amostras foram positivas para AFA B_1 com níveis variando entre 0,54 a 2,04 mg kg^{-1} e uma apresentou a presença de AFA B_2 sendo que nenhuma atingiu o limite proposto pela legislação brasileira ou do Codex alimentarius.

5. MATERIAS E MÉTODOS

O presente trabalho estudou o perfil de solutos presentes em águas da cadeia produtiva do arroz. Foram avaliados teores de sólidos totais, sólidos fixos, sólidos voláteis, fósforo, açúcar redutor, açúcar redutor total, nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, nitrato, nitrito, ácidos voláteis, alcalinidade e pH.

Foi desenvolvido um método multimicotoxinas avaliando a eficiência de cinco sistemas de partição-extração e determinação simultânea das seguintes micotoxinas AFA B_1, AFA B_2, OTA, ZEA e DON, cuja ocorrência foi avaliada em águas de irrigação da cultura e de parboilização de arroz. Este procedimento também foi empregado para avaliar a migração de micotoxinas $AFAB_1$, OTA, ZEA e DON, durante o processo de parboilização utilizando como variáveis os tempos de encharcamento de 4 e 6 horas, em dois níveis de fortificação.

5.1 Reagentes, solventes e soluções

- ✓ Acetato de etila Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Acetonitrila Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Ácido ascórbico Labsynth® (Rio de Janeiro – Brasil).
- ✓ Ácido bórico Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Ácido clorídrico Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Ácido fórmico Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Ácido sulfúrico Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Álcool etílico Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Benzeno Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Brometo de cetil trimetilamônio Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Carbonato de sódio Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Celite Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Cloreto de alumínio Synth® (Rio de Janeiro – Brasil).
- ✓ Cloreto de potássio NUCLEAR® (Rio de Janeiro - Brasil).

- ✓ Clorofórmio Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Fenolftaleína Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Fosfato de potássio Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Hidróxido de sódio Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Metanol Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Metil orage Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Molibidato de amônio Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ α-naftilamina Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Nitrato de potássio Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ ρ-nitroanilina Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Nitrito de sódio Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Resorcionol Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Sulfato de amônio NUCLEAR® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Sulfato de cobre Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Sulfato de potássio Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Tartarato de potássio antimônico Synth® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Tolueno Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Vermelho de metila Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Verde de bromocresol Vetec® (Rio de Janeiro - Brasil).
- ✓ Aflatoxina B_1, B_2 SIGMA CHEMICAL Co. (USA).
- ✓ Deoxinivalenol SIGMA CHEMICAL Co. (USA).
- ✓ Ocratoxina A SIGMA CHEMICAL Co. (USA).
- ✓ Zearalenona SIGMA CHEMICAL Co. (USA).
- ✓ Micropipeta Digipet®.
- ✓ Placas para cromatografia em camada delgada sílica gel 60, superfície especifica ~ 500 m^2/g, diâmetro médio dos poros de 60 A°, volume especifico dos poros de 0,75 mL/g, partículas de 5-17 mm e 0,25 mm de espessura Merck® (Brasil).
- ✓ Placas de cromatografia de camada delgada de alta eficiência de nano sílica gel de 0,2mm ALUGRAM®

5.2 Equipamentos

- ✓ Agitador de tubos PHENIX® AP 56 (Brasil).
- ✓ Balança analítica GIBERTINI® E42S-B (Italy).
- ✓ Banho Maria BIOPAR COEL® – TLK 48 (Brasil).
- ✓ Banho Ultrassonico UNIQUE® Ultra Cleaner 700 (Brasil).
- ✓ Centrifuga Prevac® DCS-16-RV (Argentina).
- ✓ Destilador de nitrogênio Tecnal® (Brasil)- modelo: Te - 036/1
- ✓ Digestor GERHARDT® – Variostat
- ✓ Espectro de feixe duplo Varian /Cary® – 100 Conc.
- ✓ Espectro de feixe simples FEMTO® - 432.
- ✓ Estufa com circulação de ar forçado QUIMIS ® (Brasil)-modelo: Q 314 M 222.
- ✓ Evaporador Rotativo QUIMIS® Q-344B2 (Brasil).
- ✓ Lâmpada ultravioleta de alta intensidade, modelo UVGL 58, multibanda 254-366 nm MINERAL LIGHT ® (Brasil).
- ✓ Mufla QUIMIS® (Brasil)
- ✓ pHmetro HANNA® eletrodo duplo combinado.

5.3 Amostras

Neste trabalho foram utilizados três tipos de amostras:

A) Amostra de água de parboilização da safra de 2008 coletada em empresa da região de Pelotas-RS.

B) As amostras de água de parboilização de grãos da safra de 2009 provenientes de campos tratados e não tratados com fungicidas que foram parboilizados no Instituto Sul Rio-grandense do Arroz (IRGA) em planta piloto da unidade de Cachoeirinha-RS.

C) Águas de irrigação provenientes do IRGA do ano de 2008 e 2009 provenientes de campos de cultivo tratadas e não tratadas com fungicidas que foram coletadas em diferentes períodos de cultivo.

As águas de irrigação e parboilização analisadas neste estudo fazem parte de um grande projeto que teve como parceiro o IRGA (Instituto Sul Rio Grandense do Arroz). Tendo como objetivo avaliar as características físico-químicas e micotoxicologicas destas amostras para traçar um perfil dos solutos presentes no meio de cultura deste grão. As amostras e seus respectivos códigos foram especificados na Tabela 5:

5.3.1 Preparo e armazenamento das amostras

As amostras de água de parboilização do ano de 2008 provenientes de empresa da região foram coletadas em recipientes plásticos, previamente lavados e transportados ao laboratório de Ciência de Alimentos (LCA) da Escola de Química e Alimentos – FURG onde permaneceram congeladas a -18°C (STANDART METHODS, 2005).

As amostras de água de parboilização da safra de grãos 2009 foram submetidas à parboilização no laboratório de Tecnologia do IRGA-Cachoeirinha de acordo com a metodologia desenvolvida pelo Laboratório de Grãos do Departamento de Ciência e Tecnologia Alimentos – Faculdade Eliseu Maciel (GUTKOSKI; ELIAS, 1994).

O arroz utilizado pertencia à variedade BR-IRGA 417 cultivada em campos experimentais tratados e não tratados com fungicidas. As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar e transportados até a o LCA onde permaneceram sob congelamento a -18°C após serem transferidas para recipientes de plásticos.

5.4 Caracterização físico-química do efluente

As análises físico-químicas, nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, fósforo, pH, alcalinidade, ácidos voláteis, sólidos fixos, sólidos totais, sólidos voláteis, realizaram-se em triplicata de acordo com STANDARD METHODS (2005). Nitrato, nitrito foram analisados conforme Bastos *et al.*,(2006) açucares redutores, açucares redutores totais conforme Furlong, (1988). As descrições dos respectivos procedimentos analíticos encontram-se no apêndice B.

Tabela 5 - Relação das amostras analisadas e seus respectivos códigos

Amostra	Código
Água de parboilização 2008	AP-2008
Água de parboilização 2009 de grão tratado com fungicida	APT-2009
Água de parboilização 2009 de grão não tratado com fungicida	APNT-2009
Água de parboilização realizada em bancada durante 4 horas	APB-4H
Água de parboilização realizada em bancada durante 6 horas	APB-6H
Água de irrigação de campo tratado com fungicida (2008)	AIT-2008
Água de irrigação de campo não tratada com fungicida (2008)	AINT-2008
Água de irrigação de campo tratada com fungicida 1 (26/12/08)	AIT-1(26/12)
Água de irrigação de campo tratada com fungicida 2 (26/12/08)	AIT-2(26/12)
Água proveniente do canal de Irrigação (26/11/08)	ACI (26/12)
Amostra 2 (26/11/08)	AM-(26/11)
Água de irrigação de campo não tratada com fungicida 1 (26/12/08)	AINT-1(26/12)
Água de irrigação de campo não tratada com fungicida 2 (28/12/08)	AINT-2 (28/12)
Água de irrigação de campo não tratada com fungicida 3 (26/12/09)	AINT-3 (26/12)
Água de irrigação de campo tratada com fungicida 1 (11/03/09)	AIT-1 (11/03)
Água de irrigação de campo tratada com fungicida 2 (11/01/09)	AIT-2 (11/03)
Água de irrigação de campo tratada com fungicida 3 (11/03/09)	AIT-3 (11/03)
Água de irrigação de campo não tratada com fungicida 1 (11/03/09)	AINT-1 (11/03)
Água de irrigação de campo não tratada com fungicida 2 (11/03/09)	AINT-2 (11/03)
Água de irrigação de campo não tratada com fungicida 3 (11/03/09)	AINT-3 (11/03)
Água de irrigação de campo tratada com fungicida 1 (6/01/09)	AT-1 (6/01)
Água de irrigação de campo tratada com fungicida 2 (6/01/09)	AT-2 (6/01)
Água de irrigação de campo tratada com fungicida 3 (6/01/09)	AT-3 (6/01)
Água de irrigação de campo não tratada com fungicida 3 (6/01/09)	ANT-3 (6/01)

5.5 Situação micotoxicologica

As soluções padrão de micotoxinas utilizadas foram preparadas conforme a metodologia descrita por (BENNETT e SHOTWELL, 1990). Aproximadamente 5mg das AFA B_1, AFA B_2, OTA, ZEA e DON foram dissolvidos em uma mistura de benzeno-acetonitrila. 95:5. As concentrações das soluções estoque foram estimadas através das massas obtidas por diferença após lavagem e secagem dos frascos. Em seguida, as soluções estoques foram diluídas de modo a resultar em soluções padrão de trabalho cujas concentrações foram determinadas espectofotometricamente, utilizando a absortividade molar dos padrões, conforme a Tabela 6.

As concentrações confirmadas por espectrometria (AOAC, 2000) foram 1,25 μg mL^{-1}; 1,5 μg mL^{-1}, 7,4 μg mL^{-1}; 25,6 μg mL^{-1} e 36,5 μg mL^{-1} para AFA B_1, de AFA B_2, OTA, ZEA e DON respectivamente.

Tabela 6 - Massa molecular, absortividade molar e comprimento de onda máximo de absorção das micotoxina

Micotoxina	Massa molecular	Absortividade molar	Máxima absorvância (nm)
AFA B_1	312	19800	348
AFA B_2	314	20900	350
OTA	403	5550	333
ZEA	318	6060	317
DON	296	5913	219

5.5.1 Condições cromatográficas para determinação de micotoxinas por Cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE)

Para separação de micotoxinas foram utilizadas placas (CCD) pré fabricadas, com sílica gel 60 Merck® com 25 mm de espessura e placas de cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE) com nano sílica gel de 0,2 mm ALUGRAM®. No caso deste

trabalho, as cromatoplacas de sílica CCD foram ativadas a temperatura de 105 °C por 15 minutos, já as placas de CCDAE não exigem ativação.

A fase móvel utilizada neste estudo consistiu de uma mistura dos solventes tolueno: acetato de etila:ácido fórmico 60: 40: 10 (v/v/v) . Nestas condições foi estabelecidos o fator de retardamento (Rf) sendo que este foi calculado conforme a seguinte expressão:

$$Rf = d_r / d_m$$

Onde d_r refere-se à distância (cm) percorrida pelo composto e o d_m distância (cm) percorrida pela fase móvel ou eluente.

Também foram calculado os limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e linearidade das micotoxinas em (CCD) e (CCDAE). Para avaliar a linearidade da curva padrão foram preparadas soluções de concentração específica conforme item 5.5 e aplicados em CCD e CCDAE em quantidades crescentes de cada micotoxina. Os equivalentes em gramas aplicados estão na Tabela 7.

Uma vez eluidas, as placas foram secas em ambiente (temperatura 25°C) com exceção deoxinivalenol e zearalenona, que sofreram derivação com cloreto de alumínio 15% antes da visualização sob U.V em ondas longa e curta de (366 e 254 nm).

Tabela 7 – Concentrações abrangidas pelas curvas analíticas em CCD e CCDAE

AFA B_1(ng)		AFA B_2(ng)		OTA(ng)		ZEA(ng)		DON(ng)	
CCD	CCDAE	CCD	CCDAE	CCD	CCDAE	CCD	CCDAE	CCD	CCDAE
1,2	1,5	4,7	1,2	22	20,4	153	26	73	27
2,5	2,9	9,4	2,4	37	27	168	51	85	36
3,7	4,4	14	3,6	42	30	178,5	76	109,5	55
6,2	7,4	18,8	5	59	34	229	102	182,5	91
12,4	15	23,5	6	64	46	280	127	292	183
18,7	22	28	7	74	68	306	383	365	275

5.5.2 Procedimentos de extração partição para determinação simultânea de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz

Foi avaliado a eficiência de cinco sistemas de partição para extração e determinação simultânea AFA B_1, AFA B_2, OTA, ZEA e DON em águas da cadeia produtiva do arroz através da determinação das recuperações e precisão dos procedimentos empregando a CCD.

Para estudar a eficiência do sistema solvente-amostra, 25 mL de água de parboilização foram fortificadas com volumes de solução padrão contendo massas de micotoxinas estabelecidas pelos limites de detecção e quantificação em três níveis de fortificação e em triplicata após 24 horas foram testados os seguintes sistemas de extração e partição:

- **Experimento 1:** metanol: cloreto de potássio e amostra (9:1:1,7) precipitação com sulfato de amônia e celite seguido por três partições sucessivas com clorofórmio (10 mL).
- **Experimento 2:** acetonitrila: água: amostra (9:1:1,7) seguido por partição com clorofórmio (10 mL).
- **Experimento 3:** metanol: acetato de etila: amostra (4,5: 1,5: 1) seguido por três partições sucessivas com clorofórmio (10 mL).
- **Experimento 4:** metanol: acetato de etila: amostra (4,2:1,8:1) seguido por três partições sucessivas com clorofórmio (10 mL).
- **Experimento 5:** amostra seguido por três partições sucessivas com 10 mL de clorofórmio.

Na Tabela 8 estão os níveis de fortificação empregados para o estabelecimento da técnica de extração das micotoxinas.

Tabela 8 - Níveis de fortificação empregados para padronização da extração

Micotoxina	Nível 1 (ng mL^{-1})	Nível 2 (ng mL^{-1})	Nível 3 (ng mL^{-1})
AFA B_1	9	18	27
AFA B_2	61,8	124	185
OTA	53	106	160
ZEA	170	341	513
DON	652	1304	1956

Os resíduos secos de AFA B_1, AFA B_2, OTA, ZEA e DON obtidos após as extrações foram quantificados em cromatografia de camada delgada sendo dissolvidos em 200 µL de benzeno p.a. e agitados em banho de ultra-som, por 60 segundos, sendo aplicados 20 µL em placa de sílica gel G 60 com 25 mm de espessura. O eluente utilizado no desenvolvimento das placas foi uma mistura de tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 60: 40: 10 (v/v/v). Uma vez

eluidas as placas foram secas a temperatura ambiente e, em seguida visualizados sob luz UV longa e curta (366 e 254 nm) identificando por comparação com os fatores de retardamento dos padrões..

Para determinação de DON e ZEA os cromatogramas foram revelados com solução etanólica de cloreto de alumínio 15% e a placa cromatográfica aquecida a 130 °C por 10 min antes da avaliação da fluorescência no UV longa e curta (366 e 254 nm). A quantificação foi realizada comparando a intensidade fluorescência com série de padrões de concentração crescente para cada micotoxina.

5.5.3 Ocorrência de micotoxinas nas amostras de água

Para avaliar a aplicabilidade do procedimento de extração, separação e quantificação de AFA B_1, AFA B_2, OTA, ZEA e DON, foram utilizados água de uma empresa da região da safra de 2008 e água residual da parboilização e irrigação de grãos da safra de 2009 da variedade BR IRGA 417 cultivadas em campos experimentais com ou sem emprego de fungicidas coletadas em diferentes períodos ao longo do cultivo do arroz.

5.6 Estudo da migração de solutos para água de encharcamento do arroz durante a parboilização

5.6.1 Amostra

A amostra de arroz com casca foi fornecida por uma empresa da região sul localizada na cidade de Pelotas- RS. Esta foi avaliada quanto à ocorrência das micotoxinas em estudo usando o método de rotina do LCA- FURG adaptado de Tanaka (2001). A descrição do respectivo procedimento analítico encontram-se no apêndice C.

5.6.2 Contaminação das amostras de arroz

Para realização do estudo da migração de micotoxinas para a água de encharcamento, alíquotas de 60 g de arroz com casca foram colocadas em recipientes de vidro com capacidade para 0,5 L. As amostras de arroz foram fortificadas com solução padrão de cada uma das micotoxinas em estudo. Cada padrão de micotoxina foi gotejado em diferentes pontos da superfície da massa da amostra, evitando assim que a solução padrão aderisse nas paredes dos recipientes, evaporando o solvente por um período de 24 horas a temperatura ambiente de 25°C. As massas de micotoxinas empregadas para contaminação em dois níveis aparecem na Tabela 9.

Tabela 9 – Massa das micotoxinas adicionados nas amostras.

Micotoxinas	Nível 1 (µg g^{-1})	Nível 2 (µg g^{-1})
AFA B_1	0,17	0,3
OTA	2,5	4,9
ZEA	9,8	19,6
DON	12,3	16,4

Após as amostras foram submetidas à encharcamento nos tempos pré estabelecidos de 4 e 6 horas a 60 °C conforme adotado industrialmente no processo de parboilização. Com a água proveniente da drenagem do arroz encharcado foram formadas alíquotas para determinação da migração de solutos em diferentes tempos de encharcamento os dados de caracterização físico-química anteriormente mencionados no item 5.4 e das micotoxinas conforme item 5.5.2

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização físico-química

6.1.1 A eficiência da metodologia da determinação de nitrato e nitrito

A determinação das características físico-químicas é uma rotina na avaliação da qualidade das águas empregadas para diferentes fins. A determinação de sólidos totais e sob outras formas é o primeiro indicativo da presença ou não de compostos que decorrem da contaminação química, física e/ou microbiana.

Alguns elementos químicos como os compostos nitrogenados indicam contaminação de origem orgânica, sendo que as formas de nitrogênio encontradas estão fortemente relacionadas com a presença de micro-organismos e outros seres vivos cuja ação pode afetar a qualidade de água (ONGLEY, 2009). As formas oxidadas de nitrogênio tais como nitrato (NO^-_3) e nitrito (NO^-_2) podem ser provenientes da ação de micro-organismos nitrificantes, lixiviação de resíduos industriais e do próprio emprego de insumos químicos na lavoura (NUGENT *et al.*, 2009).

A presença destes ânions em água de mananciais, empregadas industrialmente ou para o uso animal e humano pode causar danos ao ambiente de armazenamento (nutrientes para o desenvolvimento de diferentes espécies); alteração da eficiência de equipamentos e qualidade de produtos industriais e danos a saúde de animais de criação e silvestres, além de conseqüências na saúde publica (LEIFERT *et al.*, 1999). Em função disto a determinação de compostos nitrogenados especialmente os oxidados devem ser confiáveis.

Neste trabalho foram adotados os métodos para determinação de nitrato e nitrito que buscaram contribuir com a qualidade do ambiente através da geração mínima de resíduos tóxicos. O método adaptado por Bastos *et al.*, (2006) não emprega colunas de cádmio durante a preparação da amostra e seus indicativos de eficiência são similares aos métodos convencionais de redução das formas para a quantificação.

Antes de empregá-lo para a avaliação destes íons nas águas estudadas neste trabalho o método foi avaliado quanto a sua eficiência para este tipo de matriz através da determinação de linearidade, limite de quantificação e recuperação Caulcutt e Boddy, (1983).

Para a quantificação destes íons nas águas foram usadas as equações 1 e 2 provenientes da estimativa da absortividade respectiva do nitrato e nitrito com faixas de concentração variando entre 0,3 a 1,2 mg L^{-1} e 25 a 300 mg L^{-1} (Apêndice D) respectivamente.

$y = 0,3\ x$ $R = 0,98$ (eq. 1)

$y = 0,022\ x$ $R = 0,97$ (eq. 2)

Os indicativos de eficiência estudados estão apresentados na Tabela 10 e as respectivas recuperações estão apresentadas nas Figuras 5 e 6 (Apêndice D) para nitrato e nitrito respectivamente.

Tabela 10 – Indicativos de eficiência do método de determinação de nitrato e nitrito

Indicativos	NO^-_3	NO^-_2
Linearidade (mg L^{-1})	0,3 a 1,2	25 a 300
LD (mg L^{-1})	$9,7 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-3}$
LQ (mg L^{-1})	$1,9 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$
Recuperação 1° nível	100 %	114 %
Recuperação 2° nível	97 %	89 %
Recuperação 3° nível	92 %	98 %

LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação

O método adaptado para determinação de nitrato e nitrito na água apresentou uma exatidão considerada satisfatória demonstrada pela recuperação média nos três níveis de adição de 96% para nitrato e 100% para nitrito ficando próximos de autores como Guozhen *et al.*, (1998) que obteve média de 96% para nitrato e 97% para nitrito realizando recuperação em água potável. O mesmo foi observado para a recuperação dos trabalhos de Bastos *et al.*,(1998) que mencionou uma recuperação de 98% para nitrato e 96% para nitrito respectivamente.

6.1.2 A eficiência da metodologia da determinação de fósforo

Em virtude da forte retenção do fósforo pelas partículas do solo o processo de poluição do solo, e de poluição da água subterrânea por lixiviação de fosfatos é de magnitude desprezível, especialmente em solos tropicais.

No que se refere à saúde, o enriquecimento da água com fósforo não traz maiores problemas, pois se trata de um elemento requerido em elevadas quantidades pelos animais, a execessão são indivíduos com problemas renais. Entretanto, esse enriquecimento traz sério problema em termos de desequilíbrio dos sistemas aquáticos devido ao processo de eutrofização. Assim foi determinado os níveis de fósforo em águas de cadeias produtivas permitindo avaliar o impacto dos processos envolvidos na qualidade do ambiente.

O método que determina o íon fosfato também foi avaliado quanto à eficiência para a matriz em questão levando em consideração as figuras de mérito linearidade, quantificação e a recuperação. Para o íon fosfato dentro da faixa estudada a relação estabelecida para a quantificação é dada na equação 3 juntamente com seu coeficiente de correlação para a faixa de concentração entre 1,1 e 6,5 mg L^{-1} de fosfato (Apêndice D).

$$y = 0{,}1057\ x \qquad R = 0{,}99 \qquad \text{(eq. 3)}$$

Os indicativos de eficiência estudados estão apresentados na Tabela 11 e as respectivas recuperações estão apresentadas na Figura 7 (Apêndice D) para determinação de fósforo como fosfato.

Tabela 11 – Indicativos de eficiência do método de determinação de Fósforo como Fosfato

Indicativos	PO_4^{-3}
Linearidade (mg L^{-1})	1,08 a 6,5
LD (mg L^{-1})	1,0 x10^{-4}
LOQ (mg L^{-1})	2,14 x10^{-4}
Recuperação 1° nível	117 %
Recuperação 2° nível	110 %
Recuperação 3° nível	83,5 %

LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação

O método adaptado para água apresentou uma exatidão considerada satisfatória, demonstrado pela recuperação média nos três níveis de adição de 103,5%.

6.1.3 A eficiência da metodologia da determinação de açucares redutores (AR) e redutores totais (ATR)

A determinação de açucares redutores totais, serve como um indicativo de contaminação microbiana em um determinado meio (sólido ou liquido). Os micro-organismos fazem uso da matéria orgânica, em especial carboidratos decompondo em unidades menores, servindo-se de uma boa parte desta para sua autoconstrução, obtenção de energia e reprodução. O restante é oxidado por meio da respiração aproveitando sua energia para o metabolismo. Desta maneira, carbono nitrogênio e fósforo, que faziam parte das moléculas orgânicas dos resíduos são devolvidas ao meio (ar, água e solo) na forma de compostos mais simples.

A análise das amostras foi feita através do método DNS- (Dosagem dos açucares redutores pelo 3,5 dinitrosalicilico) (BADIALE-FURLONG, 1988). A equação da curva de glicose esta representada na equação 4 onde y é a absorvância em 540 nm e o coeficiente de correlação e de R = 0,99 demonstrando a relação de linearidade das concentrações da curva analítica na faixa de 10 a 100 mg L^{-1} (Apêndice E).

$$y = 7{,}71\ x \qquad R = 0{,}99 \quad \text{(eq .4)}$$

6.1.4 Características físico-químicas da água de parboilização e irrigação de arroz, safra 2008 e 2009

Nas amostras coletadas para este estudo os valores encontrados para nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, nitrato, nitrito, açucares redutores, açucares redutores totais, sólidos fixos, sólidos totais, sólidos voláteis, fósforo, ácidos voláteis, alcalinidade e pH, estão expressos nas Tabelas 12 a 16, sendo que os resultados foram tratados estatisticamente pelo Teste de Tuckey comparando os resultados das águas de parboilização de 2008 e 2009 tratadas e

não tratadas com fungicidas com um de um nível de confiança de 95% considerando as triplicatas de todas as determinações.

Tabela 12 - Características físico-químicas da água de parboilização de arroz, safra 2008 e 2009.

Análises	AP 2008 (mg L^{-1})	σ	APNT 2009 (mg L^{-1})	σ	APT 2009 (mg L^{-1})	σ
Sólidos Totais	500 ^{b}	(± 4, 243)	889^{a}	(± 0,577)	890 ^{a}	(± 0,408)
Sólidos fixos	100 ^{b}	(± 2,735)	368^{a}	(± 1,388)	368 ^{a}	(± 1,386)
Sólidos Voláteis	400 ^{b}	(± 1,388)	499 ^{a}	(± 1,224)	512 ^{a}	(± 1,171)
pH	4,46 ^{b}	(± 0, 016)	4,70 ^{b}	(± 0,138)	6,9 ^{a}	(± 0,004)
Alcalinidade	519 ^{a}	(± 0,008)	176 ^{b}	(± 0,142)	176 ^{b}	(± 0,163)
Ácidos voláteis	210 ^{c}	(± 0,032)	316 ^{b}	(± 0,004)	443 ^{a}	(± 0,081)
Fósforo	4,2 ^{c}	(± 0,057)	16,6 ^{a}	(± 0,069)	16 ^{b}	(± 0,326)
A. R	81^{b}	(± 0,408)	690 ^{a}	(± 0,081)	690 ^{a}	(± 0,163)
A.T.R	167 ^{b}	(± 0,775)	730 ^{a}	(± 0,405)	750 ^{a}	(± 0,200)
N- Total	4,06 ^{a}	(± 1,747)	2,3^{b}	(± 0,952)	1,4^{c}	(± 0,028)
N-NH_3	1,7 ^{b}	(± 0,222)	0,7^{a}	(± 0,019)	0,7^{a}	(± 0,095)
N- Org	2,3 ^{a}	(± 1,380)	1,6 ^{b}	(± 1,183)	0,7 ^{c}	(± 0,201)
Nitrito	1,40 ^{a}	(±0,003)	0,12 ^{b}	(± 0,001)	0,1^{b}	(± 0,001)
Nitrato	0,65^{a}	(±0,104)	0,06^{b}	(± 0,002)	0,02^{c}	(± 0,025)

N- Total = nitrogênio total; N NH_3= nitrogênio amoniacal; N- Org = nitrogênio orgânico; A.R= açucares redutores; A.T.R= açucares redutores totais AP 2008 = água de parboilização 2008; APNT 2009 = água de parboilização do grão não tratado com fungicida; APT 2009 = água de parboilização do grão tratado com fungicida; σ = Erro padrão. Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

A Tabela 12 demonstra que houve variação significativa quanto à concentração de nitrogênio total na água de parboilização, entre os anos de 2008, 2009 de campos tratados e não tratados com fungicida. Essa variação em relação aos valores de nitrogênio total, já era esperada, pois vários autores salientam que esta ocorre devido às perdas dos constituintes estruturais do arroz no processo de parboilização, onde o diferente controle das variáveis temperatura, tempo de maceração e autoclavagem acarretam na liberação ou não destes constituintes. (SUBRAMANIAN; DARSHINAMUTH, 1977; BUTTOW, 1984; GUTKOSKI,

1991; AMATO e SILVEIRA, 1991; AMATO, 2001). Os resultados também informam que houve diferença entre o volume de sólidos voláteis entre as amostras de 2008 e 2009.

Subramanian e Darshinamurth (1977) relataram que a operação de encharcamento prolongado ocasiona perdas de proteínas e carboidratos solúveis na água de maceração. Estes mesmos autores demonstraram que a perda de sólidos é maior quando a parboilização é realizada por um curto período de encharcamento, seguidos por longos períodos de cozimento, mas este não é o caso desta água analisada, pois ela só foi usada para encharcamento a 60 °C e no caso da amostra de 2008, o controle de temperatura e tempo foi realizado pela própria empresa fornecedora da amostra.

O teor de fósforo como $P\text{-}PO_4^3$, ácidos voláteis e açucares redutores totais na amostra de água de parboilização de 2008 foi menor que o encontrado nas amostras de 2009. Os resultados da Tabela 12 mostram que a quantidade de nitrito é superior a quantidade de nitrato presente na água AP 2009, o que pode ser um indicativo de baixo nível de oxigênio, ocasionado pela redução do íon nitrato presente, (denitrificação) possivelmente acelerada pela presença de micro-organismos que não foram inativados pela temperatura de encharcamento.

A heterogeneidade nas diferentes determinações que caracterizam as amostras dos efluentes de parboilização do arroz pode estar associada não só as diferenças da matéria prima, como também as variações nas etapas de processamento. De acordo com Amato e Silveira, (1991), a falta de homogeneidade da distribuição de temperatura de encharcamento resulta em uma maior lixiviação do grão e na variabilidade da migração de solutos.

Os resultados apresentados na Tabela 12 evidenciam que o efluente APT 2009 com exceção dos valores de sólidos totais se encontra dentro dos limites propostos pelo CONAMA para seu lançamento, pois apresenta pH na faixa de 6,9 enquadrando-se nas condições propostas em sua resolução que abrangem a faixa de pH entre 5 e 9 e o nível de nitrogênio amoniacal de 0,7 mg L^{-1} inferior ao limite máximo permitido que é 20 mg L^{-1}, enquanto as amostras da água de parboilização AP 2008 e APNT 2009, demonstraram valores de pH abaixo da faixa determinada na resolução podendo assim ocasionar impactos quando liberados ao meio ambiente.

Tabela 13- Características físico-químicas da água de irrigação de arroz, safra 2008.

Análises	AIT-2008 (mg L^{-1})	σ	AINT-2008 (mg L^{-1})	σ
Sólidos Totais	650 [a]	(± 2,041)	650 [a]	(± 2,514)
Sólidos fixos	227 [b]	(± 1,365)	416,6 [a]	(± 2,886)
Sólidos Voláteis	317 [a]	(± 2,735)	350 [a]	(± 1,363)
pH	6,7 [a]	(± 0,069)	7,3 [b]	(± 0,057)
Alcalinidade	288 [a]	(± 4,572)	183 [b]	(± 7,817)
Ácidos voláteis	239 [a]	(± 4,572)	283 [a]	(± 6,817)
Fósforo	5,29 [a]	(± 0,016)	4,09 [b]	(± 0,004)
A. R	Nd		Nd	
A. T. R	Nd		Nd	
N- Total	6,4 [a]	(± 0,277)	7,9 [a]	(± 0,605)
N- NH_3	Nd		Nd	
N- Org	Nd		Nd	
Nitrato	4,8 [a]	(± 0,008)	4,5 [b]	(± 0,087)
Nitrito	1,7 [a]	(±0,001)	0,64 [b]	(± 0,005)

N- Total = nitrogênio total; N NH_3= nitrogênio amoniacal; N- Org = nitrogênio orgânico; A.R= açucares redutores; A.T.R= açucares redutores totais; AIT-2008 = água de irrigação de campo tratado com fungicida (2008); AINT-2008= água de irrigação de campo não tratado com fungicida (2008); σ = Erro padrão; Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A partir da observação dos dados da Tabela 13 pode ser verificado aporte de material orgânico das águas de irrigação tratada e não tratada com fungicidas evidenciados pelo valor de sólidos voláteis presentes nas duas amostras. Também foi possível supor que a presença de micro-organismos na água era baixa, indicada pelos valores de nitrogênio amoniacal (NH_3) açucares redutores e redutores totais, abaixo do limite de detecção. A análise de variância mostrou que havia diferença significativa nos conteúdos de nitrato nas águas de 2008 de campos tratado e não tratado com pesticidas, este ânion pode estar associado ao uso de fertilizantes sugerindo neste caso que não havia uniformidade na aplicação ou terrenos que foram lixiviados de forma distinta. Os teores de fósforo também apresentam diferença, também podendo ser atribuídas aos mesmos fatores.

Os resultados obtidos na Tabela 13 demonstram que o pH, nitrogênio amoniacal, nitrato e nitrito encontram-se dentro dos limites propostos pelo CONAMA para águas utilizadas para a irrigação de culturas cerealíferas, já os valores de sólidos totais e fósforo encontram-se superiores

a faixa proposta, podendo ocasionar a proliferação de micro-organismos causando prejuízos ao produto final.

Tabela 14- Características físico-químicas da água de irrigação de arroz tratadas e não tratadas com fungicidas da safra de 2009 do período de dezembro

Análises	AM-2 (26/12) (mg L^{-1}) σ	ACI (26/12) (mg L^{-1}) σ	AIT-1 (26/12) (mg L^{-1}) σ	AINT-1 (26/12) (mg L^{-1}) σ	AIT-2 (26/12) (mg L^{-1}) σ	AINT-2 (28/12) (mg L^{-1}) σ	AINT-3 (26/12) (mg L^{-1}) σ
Sólidos Totais	700 ^{b} (±0,408)	531 ^{d} (±1,380)	650 ^{c} (±0,081)	680 ^{c} (± 0,575)	1501 ^{a}(±0,285)	190 ^{e} (±0,408)	800 ^{b}(±0,816)
Sólidos fixos	620 ^{b} (±8,165)	68 ^{d} (±0,694)	443 ^{c} (± 2,735)	470 ^{c} (± 2,875)	713 ^{a} (± 4,082)	91 ^{d}(±0,481)	603 ^{b}(±6,817)
Sólidos Voláteis	86,3 ^{d} (±1,384)	460 ^{b} (±1,390)	207 ^{c} (± 0,408)	213 ^{c} (±2,735)	780 ^{a} (±1,498)	92 ^{d} (±3,266)	193 ^{c} (±3,215)
pH	7,0 ^{b} (±0,089)	5,5 ^{c} (±0,012)	6,41 ^{d} (±0,106)	6,69 ^{b} (±0,012)	7,06 ^{b} (±0,061)	7,4 ^{a} (±0,122)	8,1 ^{a} (±0,069)
Alcalinidade	205 ^{c} (±5,989)	58,6 ^{e} (±0,024)	513 ^{b} (±0,009)	234 ^{c} (±0,057)	712 ^{a} (±0,069)	91 ^{d} (±0,093)	603 ^{b}(±0,314)
Ácidos voláteis	132 ^{c} (±0,489)	155 ^{c} (±0,275)	110 ^{d} (±0,179)	155 ^{c} (±0,040)	1501 ^{a} (±6,80)	190 ^{c} (±0,020)	800 ^{b}(±0,167)
Fósforo	0,2^{d} (±0,001)	2,1 ^{a} (±0,008)	0,1 ^{d} (±0,011)	0,7 ^{b} (±0,020)	0,4 ^{c} (±0,004)	0,1 ^{e} (±0,001)	1,0 ^{b} (±0,011)
A.R	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A.R.T	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
N- Total	2,2 ^{c} (± 0,028)	4,4 ^{a} (±0,056)	3,60^{ab}(±0,020)	3,3 ^{b} (±0,001)	4,3 ^{a} (±0,010)	3,2 ^{b} (±0,048)	2,9 ^{c} (±0,018)
N- NH_3	0, 3 ^{d} (±0,012)	1 ^{a} (±0,012)	0,6 ^{b} (±0,029)	0,3 ^{d} (±0,040)	0, 3^{d} (±0,012)	0, 4 ^{c} (±0,010)	0,44 ^{c} (±0,01)
N- Org	1,8 ^{c} (±0,057)	3,2 ^{ab} (±0,134)	3 ^{b} (±0,081)	3 ^{b} (±0,002)	4,0 ^{a} (0,051)	2,8 ^{b} (±0,004)	2,4 ^{bc} (±0,018)
Nitrato	0, 4 ^{a} (±0,004)	0, 5 ^{a} (±0,001)	0, 2 ^{b} (± 0,012)	0, 05^{d} (±0,001)	0, 1 $^{c\,d}$(±0,01)	0, 1 ^{c} (±0,001)	0, 03 ^{e} (±0,08)
Nitrito	0,2 ^{d} (±0,002)	0, 5 ^{d} (±0,002)	2,5 ^{b} (± 0,011)	1,8^{c} (± 0,009)	4,2 ^{a} (±0,012)	1,1 ^{c} (±0,002)	1,7^{c} (±0,057)

N- Total = nitrogênio total; N NH_3= nitrogênio amoniacal; N- Org = nitrogênio orgânico; A.R= açucares redutores; A.T.R= açucares redutores totais. AM-(26/12) = Amostra 2- 26/12; ACI-(26/12)= água proveniente do canal de irrigação (26/12); AIT-1 (26/12)= água de irrigação tratada com fungicida 1 (26/12); AINT-1(26/12)= água de irrigação de campo não tratada com fungicida -1; AIT-2(26/12)= água de irrigação tratada com fungicida -2(26/12); AINT-2 (28/12) = água de irrigação de campo não tratada com fungicida -2 (28/12/08); AINT-3 (26/12) = água de irrigação de campo não tratada com fungicida -3 (26/12/08); σ = Erro padrão; Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A partir dos resultados da análise estatística do teste de Tuckey demonstrados na Tabela 14 observa-se que houve variação de nitrogênio total, sólidos fixos e voláteis, nitrato e nitrito dos pontos AM (26/12), ACI (26/12), AIT-2 (26/12) e a AINT-2 (28/12) e ANIT-3 (26/12) que pode ter sido ocasionada por variáveis abióticas interferiram durante o cultivo, tais como volume de chuvas, vento e temperatura.

Os pontos AIT-2 (26/12), AINT-2 (28/12) e AINT-3 (26/12) mostram valores superiores de ácidos voláteis e nitrogênio orgânico que caracterizam a atividade de bactérias acidogênicas e metanogênicas na amostra, comprovado também pelas elevadas concentrações

de nitrito, que é produzido a partir da oxidação da amônia por bactérias nitrificantes em condições anaeróbias.

Os valores de sólidos totais com exceção do ponto AINT-2 (28/12) foram superiores a os propostos pelo CONAMA, que especificou que o valor máximo de sólidos totais em água de irrigação para culturas cerealíferas é de 500 mg L^{-1}. Os valores de pH com exceção dos pontos ACI (26/12), AIT (26/12) e AINT-1 (26/12) se adequaram a média da resolução proposta que abrangem a faixa de pH 6 a 9. Os valores de nitrito nos pontos nos pontos AIT-1(26/12), AINT-1(26/12), AIT-2 (26/12) e AINT-3 (26/12) são superiores aos propostos por esta legislação que estabelece como valor limite a concentração de nitrito de 1 mg L^{-1}. Os valores de nitrogênio amoniacal não ultrapassaram os limites propostos pela legislação.

Tabela 15 - Características físico-químicas da água de irrigação de arroz, tratadas com fungicidas da safra de 2009 do período de janeiro de 2009.

análises	AT-1 (6/01)		AT-2 (6/01)		AT-3 (6/01)		NT3 (6/01)	
	(mg L^{-1})	σ	(mg L^{-1})	σ	(mg L^{-1})	σ	(mg L^{-1})	σ
Sólidos Totais	142 ^{d}	(±1,335)	190 ^{c}	(±0,979)	383 ^{b}	(±2,735)	760 ^{a}	(±4,082)
Sólidos fixos	110 ^{c}	(±1,344)	60 ^{d}	(±4,082)	200 ^{b}	(± 1,363)	556 ^{a}	(±5,470)
Sólidos Voláteis	33 ^{d}	(±2,737)	130 ^{c}	(±0,979)	180 ^{b}	(±0,694)	216 ^{a}	(±5,715)
pH	7,11 ^{a}	(±0,091)	6,7^{b}	(±0,138)	7,4 ^{a}	(±0,151)	4,8^{c}	(±0,134)
Alcalinidade	205 ^{b}	(±0,061)	146 ^{c}	(±0,094)	219 ^{a}	(±0,028)	75,0 ^{d}	(±0,138)
Ácidos voláteis	332 ^{a}	(±0,367)	237 ^{c}	(±0,163)	284 ^{b}	(±0,073)	142 ^{d}	(±0,216)
Fósforo	0,4 ^{a}	(±0,001)	0,3 ^{b}	(±0,012)	0,2 ^{c}	(±0,002)	0,15 ^{d}	(±0,216)
A. R	Nd		Nd		Nd		Nd	
A.R.T	Nd		Nd		Nd		Nd	
N- Total	4,2^{a}	(±0,093)	4,10 ^{a}	(±0,028)	2,26 ^{b}	(±0,077)	4,7 ^{a}	(±0,016)
N-NH_3	0,3^{ab}	(±0,020)	0,2^{c}	(±0,029)	0, 2^{ab}	(±0,009)	0,3 ^{a}	(±0,028)
N- Org	3,9 ^{a}	(±0,009)	3,9 ^{a}	(±0,091)	2 ^{b}	(±0,010)	4,5 ^{a}	(±0,001)
Nitrato	0, 1 ^{d}	(±0,040)	0, 1 ^{c}	(±0,015)	0,1^{b}	(±0,010)	0,4 ^{a}	(±0,009)
Nitrito	1,4 ^{c}	(±0,005)	1,7 ^{b}	(±0,023)	1,7^{b}	(±0,013)	2,6 ^{a}	(±0,013)

N- Total = nitrogênio total; N NH_3= nitrogênio amoniacal; N- Org = nitrogênio orgânico; A.R= açucares redutores; A.T.R= açucares redutores totais; AT-1 água de irrigação tratada com fungicida 1 (6/01); AT-2 (6/01) água de irrigação tratada com fungicida -2 (6/01); NT3 (6/01) = água de irrigação tratada com fungicida 3; σ = Erro padrão; Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A Tabela 15 mostra uma diminuição do conteúdo de fósforo, ácidos voláteis e nitrogênio amoniacal nas amostras AT-1 (6/01), AT-2 (6/01) AT-3 (6/01) e NT3 (6/01) tendo em vista que estes parâmetros que servem como indicativos de contaminação microbiana indicando que o aporte de micro-organismos nas amostras analisadas é relativamente baixo.

Os valores de pH, nitrogênio amoniacal e nitrato encontram-se dentro dos parâmetros propostos na legislação em todos os pontos, no entanto o ponto NT-3 (6/01) apresenta-se com valor superior de sólidos propostos na legislação que é 500 mg L^{-1}. Os valores de nitrito foram superiores em todos os pontos ao limite proposto, 1 mg L^{-1}, que pode ser decorrente do uso de fertilizante nitrogenado empregado na cultura.

Tabela 16- Características físico-químicas da água de irrigação tratadas e não tratadas com fungicidas da safra de 2009 do período de março.

Análises	AIT-1 (11/03) mg L^{-1}	σ	AINT-1 (11/03) mgL^{-1}	σ	AIT-2 (11/03) mg L^{-1}	σ	AINT-2 (11/03) mgL^{-1}	σ	AIT-3 (11/03) mg L^{-1}	σ	AINT-3 (11/03) mgL^{-1}	σ
Sólidos Totais	800 ^{a}	(±0,571)	801 ^{a}	(±0,587)	370 ^{c}	(±1,247)	690 ^{b}	(±0,694)	766 ^{b}	(±1,363)	701 ^{b}	(±0,471)
Sólidos fixos	316 ^{c}	(±1,204)	306 ^{c}	(±5,470)	121 ^{d}	(±3,404)	517 ^{a}	(±1,363)	516 ^{a}	(±9,553)	410 ^{b}	(±3,470)
Sólidos Voláteis	500 ^{a}	(±3,674)	487 ^{a}	(±6,940)	233 ^{c}	(±2,857)	176 ^{d}	(±5,470)	293 ^{b}	(±2,735)	258 ^{b}	(±2,880)
pH	6,6 ^{a}	(±0,0571)	6,4 ^{b}	(±0,040)	6,7 ^{a}	(±0,040)	6,77 ^{a}	(±0,750)	6,3 ^{b}	(±0,122)	7 ^{a}	(±0,040)
Alcalinidade	29 ^{d}	(±0,001)	439 ^{a}	(±0,009)	161 ^{c}	(±0,204)	263 ^{b}	(±0,228)	176 ^{c}	(±0,125)	190 ^{c}	(±0,216)
Ácidos voláteis	31 ^{d}	(±0,122)	553 ^{a}	(±0,014)	474 ^{b}	(±0,122)	631 ^{a}	(±0,057)	316 ^{b}	(±0,816)	126 ^{c}	(±0,138)
Fósforo	0,05 ^{c}	(±0,004)	2,1 ^{a}	(±0,008)	0,1 ^{b}	(±0,001)	0,5 ^{b}	(±0,012)	1 ^{b}	(±0,123)	0,02 ^{c}	(±0,023)
A.R	Nd		Nd		Nd		Nd		Nd		Nd	
A.R.T	Nd		Nd		Nd		Nd		Nd		Nd	
N- Total	7,4 ^{a}	(± 0,097)	4,6 ^{b}	(±0,277)	4,9 ^{b}	(±0,032)	4,2 ^{b}	(±0,038)	3,7 ^{c}	(±0,124)	4,3 ^{b}	(±0,007)
N- NH_3	1,6 ^{a}	(±0,122)	1,9 ^{a}	(±0,161)	0,5 ^{b}	(±0,104)	0,5 ^{b}	(±0,028)	0, 6 ^{b}	(±0,282)	0, 2 ^{c}	(±0,092)
N- Org	5,7 ^{a}	(± 0,008)	2,6 ^{d}	(±0,002)	4,3 ^{b}	(±0,001)	3,5 ^{c}	(±0,003)	3,1 ^{c}	(±0,002)	4 ^{ab}	(±0,015)
Nitrato	0,3 ^{ab}	(±0,007)	0, 5 ^{a}	(±0,006)	0,05 ^{c}	(±0,001)	0, 25 ^{b}	(±0,003)	0, 05 ^{c}	(±0,003)	0, 06 ^{c}	(±0,031)
Nitrito	6,5 ^{b}	(±0,179)	1,9 ^{d}	(±0,054)	3,1 ^{c}	(±0,081)	3,6 ^{c}	(±0,001)	1,9 ^{d}	(±0,053)	9 ^{a}	(±0,017)

N- Total = nitrogênio total; N NH_3= nitrogênio amoniacal; N- Org = nitrogênio orgânico; A.R= açucares redutores; A.T.R= açucares redutores totais; AIT-1 (11/03) = água de irrigação de campo o tratado com fungicida-1 (11/03); AIT-2 (11/03) = água de irrigação de campo o tratada com fungicida-2 (11/03); AIT-3 (11/03) = água de irrigação de campo o tratada com fungicida-3(11/03) AINT-1 (11/03) água de irrigação não tratada com fungicida -1(11/03); AINT-2 (11/03) água de irrigação não tratada com fungicida-2; AINT-3 (11/03) água de irrigação não tratada com fungicida-3(11/03); σ = Erro padrão; Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O conteúdo de sólidos totais, fixos e voláteis, nos diferentes períodos e pontos de coleta da água de irrigação variou significativamente. Também houve variações de significativa de nitrogênio orgânico, este podendo ser derivado de matéria orgânica não decomposta. Houve variação significativa quanto à concentração de nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico nas amostras AINT-1 (11/03), AINT-2 (11/03) e AINT-3 (11/03) sugerindo provável presença de matéria orgânica não decomposta, também evidenciado pelo grande aporte de nitrito presente nas amostras.

Os valores de nitrato, nitrogênio amoniacal, pH, encontram-se na faixa abrangida pela legislação CONAMA, (2005). Os valores de sólidos totais encontram-se em níveis superiores com exceção somente do ponto AIT-2 (11/03). Os valores de nitrito mostram-se superiores ao valor permitido na legislação em todos os pontos de amostragem.

6.1.5 Estudo da migração de solutos para água de encharcamento do arroz

A Tabela 17 mostra os valores encontrados juntamente com o coeficiente de variação para nitrogênio Total, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, nitrato, nitrito, açucares redutores, açucares redutores totais, sólidos fixos, sólidos totais, sólidos voláteis, fósforo, ácidos voláteis, alcalinidade e pH, para o experimento que avaliou a migração dos solutos para água de encharcamento no período de 4 e 6 horas.

Não ocorrem grandes variações significativas quanto à concentração de nitrogênio total da água de encharcamento bem como os valores de nitrogênio amoniacal que também permaneceram praticamente iguais com o aumento do tempo de encharcamento. Foi observada a presença de nitrogênio orgânico demonstrando que o descarte deste efluente em corpos hídricos sem nenhum controle, poderia propiciar aumento de matéria orgânica no meio, visto que, o nitrogênio orgânico informa a quantia de materiais naturais como proteínas, peptídeos, ácidos nucléicos, uréia e inúmeros compostos sintéticos presentes.

Tabela 17 - Estudo da migração de solutos para água de encharcamento do arroz

Parâmetros	APB-4H (mg L^{-1})	CV(%)	APB-6H (mg L^{-1})	CV(%)
Sólidos Totais	660	(0,6)	736	(1,1)
Sólidos fixos	250	(0,3)	305	(0,8)
Sólidos Voláteis	415	(0,3)	431	(0,5)
pH	4,58	(1,0)	4,48	(1,0)
Alcalinidade	1099	(2,0)	879	(1,6)
Ácidos voláteis	1185	(1,0)	1185	(1,0)
Fósforo	11,6	(3,0)	11,8	(3,5)
A.R	75,3	(4,8)	89	(5,0)
A.R.T	106	(3,5)	135	(6,0)
N- Total	4,2	(10,2)	6,1	(5,9)
N- NH_3	0,7	(19,5)	0,8	(4,53)
N- Org	3,5	(10,3)	5,3	(6,1)
Nitrito	0,03	(0,5)	0,1	(7,0)
Nitrato	0, 14	(1,5)	0,2	(1,0)

N- Total = nitrogênio total; N NH_3= nitrogênio amoniacal; N- Org = nitrogênio orgânico; A.R= açucares redutores; A.T.R= açucares redutores totais; APB- 4H= água de parboilização realizada em bancada durante 4 horas; APB-6H = água de parboilização realizada em bancada durante 4 horas CV(%) = coeficiente de variação em porcentagem; σ = Erro padrão.

Os valores de sólidos totais correspondem a toda a matéria que permanece como resíduo após evaporação, os valores encontrados para esta análise estão acima dos valores propostos pelo CONAMA para o descarte cujo valor é de 500 mg L^{-1}. Os valores de sólidos totais fixos, em relação a sólidos totais voláteis apresentou variação entre os dois tempos de encharcamento evidenciando que o período de encharcamento influencia em seu aporte para o efluente, pois como é evidenciado na Tabela 17 os valores de sólidos totais, fixos e voláteis são maiores que no tempo de encharcamento de quatro horas.

Os valores de nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal encontram-se dentro dos valores propostos pela legislação CONAMA, com exceção dos valores de pH que esta abaixo da faixa abrangida pela legislação (5 a 9) para descarte de efluentes.

6.2 Caracterização micotoxicologica

6.2.1 As características das técnicas cromatográficas

Estabelecido o eluente para a separação cromatográfica das micotoxinas que seria composto por uma mistura de tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 60:40:10 (v/v/v) nestas condições foi estabelecidos o fator de retardamento (Rf) os limites de detecção e quantificação, linearidade das micotoxinas em cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) conforme a Tabela 18.

Tabela 18 - Características das técnicas cromatográficas

Micotoxina	Rf		Linearidade ng		LD ng		LQ ng	
	CCD	CCDAE	CCD	CCDAE	CCD	CCDAE	CCD	CCDAE
AFA B1	0,17	0,64	1,2-18,7	1,5-22	1,3	1,5	3,9	4,5
AFA B2	0,29	0,68	4,7-28	1,2-7	4,7	1,2	14	3,6
OTA	0,66	0,80	22-74	20-68	22	20	66	61
ZEA	0,708	0,90	153-306	26-383	153	26	230	77
DON	0,13	0,48	73-365	27-275	73	27	219	110

CCD = Cromatografia de Camada Delgada; CCDAE = Cromatografia de camada delgada de alta eficiência; Rf= fator de retardamento; LD= Limite de detecção; LQ= Limite de quantificação

Os indicativos de eficiência do procedimento cromatográfico mostraram que os limites de detecção e a linearidade são aplicáveis ao acompanhamento da etapa de preparação de amostras de água, e especificamente dos limites de quantificação encontrados, pois permitem a observação da legislação nacional e internacional para micotoxinas em outros tipos de matriz, visto que não estão disponíveis limites legais para amostras de água e bebidas em geral. Em estudos realizados autores como Garda *et al.*, (2004) encontraram os limites de detecção que foram determinados através de sucessivas diluições, tendo como resultado para a AFAs 4,0 ng e para ZEA 30 ng e para OTA 7 ng utilizado CCD e 30 ng para DON utilizando

cromatografia gasosa com detector de ionização em chama para determinação de micotoxinas em cerveja. Zambonin *et al.,* (2006) encontraram para vinho tinto artesanal limites de detecção de 0,25 ng de OTA utilizando cromatografia líquida com detector de fluorescência precedidas por uma etapa de Clean-up após realizar a extração, sendo que das 29 amostras de vinho duas apresentaram contaminação. Embora os limites de detecção para determinação de OTA por HPLC seguida por detecção por fluorescência, e DON por cromatografia gasosa sejam inferiores aos de CCD, é interessante realizar o levantamento utilizando CCD, pois este procedimento analítico é acessível e proporciona resultados rápidos disponibilizando assim informações para realização do controle ambiental levando em consideração o tipo de efluente proveniente especificadamente do processo, antes de seu retorno do meio ambiente e assim minimizando o impacto do aporte de micotoxinas nos recursos hídricos naturais.

6.2.2 Extração das micotoxinas da matriz

Os procedimentos de preparo de amostras estudados foram encontrados na literatura para extração de micotoxinas em grãos e bebidas fermentadas. (BADIALE-FURLONG, 1995; BARAJ, 2000; GARDA *et al.*,2004). As adaptações adotadas para a execução da extração e partição foram no sentido de adequar o procedimento experimental ao estado físico da matriz sempre mantendo a proporção entre os extratores e volume da amostra e tipo de interferentes.

Na Tabela 19 estão os resultados, expressos como porcentagem de recuperação e coeficiente de variação, dos testes de recuperação dos experimentos como média de três repetições.

O experimento 1 que constava de metanol: cloreto de potássio e amostra (9;1;1,7) mostrou-se ineficiente devido a sua grande variabilidade demonstrado pelo alto coeficiente de variação. O experimento 4 metanol: acetato de etila: amostra (4,2:1,8:1) não permitiu a recuperação de nenhuma micotoxina de interesse, ao passo que no experimento 5 (clorofórmio) os níveis de recuperação foram superiores a 70% para todas as micotoxinas, conforme as recomendações de adequacidade de metodologia (RIBANI *et al.*, 2004) e similares aos de Garda e Furlong (2004) para amostras de cerveja, isto se deve ao fato de que o clorofórmio é um solvente orgânico medianamente polar, com constante de dissociação próxima as micotoxinas empregadas no experimento, fazendo com que pela semelhança de polaridade sejam extraídas de

forma mais eficiente. No experimento 3 (metanol: acetato de etila :amostra (4,5:1,5:1) todas as micotoxinas foram extraídas porém apenas a ZEA e a AFA B_2 apresentaram recuperação próxima a 70%. O experimento 2 mostrou-se promissor apenas para extração de zearalenona.

Tabela 19 - Recuperação percentual de micotoxinas nos sistemas de partição e seus coeficientes de variação

Micotoxina	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5
AFA B_1	26,5 (143)	Nd	52,5 (9)	Nd	89 (14)
AFA B_2	33,4 (109)	Nd	69,3 (1)	Nd	96 (2)
OTA	27 (10)	Nd	39,7 (1)	Nd	89 (1)
ZEA	Nd	96,5 (4,5)	80 (14)	Nd	97 (2)
DON	Nd	6,7 (1)	60,5(1)	Nd	72 (2)

Nd: abaixo do limite de detecção ( ) : Coeficiente de variação em %

Autores como Pereira *et al.*, (2005) utilizaram também o experimento 5 (partição com clorofórmio) e mais dois métodos para purificação da amostra (cartucho Sílica Gel e colunas de Florisil) para extrair AFAs de amostras de leite bovino obtiveram recuperações que estavam entre 60 e 127% em que 58% destes valores estavam acima de 90%; 32% entre 71% e 90% e apenas 10% apresentavam valores menores ou iguais a 70% .

O resultado do estudo de Pereira é próximo ao encontrado neste trabalho, no entanto deve-se levar em consideração que a matriz (leite bovino) possui um número maior de interferentes, justificando a utilização de mais dois métodos de purificação para posterior determinação e quantificação de micotoxinas.

Os indicativos de eficiência do método evidenciaram a sua adequacidade conforme demonstrado pelos limites de detecção, quantificação, recuperação e linearidade indicados na Tabela 20:

Tabela 20. Características da técnica de partição líquido-líquido com clorofórmio em água de parboilização

Micotoxina	LD (ng mL^{-1})	LQ (ng mL^{-1})	Linearidade (ng mL^{-1})	Recuperação %
AFA B_1	1,6	4,3	4,3- 22,4	89,1
AFA B_2	5,6	17	17-34	95,8
OTA	26	79	26 -89	88,8
ZEA	184	276	276 - 366	97,4
DON	87,6	263	263 - 438	71,6

Rf = fator de retardamento, LD= Limite de detecção, LQ= Limite de quantificação do método

6.2.3 Aplicação dos procedimentos desenvolvidos

Ocorrência de micotoxinas em água da cadeia produtiva do arroz

No presente trabalho foi verificado que a amostra de água de parboilização de uma empresa local apresentou contaminação por AFA B_1 de (9,0 ng mL^{-1}) e DON de (110 ng mL^{-1}). A amostra de água de parboilização de arroz cultivado com fungicida na safra de 2009 do campo experimental do IRGA apresentou contaminação por DON de (110 ng mL^{-1}). A água de parboilização de arroz não tratada com fungicidas e as águas de irrigação não apresentaram contaminação por nenhuma das micotoxinas testadas.

6. 3. Estudo da migração de micotoxinas para água de encharcamento do arroz

A variação ampla nos tempos de encharcamento decorre do fluxo operacional das empresas e de que vários autores relatam a diferença ocasionada neste intervalo nos níveis de lixiviação de outros compostos químicos do efluente de parboilização. Isso pode ser comprovado mediante os resultados obtidos na Tabela 21.

Tabela 21- Migração de micotoxinas em dois níveis de fortificação e em dois tempos diferentes de encharcamento utilizando CCDAE

Micotoxinas	Fortificação em (µg g^{-1})	Recuperação			
		N1/ 4 horas	N1/ 6 horas	N2/ 4 horas	N2/ 6 horas
AFA B_1	0,17; 0,3	6%	6%	18 %	18 %
OTA	2,5; 4,9	12%	12%	24%	30%
ZEA	9,8; 19,6	Nd	28%	20%	36%
DON	12,3; 16,4	20%	28%	12%	18%

N1- Nivel 1 de contaminação (qto); N 2- Nível 2 de contaminação (qto) ; Nd- Não detectado

Os resultados expressos na Tabela 21 permitiram observar que ZEA, DON e OTA foram as micotoxinas que apresentaram maior migração para água seguido por AFA $B_{1.}$ Foi possível notar que tanto a OTA quanto a AFA B_1 são diretamente afetadas pelo nível de fortificação empregado. Para DON a influencia do tempo de encharcamento, é importante pois seu menor percentual de migração se deu no tempo de (4 h).

Dors *et al*., (2006) concluíram que aumentando o nível de fortificação da amostra com DON fez com que esta micotoxina permanecesse na casca com o aumento da concentração fato que explica o porque a migração no segundo nível de fortificação da amostra com DON obteve uma menor migração desta micotoxina para água. A permanência na casca pode ser atribuída a complexação com a sílica associada a celulose e a lignina. A forte afinidade de DON a sílica fica comprovada pelo seu baixo Rf (0,13) quando comparado a outras micotoxinas, quando se emprega a sílica como fase estacionaria e eluição com solvente mediamente polar.

Para ZEA foi constatado que o nível de fortificação e o tempo de encharcamento também afetam a migração desta micotoxina para água, pois maior percentual de migração se deu no segundo nível de fortificação no tempo de (6 h) de encharcamento. Isto sugere um processo de saturação com água com outros solutos do grão que são lixiviados. Os níveis de migração são baixos em função da afinidade das micotoxinas estudas ser baixas por solventes polares. No entanto, sugerem que o risco de acúmulo nos corpos hídricos é bastante provável e pode afetar a biota de mananciais resultando em outros tipos de danos na qualidade da água para as culturas, para uso industrial e humano.

Com relação aos demais solutos cuja migração foi avaliada neste trabalho o teor de sólidos fixos alcalinidade, nitrogênio total e orgânico foram os mais afetados pelo tempo de

encharcamento tendendo aumentar com este. Se considerado o perfil de migração de micotoxinas seria importante considerar suas interações com alguns solutos visto que DON e AFAs podem se adsorver na superfície de moléculas protéicas ou ter sua solubilidade alterada pelo meio (GARDA, 2002).

7. CONCLUSÃO:

Ficou demonstrado que o perfil de solutos difere em água de irrigação e parboilização e que o processo contribui para o aumento de todos os solutos avaliados conforme o esperado.

O estudo da migração de solutos para água de encharcamento comprova que o tempo influencia na migração de solutos, tendendo a aumentar na maioria dos casos com o aumento do tempo do processo, especialmente para os teores de sólidos solúveis, fósforo, nitrogênio total, carboidratos.

A partição com clorofórmio permitiu recuperar teores superiores a 70% das micotoxinas AFA B_1, AFA B_2, OTA, ZEA e DON presentes na água da cadeia produtiva do arroz.

Foi possível verificar o risco de lixiviação de micotoxinas para água de parboilização durante o processo de encharcamento, demonstrado pela presença de micotoxinas na água parboilização proveniente de empresa do setor e pelo estudo de bancada.

ZEA, DON e OTA foram as micotoxinas que obtiveram o maior percentual de migração demonstrando que o processo de migração de micotoxinas esta fortemente relacionado com o tempo de encharcamento e o nível de fortificação a qual o grão é submetido.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS:

- Monitoramento das caracteriscas físico-químicas das águas de parboilização e irrigação

- Abrangência de maior número de micotoxinas.

- Estudo da estabilidade das micotoxinas nas águas de parboilização e irrigação

- Correlacionar migração e estabilidade das micotoxinas ao processo de parboilização

TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos foram coletados separados em frascos e rotulados e estão aguardando o descarte fornecido pela instituição.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

AMATO, G.W.; SILVEIRA, S.F. Parboilização de arroz no Brasil. Porto Alegre **CIENTEC. Boletim técnico**, p.98, 1991

AMATO, G. W. Arroz parboilizado: tecnologia limpa, produto nobre**.** Porto Alegre: Ricardo Lenz, 2002.

AOAC. Association Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. 15° ed. Arlington: AOAC, 1990. p. 1185-1213, 2000.

Arroz Irrigado - Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil – V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado – 7 a 10/08/09 p 27.

ASTROVIZA, B. A.; SUÁREZ, S. M. Micotoxinas y Câncer. **Revista Cubana de investigação biomédica** v. 2 n° 4, p 54-59, 2005.

Ayers, R. S.; Westcot, D. W.. *Calidad del agua para la agricultura*. Estudio FAO Riego y Drenaje, n. 29, Roma, Itália: 85p, 1984

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 do arroz. Pelotas:Abrapós / UFPel** , 2005, 600p.

BADIALE- FURLONG, E.; SOARES, L. M. V. Gás Chromatographic method for quantification and confirmation of tricothecenes in wheat **Journal of the O.A.O.C International**, v.78, n. 2, p 386-390, 1995.

BADIALE- FURLONG, E. Roteiro de aulas práticas da disciplina Química e Analise de Alimentos, Departamento de Química, FURG, 1988.

BAPTISTA, S. A.; HORII, J.; BAPTISTA, S. A. Fatores físico-químicos e Biológicos ligado a produção de micotoxinas. Boletim CEPPA, v. 2 n° 1 p. 1-14, 2004.

BARAJ, E. Interferência dos tricotecenos no processo fermentativo. Dissertação (Mestrado de engenharia de alimentos) Universidade Federal do Rio Grande, 2000.

BASTOS, L.A. *et al*. Determinação de nitrato e nitrito em chás de peles de pescado empregados para o tratamento de asma Brônquica na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Química Nova.** v. 29, n° 5, 895-900, 2006.

BAUMGARTEN, M. G. Z.. Gravitimetria. **Manual de análises em oceanografia química**. FURG**,** 19-54. 1996.

BAYMAN, P. *et al*. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2.326-2.329, 2002.

BELLÍ. *et al.* Ochratoxin A producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship whit meteorological conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v.113 p.233-239, 2005

BENNETT, G. A; SHOTWELL, O. L. Criteria for fetermining purity of *fusaririum* mycotoxins. **Journal association of Official Analitical chemists**, v. 73 n° 2: p. 270-275, 1990.

BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v.16, n° 3, p. 497-516, 2003.

BIANCHINI, A. **Estudo comparativo entre manejos de secagem e armazenamento de arroz na incidência de fungos toxigênicos e micotoxinas.** Disssertação de mestrado apresentada ao programa de pós- graduação em Microbiologia Agricola e do meio ambiente, 103p 2003.

BOBBIO, F O; BOBBIO, P. A. **Química e o processamento de alimentos.** 3ª. ed., São Paulo, 2001.

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

BOTTALICO, A.; PERRONE, G. Toxigenic *Fusariurm* species and mycotoxins associated whith head bligtht in small-grain cerals in Europe. **European Journal of Plant Pathology.** v.108, p.611-624, 2004.

BRAGA, S; M. CARDOSO, M. A. A.; MACÊDO, R. O. Micotoxinas em produtos naturais; alguns aspectos e perspectivas. **Revista Brasileira de toxicologia,** São Paulo, v.15, n°.1, p.53-68, 2002.

CABAÑES, F. J *et al*. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius.* **Food Microbiology** v. 23 p. 634–640, 2006.

CALDAS E. D.; SILVA S. C.; OLIVEIRA J. N., Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health, **Revista Saúde Pública**, v 3, n° 63, p.319-323, 2002.

CALDAS, E. D.; SILVA S. C.; OLIVEIRA, J. N.; DEGERING, A. V. Contaminação por aflatoxina e ocratoxina A nos alimentos consumidos no distrito federal. **Revista saúde Distrito Federal**; n.9, p. 4929. 1998.

CALVETT, K. L. Análises de micotoxinas e microscopia de arroz integral, farinha de centeio e farelo de trigo em estabelecimentos em Florianópolis-SC **Boletim da sociedade Brasileira de ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas, v. 27, n° 1, p 40-40, 1993.

CAULCUTT, R.; BODDY, R. Statistic for analytical Chemists. London, Chapman and Hall (ed.), 1983.

CAZENAVE, S. O. S.; MIDIO, A. F. Zearalenona- micotoxina com atividade estrogênica presente em alimentos. Cadernos de nutrição, v.16, p. 1-13, 1998.

COELHO, C. S.; BADIALE-FURLONG, E.; ALMEIDA, T. L. Migração de micotoxinas durante o processo de praboilização do arroz. **Brazilian Journal Food technology,** v. 2, n°2 p. 43-50, Campinas-SP, 1999.

COLÉ, J., COS, R.H. The thrichothecenes. In:**Handbook of Topic Fungal Metabolites**. Academic Press, 1986.

COLLINS, C. H.; BRAGA L.G; BONATO. S. PIERINA. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da Unicamp, 456 p, 2006.

CONAB–**Produção e consumo de arroz no Brasil.** Disponível em: <sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap18.htm> acesso em jan 2010.

COLE, R.J. & COX, R.M. In: **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. New York: Academic Press, 937p, 198.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). *Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005.* Disponível em: <http:// **www.mma.gov.br/port/conama**/> . Acesso em: de jan 2010.

CREPPY, E.E. Update of survery, regulation and toxic effects of micotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.127, n° 1-3, p . 19-28, 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** v.42, p. 433-437, 2009.

DRUVERFORDS, U.A.; SCHNÜRER, J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of eheay grain. **Fems Yeast research**, 2004.

DUARTE-VOGEL, S.; VILLAMIL-JIMÉNEZ, L. C. Micotoxinas en la salud pública. **Revista Salud Pública** v.8 n°1 p.129-135, 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <http://www.embrapa.br> Acesso em: jan. 2010.

FAO-CX/FAC 03/35. Discussion paper on deoxynivalenol. **Codex Committee on Food Additives and Contaminants**, p. 1-12, 17-21, march, 2003.

FAO. Organização para Agricultura e Alimentação. Food and Nutrition Paper, Nº 64, Roma, 2008.

FERNANDES, F. C. Micotoxinas; Risco biológico para trabalhadores em aviários. **Revista Brasileira de Medicina do trabalho** v. 2, n °3 p. 200-208, 2004.

FERREIRA, H. *et al*. Aflatoxinas um risco a saúde humana e animal. Ambiência- Revista do centro de Ciências Agrárias e Ambientais, v. 2, n°1, p. 113-127, 2006.

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; Mercel Dekker, INC, v.3, cap. 2, p. 31-68. 1992.

FURLANI, R. P. Z.; OLIVEIRA, P. L. C.; SOARES L. M. V. Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cafés verdes e torrados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 87-98, 1999

FURLONG, E. B.; VIEIRA, A. P.; SOARES, L.A; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A em alimentos na Região sul do Rio grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, SÃO PAULO, SP, BRASIL, v. 58, n. 2, p. 27-33, 1999.

GARDA, J. **Micotoxinas em cervejas: Metodologia ocorrência e influência no processo fermentativo.** Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. 130p. 2002.

GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. ***Ciência e tecnologia de alimentos***, campinas, v 24, n°4, 657-663, 2004.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus paraziticus*: Aflatoxigenic fungi of concerm in foods and feeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n.12, p.1395-1404, 1995.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1993. p.183- 238

GUOZHEN, P.; QINGI, X.; MEI, F. Sequential Spectrophotometric Determination of Microgram Amounts of Nitrate and Nitrite in Mixtures. **Microhemical journal**, v.60, p. 258-265, 1998

GUTKOSKI, L. C.; ELIAS, M. C. Estudo da água de maceração de arroz a 60°C em diferentes condições de manejo. **Instituto Rio Grandense de arroz – IRGA: Lavoura Arrozeira**, v. 47, n° 414, p. 6-10, Porto Alegre – RS, 1994.

HAGLER, W. M. *et al.*. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? St. Paul: APS Press, p. 321-331, 2001.

HOELTZ, M. **Estudo da influencia de manejos pós- colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (oryza sativa L.)**, Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J.M. toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology,** n° 167, p. 101-134, 2001.

ICMSF- International Commission on microbiological sepecifications for Foods Microorganisms in foods, microorganisms in foods. Londres: Academec Press, 1996 p. 347-381.

IRGA. Instituto Rio Grandense do Arroz, disponível em< http://www.irga.com.br> acessado em Dez , 2009.

ISHERWOOD, K.F. **Fertilizer use and the enviroment**. Paris: IFA. 51p, 2000.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical caracterization of ochratoxin A – producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3.630-3.635, 2001.

LEIFERT, C. *et al*. Human health effects of nitrate. In IFA **AGRICULTURAL CONFERENCE ON MAGING PLANT NUTRION**; Towards maximum resource efficienency Barcelona. p1-12. 1999.

LERICA, J. L.; TORTOSA, E. Sancochado de aroces cultivados em Espana. Ver. De **Agroquimicay Tecnologia de Alimentos**, v.1, n° 1, p.42-57, 1977.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9.623-9.635, 2006.

LIMA, C. A. P. *et al.* Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice . Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 20, n°1 p. 37-39, 2000.

LIN. L ; ZHANG.J; WANG. P; WANG.Y, CHEN J. Thin- layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographc methods. Journal of chromatography A, 815 3-20 1998.

LOGRIECO. A, G.; MULÉ, A.; MORETTI and A. BOTTALICO; Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology** 108**:** 597–609, 2002.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Micotoxinas e micotoxicoses em suínos. Sociedade Vicente Pallotti 1° ed., Santa Maria v 1, 238p, 2007.

MANCL, K. M. Nitrate in drinking water: extension Bulletin n° 744-87, Disponivel em: < http://www.ag.ohio-sate.Edu/-ohioline/b744/ > acessado em dez. 2009.

MELLO, J. P. F.; MECDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal feed science technology**, v 78, p. 21-37; 1999.

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

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain:implications for stored product research, **J. Stored prod. Res**., v.31, n° 1, p. 1-16, 1995.

MILLER, J. D. et al. A. Deoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance: Ed. St. Paul, p. 31-319, Press, 2001

MOSS, M.O. Mycotoxin rewiew; *Aspegillus* and *Penicillium*. **Mycologist, Cambridg**, v.16, n° 3, p. 116-119, 2002.

MULLER. D. K.: HELSEL. D.R. Nutrientes in the nations water – To much of good thing? National Waters – Quality assessment program. Unidade states geological survey circular 1136. Disponível em: < http://water.usgs.gov/naweq/circ-1136/circ-1136 main html > acesso jun 2009.

NAKAJIMA, M. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brasil . Training course, 283p., 2001, Japão.

NEAL, G.E. Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. Rev med. Vet., v 149 n° 5 p. 555-560, 1998.

NUGENT, M.; KAMRIM, M. A.; WOLFSON, L.; D´ITRI, F. M. **Nitrate.** A Drinking water concern Michigam state university extention service, Extension Bulletin WQ-19 Disponivel em : < http://www.gem.msu.edu>. Acesso em 15. Out. 2009.

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

OSBORNE, B.G. Mycotoxins and the cerals industry. **Journal food technology**, v 17, p.1-9, 1982.

ONGLEY, E. D. Control of water pollution from agriculture: Documento eletrônico (FAO Irrigation and drainage paper,55). Disponível em < http://www.fao.org/docrep/w2598e/w259e 00.html > acesso em Dez de 2009.

OSWEILLER, G. D. **Toxicologia veterinaria**. São Paulo: ed. Artes Médicas , 1998. Cap. 29, p. 440-468.

PALLARONI, L.; VON HOLST, C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal Chromatography. Acta** , v. 993, n. 1-2, p. 39- 45, 2003.

PATKAR, K. L. Effects of spice oil treatment of rice on molding and mycotoxins contamination. **Crop Protection**, v.13 n° 7: 519-524 ; 1994.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxins research and health. **Research in Microbiology.** v.155, n° 7, p 507-513, 2004.

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

PEREIRA, M. M. G. *et al*.**Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais- Brasil**. Ciência Agrotecnologia., Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.

PESTKA, J. J. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.71 n°6, 1075- 1081, 1988.

PETTERSSON, H.; ABERG, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. **Food Control**, v.14, n° 4, p. 229-232, 2003.

PIER, A. C.; RICHARD, J. L.; CYSEWSKI, S. J. implications of mycotoxins in animal disease. Journal of the americam **Veterinary Medical Association**. v. 176, n8, p.719-724, 1980.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds- an updated revieiw. **Revue de Médicine Véteninaire**. Toluose, v.149, n.6, p.479-492, 1998.

PITT, J. I.; MISCAMBLE, B. F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. **J. Food Protect**., v. 58, n° 1, p. 86-90, 1994.

PLACINTA, C M .D; MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Review of worldwide contamination of cerela grais and animal feed with fusarium mycotoxins. **Animal Feed Science Technology,** v 78, p 21-37;1999.

PRADO, G.; NICÁCIO, M. A. S.; LARA, M. A. Incidência de aflatoxinas M_1 em leite cru e em pó no estado de Minas Gerais. **Higiene Alimentar**, v. 8, 32, p. 57-67, 1997.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R. Caracterização do efluente de parboilização do arroz. **Revista Brasileira de Agrociência.** V.3 n° 3 139-143, Set- Dez. 1997.

QUEIROZ, M. I *et al*. Avaliação da Eficiência de remoção de nutrientes do efluente da parboilização do arroz em função da razão C/N. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2002, Porto Alegre. XVIII **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2002.

QUEIROZ, M. I *et al*. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cianobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2163-2169, 2007.

RIBANI, M.*et al*. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova.** v 27, n° 5, p771-780. 2004.

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

SABINO, M.; PURCHIO, A.; ZORZETTO, M. A. P. Variations in the levels of aflatoxins in cows milk consumed in the site of São Paulo. **Food Additives and contaminants.** v.6, n° 3, p. 321-326, 1989.

SCOTT, P.M. Effects of Food Processing on Mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 47, n°. 6, p. 489-499, 1984.

SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; DALEY, E.F.; FABER, J.M. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography – mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n.° 4, p. 381-389, 1993.

SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n°. 4, p. 591-598, 1995.

SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. ° 4, p. 875-882, 1996.

SCOTT, P.M. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, v 14, n° 4, p. 333-339, 1997.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: insular, 1998, 144p

SHIER, W.T. Estrogenic Mycotoxins . **Revue méd vét**, v.149, n°.6, p. 599-604, 1998.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins,ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.,** v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SOLEAS, G.J.; YAN, J.; GOLDBERG, D.M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection**. Journal Agriculture Food Chemistry,** v. 49, n° 6, p. 2733-2740, 2001.

SUBRAMANIAN, V.; DAKSHINAMURTHY, A. Nutrient losses during parboiling. II Riso. v. 26, n° 4, p. 337-340, 1977.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTERWATER 19° ed.(2005).

SYLOS , C. M .; RODRIGUEZ –AMAYA, D.B.; CARVALHO, P.R.N. Ocurrence of aflatoxin M_1 in Milk and dairy produtcs commercialized in Campinas, Brasil. Food Additives and contaminants, v.13, n° 2, p.169-172, 1996.

SYLOS, C. M.; SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice; **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n° 2 p. 123-130, 2003.

SNYDER, A.P. Qualitative, Quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 49, n°7, p. 544-569, 1986.

SWEENEY, M.J.; DOBSON A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 175, n° 2, p. 149-163, 1999.

SYDENHAM, E & THIEL, P. G. Physicochemical Data from Some Selected Fusarium toxins. **Journal A.O.A.C. Intenational**, V, 79, n° 6, p. 365-1379, 1996.

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

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos**: ocorrência e detecção. Campinas. Núcleo de Microbiologia/ ITAI, 2001.82.p

TANGO, J. S. Aflatoxina. **Boletim do Instituto de tecnologia de alimentos**, Campinas, n°37, p.37-95, 1974.

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

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and fees; occurrence, legislation and inactivation by physical methods**. Food chemistry**, London , v.59, n°.1, p.57-67, 1997.

SILVA *et al.* Ocorrência de aflatoxinas em arroz consumido por militares do exercito brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia liquida de alta eficiência. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32 n° 4, p. 1238-1244, 2008.

WHEELER, K.A. et al. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of food Microbiology Amsterdam**, v.12 p.141-150, 1991

WOOD, G.E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. **Journal of Animal Science.** v. 70, n° 12, p. 3941-3949, 1992.

UENO, Y. Trichothecene mycotoxins. Mycologia**, chemistry and toxicology**. *In H. H. Draper* Ed., v. 3, p. 301-353, New York, 1980.

United States Department of Agriculture (USDA) Disponivel em**:** <http://www.usdabrazil.org.br/> Acesso em fev. 2010.

VALENTE SOARES, L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60 n° 1, 79-84, 2001.

YOSHIZAWA, T. **Mycotoxin analysis for federative republic of Brazil**. Trainning Course, p.283, 2001, Japão.

YU, J.; CLEVELAND,T.E .; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases **Revista Iberoamerica de Micologia** v. 22, p 194-202, 2005

ZAMBONIN, G.C; VATINNO, R. A. A PALMISANO, F. Determination of Ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography A, 1115 196–201, 2006

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Review - Trace mycotoxins analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography - atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1136:123-169, 2006.

APÊNDICE A- Os principais parâmetros da qualidade estabelecidos conforme RESOLUÇÃO CONAMA N° 357

Tabela 1 - Caracterização da qualidade de águas utilizadas para a irrigação de culturas cerealíferas conforme RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005

Propriedade	Características	Impactos
pH	Presença de ácidos carbônicos e humicos devido a despejos industriais e águas residuárias de minas. Os valores permitidos pela legislação abrangem a faixa de 6 a 9.	pH baixo pode ocorrer corrosão em tubulações
Nitrogênio total	Soma de nitrogênio orgânico e nitrogênio amoniacal.	
Nitrogênio amoniacal (NH_3)	Representa a decomposição do nitrogênio orgânico de origem animal. Indica contaminação recente por esgotos domésticos e efluentes. Os valores permitidos pela legislação abrangem a faixa de: Nitrogênio amoniacal total < 7,5 — 13,6 mgL^{-1} N para pH 7,5 < pH, ≤ 8,0 — 5,6 mgL^{-1} N para pH 8,0 < pH ≤ 8,5 — 2,2 mgL^{-1} N para pH 1,0 mgL^{-1} N para pH > 8,5	Proliferação microbiana
Nitrogênio orgânico	Presentes como proteínas, aminoácidos, aminas, amidos, nitro-derivados e outros. Provenientes de esgotos domésticos e efluentes em decomposição.	Proliferação microbiana
Fósforo	Nutriente para o crescimento e reprodução dos micro-organismos. Ocorrem sob várias formas orgânicas (proteínas) ou minerais (ortofosfatos e polifosfatos) Os valores permitidos pela legislação abrangem para fósforo total em ambiente lêntico 0,05 mg L^{-1} fósforo total (para ambientes intermediários com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lêntico). Valor Maximo de 0,075 mg L^{-1}. O fósforo total (ambiente lótico e tributados de ambientes intermediários) valor máximo de 0,15 mg L^{-1}.	
Alcalinidade total	Representa bicarbonatos, carbonatos, ácidos orgânicos, hidróxidos de metais alcalinos e alcalino terrosos provenientes de indústrias têxteis químicas lavanderias e curtumes.	Inibe a ação de micro-organismos presentes em processos biológicos de sistemas de tratamento. Dificulta a autodepuração dos cursos de água.

Sólidos	Dissolvidos em suspensão sedimentáveis e não sedimentais voláteis e fixos. Representa desgaste das rochas por intemperismo, lançamento de esgoto doméstico e despejos industriais em suspensão processos erosivos e desmatamentos, lançamentos de esgotos domésticos efluentes industriais dragagens para atividades de garimpo.	Alterações de sabor e problemas com corrosão em tubulações, problemas de salinização do solo. Os sólidos em suspensão aumentam a turbidez da água diminuindo a penetração da luz. Afeta a proliferação nos ecossistemas.
Ácidos voláteis	Atividade de bactérias acidogênicas e metanogênicas.	
Açúcar redutor	Efluente de indústria alimentícia	Indicativo de contaminação microbiana
Nitrito (NO_2^-)	Oxidação da amônia pela ação de bactérias nitrificantes em condições anaeróbias, indicando poluição recente. O valor permitido pela legislação é de 1,0 mg L^{-1}.	Precursor de agentes carcinogênicos e de metamioglobinemia.
Nitrato (NO_3^-)	Decomposição do nitrito pela ação de nitrobacterias. Natural em águas por dissolução de rochas por oxidação bacteriana de matéria orgânica de origem animal ou utilização de fertilizantes e do lançamento anterior de esgotos orgânicos. O valore permitido pela legislação é de 10 mg L^{-1}.	Concentrações acima de 20 mg L^{-1}. provocam eutrofização do corpo d´ água.

Fonte: CONAMA 2005 adaptado por FURLONG e LEITE, 2010

APÊNDICE B- Caracterização físico-química do efluente

Formas nitrogenadas

Nitrogênio Total

Os resultados da determinação de nitrogênio indicam o grau de estabilização da matéria nitrogenada em diferentes tipos amostras liquidas.

Os compostos nitrogenados totais da amostra foram convertidos em sulfato de amônio através de digestão sulfúrica, denominada nitrogênio total de Kjedahl. O procedimento adotado foi recomendado pelo Standart Methods, (2005). Para determinação e quantificação do nitrogênio trivalente (negativo) proveniente da fixação do nitrogênio orgânico e da amônia. Se a amônia for separada antes da digestão, somente o nitrogênio orgânico é avaliado.

Durante a digestão da amostra com ácido sulfúrico H_2SO_4, sulfato de cobre $CuSO_4$ e sulfato de potássio K_2SO_4, que atuam como catalisadores, a cadeia carbonada é oxidada e o nitrogênio convertido em sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$. Em meio alcalino e temperatura elevada ocorre à formação de bissulfato de amônio que é destilado por arraste a vapor é recolhido em ácido bórico e o borato formado determinado por neutralização com ácido padronizado.

Durante a digestão da amostra com ácido sulfúrico, verificam-se as seguintes trocas:

1) O excesso de água é expelido e o ácido sulfúrico oxida o material orgânico.
2) Quando o ácido sulfúrico atinge o ponto de ebulição há a produção de fumaça branca que marca o inicio da digestão.
3) A mistura se torna escura pela ação do ácido sulfúrico sobre a matéria orgânica.
4) As bolhas se desprendem devido à liberação de CO_2 e SO_3 decorrentes da oxidação da cadeia carbonada e de compostos sulfurados.
5) A completa oxidação da matéria orgânica é caracterizada pela produção de um o liquido claro.

O procedimento consistiu em:

- ✓ No tubo de digestão foi colocado um grama de catalisador (sulfato de cobre: sulfato de potássio 5g: 95g)
- ✓ 20 mL da amostra foram homogeneizadas e colocadas no tubo de digestão.
- ✓ Foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico p.a.
- ✓ Digerido por 1 hora e 30 minutos.
- ✓ O tubo de digestão foi acoplado ao destilador e, adicionado 15 mL de hidróxido de sódio 50% no balão de destilação para deslocar a bissulfato do sulfato de amônio. O destilado foi coletado em 25 mL de ácido bórico 4% até completar 100 mL.
- ✓ O destilado foi titulado com HCl 0,01N até a mudança de coloração de verde para rosa, com indicador misto.
- ✓ A estimativa de nitrogênio liberado foi feita conforme a equação 1.

$$\frac{(V\,g - V\,b) \times 1400 \times N_{HCl}}{Va} = mg\ L^{-1} \quad \text{(eq. 1)}$$

Onde:

Vg = Volume de ácido gasto na titulação

Vb= Volume do branco

Va= Volume da amostra

N_{HCl} = Normalidade do ácido Clorídrico

Nitrogênio amoniacal

Nitrogênio amoniacal, a fração de nitrogênio onde o íon amônio se encontra no equilíbrio

O nitrogênio amoniacal ou amônia está presente naturalmente nas águas superficiais e em efluentes, decorrente da deaminação de compostos orgânicos contendo nitrogênio ou pela hidrolise de uréia.

A determinação consiste em destilar a amostra líquida sem digestão, em pH alcalino, fixando o vapor em ácido bórico 4%. A concentração é estimada por titulação com HCl padrão em presença de indicador misto Standard Methods, (2005).

O procedimento consistiu em:

- ✓ Colocar 20 mL da amostra liquida em um balão de destilação com três gotas de fenolftaleína.
- ✓ Acrescidos de 15 mL de hidróxido de sódio 50% ao balão de destilação
- ✓ O processo de destilação foi iniciado e o destilado foi coletado em 25 mL de ácido bórico 4% ate completar 100 mL
- ✓ O destilado foi titulado com HCl 0,01N até a mudança de coloração do indicador verde para rosa, utilizando indicador misto.
- ✓ O conteúdo de nitrogênio amoniacal foi estimado pela equação 1.

Nitrogênio orgânico

Nos efluentes, o nitrogênio orgânico esta na forma de proteína ou seu produto de degradação porque são lixiviados de materiais naturais liberando proteína, peptídeos, ácidos nucléicos e uréia, inúmeros compostos orgânicos sintéticos empregados em processos industriais.

Esta forma de nitrogênio é estimada pela diferença entre o nitrogênio total e ao nitrogênio amoniacal Standard Methods, (2005).

Nitrato (NO^-_3) e Nitrito (NO^-_2)

O nitrito, e o nitrato, constituem o nitrogênio total oxidado. O nitrogênio sob a forma de nitrito pode decorrer da redução de nitrato, mas freqüentemente são produtos de oxidação incompleta do nitrogênio orgânico, proteína para nitrato ou produto de redução do nitrato (BAUMGARTEN *et al*., 1996).

A presença de nitrato na água é uma indicação da última etapa da oxidação da matéria nitrogenada, visto que o nitrato é a forma oxidada mais estável do nitrogênio em solução aquosa. Ele pode ser regenerado por via bacteriana (nitrificação) a partir do nitrogênio orgânico. A produção deste íon resulta da oxidação bacteriana do amônio tendo NO_2^- como intermediário.

No ciclo do nitrogênio, os íons nitritos representam o estado de oxidação intermediário entre o amônio e o nitrato. Em fracas concentrações de oxigênio, pode haver redução do nitrato (denitrificação) elevando as concentrações de nitrito **(**MUELLER ; HELSEM, 2001).

O método adotado para determinação de nitrato e nitrito foi descrito por Bastos *et al*.,(2006) e está baseado na nitração de compostos aromáticos como ρ-nitroanilina, α-naftilamina e fenóis polibásicos como resorcinol, em meio ácido com auxilio do surfactante cloreto de cetiltrimetiamônio (CTMAB) para aumentar a sensibilidade do método.

O procedimento pode ser utilizado para determinação de nitrito e nitrato separadamente ou seqüencialmente os dois ânions. O efeito de interferentes como Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{2+}, I^-, PO_4^{3-}, podem causar erro de apenas ± 5%. A determinação dispensa a redução do nitrato a nitrito e a absorbância é lida na região do visível (510 a 514 nm). A vantagem do método é dispensar o uso de colunas de cádmio para separa íons nitrato e nitrito Bastos *et al.*, (2005).

O procedimento consistiu em preparar uma curva padrão de nitrato a partir de uma solução padrão de nitrato de potássio contendo 148 µg mL^{-1} de NO_3^- (0,2415 g L^{-1} de nitrato de potássio seco em estufa por uma hora a 100 °C). Desta solução foram retidas alíquotas de 50, 80, 100, 150, 200 e 230 µL para balões volumétricos de 25 mL aos quais foram adicionados 0,5 mL de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}; 0,6 mL resorcionol 2% (m/v) e 6,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos, os volumes dos balões foram completados com água e as transmitâncias das soluções foram determinadas a 505 nm, após os valores das transmitâncias foram convertidas em absorvâncias para obtenção da curva e sua respectiva equação.

Para determinação de nitrato nas amostras foram utilizados 25 mL de cada uma delas as quais foram adicionados; 1mL de ácido clorídrico 2 mol L^{-1}; 1,2 mL de resorcionol e 13 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos as misturas foram diluídas com água a 50 mL e as transmitâncias lidas em 505nm.

Para determinação de nitrito foi preparada uma solução padrão de nitrito de sódio contendo 1g L^{-1} do sal previamente seco em estufa durante uma hora. Foram retiradas alíquotas de 25, 50, 100, 200, 250 e 300 µL para balões volumétricos de 50 mL. Foram adicionados 1mL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1}; 6 mL de ρ-nitroanilina 10mM em ácido clorídrico 2 mol L^{-1}; após 15 min 4 mL de α-naftilamina 10mM em ácido clorídrico 1 mol L^{1}, após 5 min 10 mL de solução de 0,05 mol L^{-1}de brometo de cetiltrimetilamônio (CTMAB). Os volumes nos balões foram completados com água, agitados e as transmitâncias medidas a 530 nm. Para determinação de nitrito nas amostras foram utilizados 25 mL delas, 1 mL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1}, 6 mL de ρ-nitroanilina, apos 15 minutos 4 mL de α-naftilamina e após 5 minutos 10 mL de CTMAB. As amostras formam agitadas, avolumadas com água a 50 mL e as transmitâncias medidas em 530 nm. A estimativa da concentração foi feita a partir da interpolação com a equação da reta decorrente da relação concentração de padrão e sua absorvância.

Validação do método para determinação para nitrato e nitrito em amostras de água.

O limite de detecção do método foi testado segundo a metodologia descrita por Caulcutt e Boddy, (1983), e consistiu na leitura de seis amostras da prova em branco preparadas com o mesmo procedimento das determinações normais de íons nitrato e nitrito. Após as leituras das provas em branco foi calculado o desvio padrão das absorvâncias e multiplicado por três. Este foi levado à curva padrão onde se estimou a concentração mínima para a detecção.

Os procedimentos para determinação de nitrato e nitrito otimizado foi executado para determinar os indicativos de eficiência, e a recuperação, que consistiu em adicionar em 3 níveis de padrões de KNO_3 e $NaNO_2$. A recuperação do íon nitrato foi realizada adicionando 6, 12 e 18 mg do padrão de KNO_3 148 µg mL^{-1} a três amostras de água destilada, seguindo-se posteriormente o procedimento para determinação espectrofotométrica a 505 nm. A

recuperação do íon nitrito realizou-se adicionado 40, 80 e 120 mg do padrão $NaNO_2$ 1 g L^{-1} a três amostras de água destilada. Os procedimentos colorimétricos foram realizados e a transmitância lida em 530 nm.

Determinação de sólidos

Os sólidos nas águas correspondem a toda matéria que permanece como resíduo, após evaporação, secagem ou calcinação da amostra a uma temperatura pré-estabelecida durante um tempo fixado. Em linhas gerais, as operações de secagem e calcinação são as que definem as diversas frações de sólidos presentes na água (sólidos totais, fixos e voláteis). Os métodos empregados para a determinação de sólidos são gravimétricos.

A diferença de sólidos totais, em relação a sólidos totais fixos resulta na estimativa de sólidos totais voláteis. A grande maioria dos sólidos totais voláteis provem de material orgânico (biodegradável e não biodegradável) e a grande maioria dos sólidos totais fixos de matéria mineral Standard Methods, (2005).

Sólidos Totais (ST):

Resíduo que resta na cápsula após a evaporação em banho-maria de uma porção de amostra e sua posterior secagem em estufa a 130 °C até peso constante. Também denominado resíduo total. Esta determinação permite estimar a quantidade de material sólido presente na amostra incluindo todos os sólidos dissolvidos e em suspensão. Standard Methods, (2005).

O procedimento consistiu em:

- ✓ Calcinar as capsulas de porcelana de 30 mL em mufla a 550 °C e tarar.
- ✓ Adicionar 10 mL da amostra e evaporar o líquido em banho-maria.

- ✓ Secagem em estufa em 130 °C até peso constante.

Para estimar os sólidos totais foi empregada a equação 2 abaixo expressa em (mg L^{-1}).

$$\frac{(MR - MS) \times 1000}{VA\ (mL)} = mg\ L^{-1} \quad (eq.\ 2)$$

Onde:

MS= Massa da amostra seca em mg

MR= Massa do recipiente em mg.

VA = Volume da amostra em mL

Sólidos fixos e voláteis

Sólidos fixos (SF): Corresponde à porção dos sólidos (totais, suspensos ou dissolvidos) que resta após a ignição ou calcinação a 550 °C após duas horas (para sólidos totais ou dissolvidos fixos) em mufla. Também denominado resíduo fixo.

Sólidos Voláteis (SV): É a porção dos sólidos (sólidos totais) que se perde após a ignição ou calcinação da amostra a 550 °C, durante duas horas para sólidos totais, em mufla. Também denominado resíduo volátil.

A determinação permite avaliar os sólidos contidos em solução verdadeira e os em estado coloidal através de procedimento gravimétrico que consistiu em:

- ✓ Calcinar as capsulas de porcelana de 30 mL a 550 °C em mufla e tarar.
- ✓ Adicionar 10 mL da amostra e evaporar o líquido em banho-maria
- ✓ Em seguida foram levados em estufa em 130 °C até peso constante
- ✓ Tomado o peso os cadinhos foram levados em mufla até peso constante e os sólidos fixos foram estimados segundo a equação 3 expressa abaixo em (mg L^{-1})

$$\frac{(MC - MR) \times 1000}{VA\ (mL)} = mg\ L^{-1} \quad (eq.3)$$

Onde:

MC= Massa da cinza + massa do recipiente em mg
MR = Massa do recipiente em mg
VA = Volume da amostra em mL

Sólidos Totais - Sólidos Totais Fixos = Sólidos Totais Voláteis (mg L^{-1}) (eq. 4)

Fósforo

Altas concentrações de fósforo indicam fontes antropogênicas e desencadeiam processos de eutrofização até florações indesejáveis, quando há aumento de fosfato no ambiente com boa disponibilidade de nutrientes nitrogenados. O método adotado neste trabalho dosou o fósforo sob as suas formas de íons ortofosfatos, que reagiram com molibitado de amônio em meio ácido, formando o complexo azul, cuja absorção máxima é em 780 nm. Essa redução é catalisada pelo tartarato de antimônio e potássio. (MURPY e RILEY, 1962).

Foi preparada uma solução padrão de fosfato de potássio dibásico anidro contendo 573 µmol seco em estufa durante 1 hora a 100 °C. As alíquotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL foram transferidas para balões de 50 mL, onde foram adicionados 8 mL do regente misturado e completado com volume de água. As amostras foram transferidas para um local escuro, onde ficaram cerca de 10 minutos e as leitura das absorvâncias foram realizadas em 780 nm.

Validação do método para determinação de fósforo em amostras de água.

O limite de detecção do método foi testado segundo a metodologia descrita por Caulcutt e Boddy (1983), que consistiu na leitura de seis amostras da prova em branco preparadas com o mesmo procedimento das determinações normais de íons fosfato. Após as leituras das provas em branco foi calculado o desvio padrão das absorvâncias e multiplicado

por três. Este foi levado à curva padrão onde se estimou a concentração mínima para a detecção.

Os procedimentos para determinação de fosfato otimizado foi executado para determinar os indicativos de eficiência, a recuperação, segundo a metodologia descrita por Caulcutt e Boddy (1983), que consistiu em adicionar em 3 níveis de padrões de PO_4^{-3}. A recuperação do íon fósforo foi realizada adicionando 2,5; 4,8 e 9,6 mg do padrão de KH_2PO_4 573 µmol a três amostras de água destilada, seguindo-se posteriormente o procedimento para determinação espectrofotométrica a 780 nm.

Outras determinações

pH

É a medida da concentração de íons H^+ na amostra. O balanço dos íons hidrogênio e hidróxido (OH^-) determinam potencial de acidez ou basicidade do mesmo. Os principais fatores que determinam o pH de amostras liquidas são o gás carbônico dissolvido e a alcalinidade.

O pH foi avaliado potenciomentricamente mediante o uso de um potenciômetro digital HANNA® acoplado ao eletrodo duplo combinado.

Alcalinidade

Alcalinidade é definida como a capacidade de uma alíquota de amostra consumir ácido, o que é devida à presença principalmente de bicarbonato, decorrente da ação do dióxido de carbono sobre minerais do solo, pelos carbonatos e hidróxidos, os boratos, silicatos e fosfatos.

A alcalinidade foi medida volumetricamente pela titulação da amostra com acido sulfúrico. Nesta determinação, ponto final foi dado pelo pH, o qual corresponde a

concentração de CO_2. Esta concentração depende do tipo de carbonatos presentes na amostra Standard Methods,(2005).

A determinação consistiu em:

- ✓ Tomar uma alíquota de 25 mL da amostra e titular com ácido sulfúrico (0,01N) ate pH 4,3
- ✓ Continuar a titulação até pH 3,0
- ✓ Adicionar perolas de vidro e levar a ebulição por cinco minutos

A estimativa da alcalinidade expressa em mg L^{-1} foi feita segundo a equação 5 abaixo.

$$\frac{V\,g\,(p/pH\ 4{,}3)\ x\ NH_2SO_4}{VA} = mg\ L^{-1} \quad (eq.\ 5)$$

Onde:

Vg = Volume de ácido gasto na titulação
VA= Volume de amostra
N H_2SO_4= Normalidade do ácido sulfúrico

Ácidos Voláteis Totais

Os ácidos voláteis indicam a atividade de bactérias acidogênicas e metanogênicas, (BEAL.,1995).

Podem ser estimados por determinação titrimetria, consistindo na titulação dos ácidos voláteis com uma base forte, proposta pelo STANDARD METHODS (2005).

A determinação consistiu em:

- ✓ Tomar de 25 mL de efluente
- ✓ Titular com solução de hidróxido de sódio 0,01 N até (pH 4,0).
- ✓ Continuar a titulação até pH 7,0.
- ✓ Anotar o volume gasto

$$\frac{Vg\ (p/pH\ 7,0) - Vg\ (p/pH\ 4,0)\ X\ N_{NaOH}}{VA} = mg\ L^{-1} \quad (eq.\ 6)$$

Onde:

Vg = Volume de base gasto na titulação

VA= Volume de amostra

N_{NaOH} = Normalidade do Hidróxido de sódio

Açúcares redutores e redutores totais

Os açúcares totais foram determinados utilizando o reagente 3,5 dinitrossalicilico, que pode ser reduzido estequiometricamente a 3-amino-5-nitrossalicico pelo grupo aldeído do açúcar redutor que aparece oxidado como carboxila. Para determinar os açucares redutores totais a amostra foi hidrolizada em meio ácido fraco e após neutralização colocada para reagir com o 3,5 DNS.

- ✓ O procedimento consistiu em preparar uma curva padrão de glicose onde foram retiradas alíquotas de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mL de solução de padrão glicose 1%.
- ✓ Os volumes foram completados para 1 mL de água destilada aos quais foram adicionados 1mL do reagente 3,5 DNS.
- ✓ A mistura foi aquecida a 100 °C por 5 minutos e em seguida resfriada
- ✓ O volume foi completado a 10 mL com água destilada e a absorvância lida em 546

nm.

- ✓ Para determinação de açucares redutores totais foi transferido 1 mL da amostra ao qual foi adicionado 1mL de HCl 2 N (também ao branco) e levar em banho Maria a 100 °C por 30 min. A hidrólise foi interrompida com 1mL de NaOH 2N. Os açucares redutores foram determinados em uma alíquota de 1 mL que não sofreu hidrólise.
- ✓ A alíquota hidrolisada e a não hidrolisada foram submetidas ao mesmo tratamento dado a solução de glicose padrão, ou seja, adicionar 1 mL da solução de 3,5-DNS a todos os tubos incluindo uma prova em branco. Os tubos de ensaio foram aquecidos em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e resfriados. O volume foi completado a 10 mL com água destilada, e as absorvâncias das amostras analíticas determinadas em espectrofotômetro em 546 nm.

APENDICE C - Método Tanaka adaptado LCA (2001)

Consistiu em:

- ✓ Pesar 10g da amostra em Erlemeyer de 250 mL e adicionar 100 mL de uma mistura dos solventes acetonitrila: água na proporção de (3:1).
- ✓ A mistura foi agitada em shaker por 30 minutos e (200 rpm a 25 °C)
- ✓ Desengordurada com 10 mL de hexano em funil de separação, e a fase inferior acetonitrila: água foi retirada para um erlemeyer adicionando 1 grama de cloreto de sódio para facilitar a separação desta mistura (acetonitrila:água).
- ✓ A fase superior acetonitrila foi evaporada a 45 °C sob pressão reduzida em evaporador rotativo.
- ✓ O resíduo foi dissolvido com 3 mL de metanol, em banho ultra-sônico e transferido para um tubo de centrifuga seguido de adição de 27 mL de clorofórmio.
- ✓ Após a centrifugação a fase orgânica foi dividida em três porções de 10 mL, colocados em recipientes âmbar e secas sob corrente de nitrogênio, e após foi efetuada a sua resuspensão em 200 mL de benzeno.
- ✓ Os resíduos foram submetidos à triagem por CCDAE

APÊNDICE D - Concentrações empregadas pelas curvas padrão de nitrato, nitrito, fósforo como fosfato e suas absorvâncias médias

Tabela 1 - Relação entre concentração de nitrato e absorvância do seu cromóforo

Nitrato [mg L^{-1}]	Abs NO^-_3
0,3	0,07
0,5	0,12
0,6	0,16
0,9	0,29
1,2	0,32

Absorvância corrigida pela absorvância do branco

Tabela 2 – Relação entre concentração de nitrito e absorvância do seu cromóforo

Nitrito [mg L^{-1}]	Abs NO^-_2
25	0,07
50	0,16
100	0,18
200	0,49
250	0,55
300	0,63

Absorvância corrigida pela absorvância do branco

Tabela 3 – Relação entre concentração de fósforo e absorvância do seu cromóforo

Fosfato [mg L^{-1}]	Abs PO_4^{-3}
1,08	0,09
2,1	0,24
3,2	0,36
4,3	0,47
5,4	0,57
6,5	0,67

Absorvância corrigida pela absorvância do branco

Representação da recuperação do método empregado para determinação de nitrato e nitrito e fósforo como fosfato

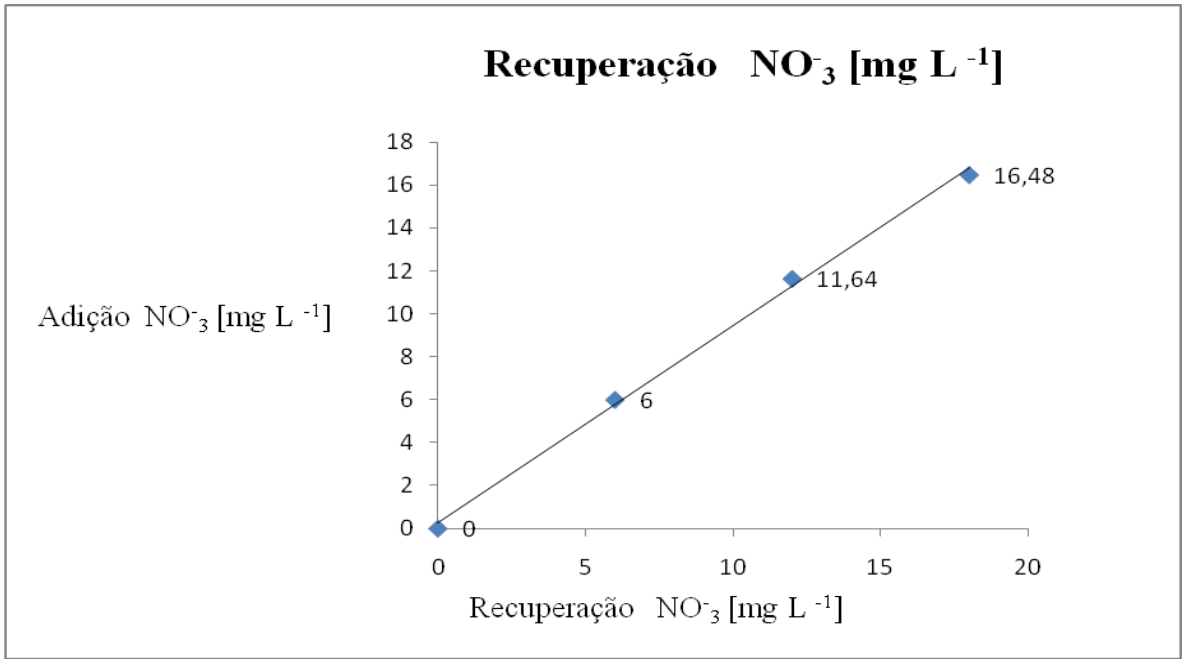


Figura 5- Representação da recuperação do método adaptado para determinação de nitrato

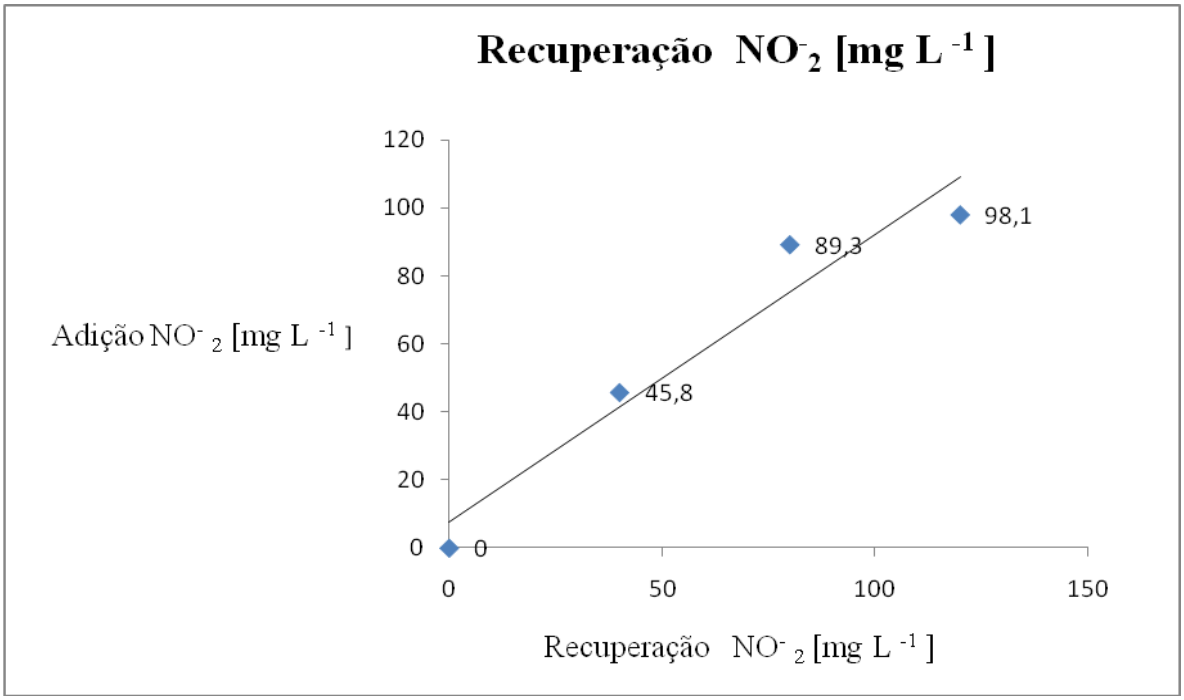


Figura 6- Representação da recuperação do método adaptado para determinação de nitrito

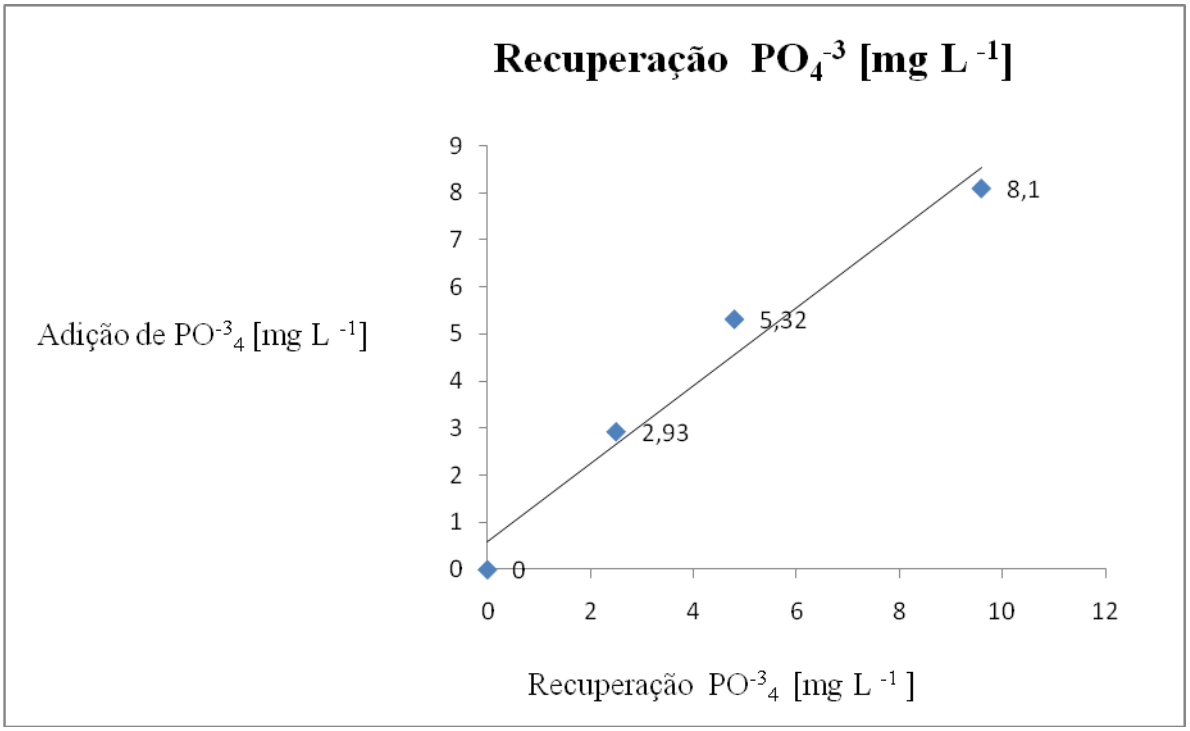


Figura 7 - Representação da recuperação do método adaptado para determinação de fósforo como fosfato

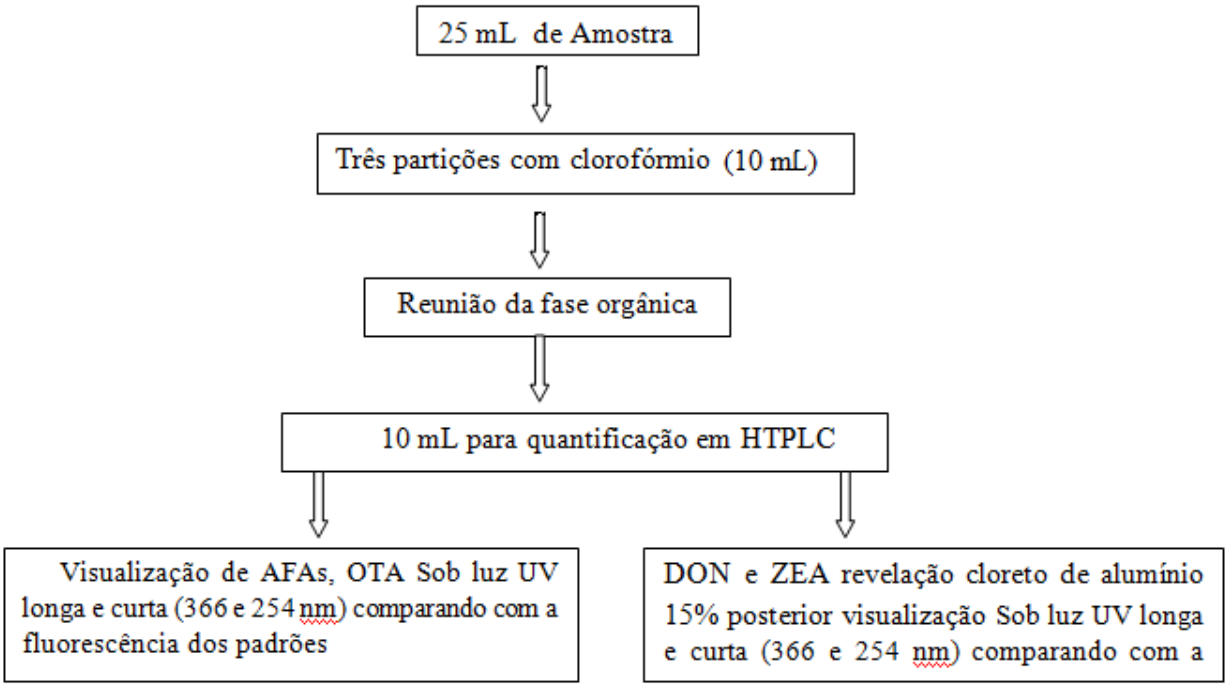
APÊNDICE E – Concentrações empregadas pelas curvas padrão de glicose e suas respectivas absorvâncias.

Tabela 1 – Relação entre concentração de glicose e absorvância do seu cromóforo

Concentração (mg mL^{-1})	Abs Corrigida
0	0
0,01	0,04
0,02	0,14
0,03	0,25
0,04	0,33
0,05	0,42
0,06	0,48
0,07	0,57
0,08	0,61
0,09	0,67
0,1	0,72

Absorvância corrigida pela absorvância do branco

APENDICE F- Esquema do método empregado para extração de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz



ANEXOS 1

PRODUÇÃO CIENTIFICA REFERENTE AO TRABALHO

LEITE, C.C, BADIALE- FURLONG. E. **Situação Micotoxicologica de água de parboilização do arroz na Região Sul do Rio Grande do Sul**. In: X Encontro de Pós graduação – FURG 2008

LEITE, C.C, HACKBART, S.C, PAGNUSSAT, A. F, BADIALE-FURLONG. **Efeito da granulometria na extração da ocratoxina A e citrinina em arroz** – SIAL – UPF 2009.

LEITE, C.C, GODOIS, S.C, GARDA-BUFFON. J, BADIALE- FURLONG. E. **Avaliação de técnicas de partição para determinação simultânea de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz**. In: Congresso Brasileiro de Química – Porto Alegre 2009.

LEITE, C.C, GODOIS, S.C, GARDA-BUFFON. J, BADIALE- FURLONG. E **Ocorrência de micotoxinas em água de parboilização do arroz.** In: XVI Encontro de Química da Região Sul-Desafios da Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande e SBQ- Secretarias Regionais de RS, SC e PR.

LEITE, C.C, GODOIS, S.C, GARDA-BUFFON. J, BADIALE- FURLONG. E Migração de solutos para água de encharcamento durante a parboilização do arroz . In XI Encontro de Pós graduação – FURG 2009.