



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

TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E A BIOACESSIBILIDADE DE AFLATOXINAS  
B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub> EM ARROZ

MARINA NOGUEIRA DA SILVA

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

RIO GRANDE, RS

2018



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

TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E A BIOACESSIBILIDADE DE AFLATOXINAS  
B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub>

MARINA NOGUEIRA DA SILVA

Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para  
obtenção do título de mestre em  
Engenharia e Ciência de  
Alimentos.

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

RIO GRANDE, RS

2018

Ficha catalográfica

S586t Silva, Marina Nogueira da.  
Tratamento hidrotérmico e a bioacessibilidade de aflatoxinas B<sub>1</sub>,  
B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em arroz / Marina Nogueira da Silva. – 2018.  
76 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos,  
Rio Grande/RS, 2018.

Orientadora: Dra. Eliana Badiale Furlong.

1. Arroz 2. Amido 3. Micotoxinas 4. Bioacessibilidade  
5. Tratamento hidrotérmico I. Furlong, Eliana Badiale II. Título.

CDU 664

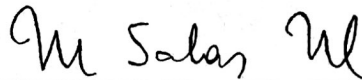
## APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Marina Nogueira da Silva e aprovada em 27 de fevereiro de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



---

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong - FURG



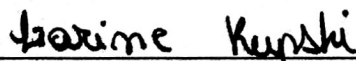
---

Profa. Dra. Myriam de Las Mercedes Salas Melado - FURG



---

Profa. Dra. Giniani Carla Dors - UFPel



---

Dra. Larine Kupski - FURG



*Aos meus pais Soninha e Raimundo e ao meu amor Luís Fernando, com amor dedico.*





## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me permitir sentir sua presença guiando os meus passos, me mantendo firme diante das dificuldades, pela minha saúde e por cuidar daqueles que eu tanto amo e a distância nos separa.

Agradeço aos meus pais, Soninha e Raimundo, por serem brilhantes em tudo que fazem, por tanto amor dado a mim desde a minha gestação, sempre me senti amada e desejada por vocês e isso não tem preço, quando retorno pra casa e encontro vocês felizes esqueço de qualquer dificuldade e problema. Admiro esse companheirismo e amor que vocês têm um com o outro. Tudo o que sou vem dos ensinamentos de honestidade e caráter que vocês com seus exemplos me passaram. Meu muito obrigada, esse trabalho dedico a vocês.

Agradeço ao meu amor, futuro esposo, Luís Fernando, que me faz tão bem, me traz tanta paz, por sempre me ouvir e ter paciência de escutar os mínimos detalhes, por sempre me apoiar em todas minhas decisões e momentos difíceis e por todo amor que tem por mim. Você é uma pessoa muito especial, agradeço a Deus por ter te encontrado, tivemos que ir tão longe para nos conhecer, mas valeu e continua valendo. Este trabalho também é dedicado à você, te amo mais que demais.

Agradeço a todos meus familiares, em especial as minhas tias Rosângela e Lourdes, minhas primas Ana Paula e Bruninha, meu irmão Miguel, por toda compreensão e carinho, pelas palavras de incentivo e pelo acolhimento amoroso de sempre. Vocês moram no meu coração.

Agradeço a Professora Eliana por todos os ensinamentos, pela atenção e apoio a todo momento que precisava durante a execução deste trabalho, por sua dedicação exclusiva à ciência e por me receber tão bem nesta instituição que era nova para mim no início. Sempre serei grata pela orientação e conselhos que me deste, muito obrigada.

Agradeço a Ana Teresa, Walter e Julinha, minha segunda família, por sempre torcerem por mim, entenderem minha ausência nestes dois últimos anos, por terem me orientado com tanto amor e carinho, não só no âmbito acadêmico enquanto no curso técnico e graduação, mas também por terem me orientado para vida, seus ensinamentos serão sempre lembrados. Vocês são pessoas raras, que tive a grande oportunidade de conhecer e conviver, só peço a Deus que cuide de vocês e que possamos estar juntos mais vezes, estou com muitas saudades. Muito obrigada por tudo, vocês estão sempre em meu pensamento.

Agradeço também à família LAMCA, vocês tornaram meus dias mais alegres e especiais, cada um com sua personalidade e peculiaridades, preenchendo as lacunas de uma família muito unida e também muito ouriçada. Aos meninos Rafael, Keven, Maicon, Wesclen e

Manuel obrigada pela força e também pela paciência em aguentar tanta mulher reunida em um lugar só. Obrigada Maristela por todo apoio e paciência, sempre disposta a ajudar, você é uma pessoa iluminada. Agradeço a amiga Kelly por tudo que fez por mim durante esses dois anos, teve sempre muita atenção e me ensinou muito, sou muito grata a você, sempre estarei torcendo por ti e pelo Tiago. Agradeço também a amiga Tai, que sempre com muita paciência me ajudou com dúvidas e conselhos. Agradeço a amiga Sabrina por ser esse poço de solidariedade, sempre fazendo diferença por onde passa, tentando fazer um mundo melhor, quando você não vem ao laboratório sua ausência logo é sentida, porque você é especial, muito obrigada por tudo. Muito obrigada amiga Larine por toda essa inteligência rara, sempre auxiliou em tudo que precisei, torço para que seu sucesso seja pleno, porque você merece, és uma grande e brilhante professora. Muito obrigada Anelise por todas bobagens, conselhos e diversão que nos proporciona, obrigada pelo acolhimento e pelas caronas no verão, gosto muito de você, que você seja sempre muito feliz. Muito obrigada a Karencita, nossa colombiana mais linda, sempre divertida e amada, você alegra nossos dias com sua cantoria e dicas de português. Agradeço a minha loira preferida, Naralice, tão querida, sempre disposta a me ouvir e aconselhar, muito obrigada. Agradeço a Ana por todos conselhos e ajudas que me deste durante este trabalho e por compartilhar ideias para o casamento, lhe desejo muito sucesso. Agradeço a mamãe mais doce e linda, Elisa, que nos presenteou com esse anjinho lindo que é a Ana Laura, obrigada por todo carinho e atenção. Obrigada à Carmen, Verônica, Marcy, Gabi, Milena, Priscila S. e as IC's Chiara, Giuli, Carol, Francine, Priscila R., por todo carinho e apoio. Muito obrigada a todos vocês!

Obrigada aos professores do Programa de Pós Graduação, por todos os ensinamentos, em especial a Jaqueline, por sempre estar disposta a ensinar e por todo o carinho.

Obrigada às professoras Myriam, Giniani e Larine pela disponibilidade de participar desta etapa e agradeço desde já as considerações realizadas.

E por fim agradeço a Capes pelo auxílio financeiro.

*Ninguém pode escolher a quem se ama  
É o amor quem lhe escolhe e diz: Vá lá!  
Não existe regra certa para se amar,  
Deus escreve e dirige toda trama;  
Um roteiro escrito com comédia e drama  
E ninguém sabe como o filme vai findar.  
Não se avexe, deixe o amor lhe carregar,  
Pois se existe um fato que eu acredito:  
É que na vida todo amor é bonito,  
Feio mesmo, é viver e não amar.*

**Braúlio Bessa**



## RESUMO

O arroz está entre os principais cereais cultivados e consumidos no mundo. Variáveis abióticas e bióticas podem favorecer a contaminação dele com fungos, que se pertencentes a espécies toxigênicas, podem produzir micotoxinas. Estes compostos quando ingeridos causam danos ao sistema digestivo, neurológico, respiratório, imunológico e ainda alguns são carcinógenos comprovados. A contaminação de alimentos por micotoxinas é preocupante, pois elas são termorresistentes, o que possibilita que permaneçam intactas após o preparo industrial ou doméstico, como o tratamento hidrotérmico (cocção), o que decorre da estabilidade estrutural da toxina ou por sua associação com os polímeros das biomoléculas. Estas duas possibilidades podem interferir na disponibilidade e digestibilidade dos nutrientes e nos níveis de micotoxinas disponíveis para serem absorvidas da dieta. Dentre estes polímeros destaca-se o amido que é potencialmente digerível pelas enzimas amilolíticas no trato digestivo. Em função de variáveis bióticas e abióticas uma fração pode estar na forma não digerível, constituindo o amido resistente. Este estudo tem como objetivo estudar a bioacessibilidade de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> e sua relação com o amido resistente em arroz, após tratamento hidrotérmico em micro-ondas e chapa térmica. Para conhecer o efeito do tratamento hidrotérmico na resistência digestiva da fração amilácea no arroz, foi determinado o teor de amido resistente pelo método oficial da A.O.A.C. A determinação das aflatoxinas foi realizada após a avaliação da performance de três métodos: Soares; Rodrigues-Amaya, QuEChERS e MSPD. A técnica que obteve melhores indicativos de eficiência e confiabilidade foi a técnica MSPD, com percentuais de recuperação em torno de 70% para todas as aflatoxinas. Amostras de arroz (integral, parboilizado e branco polido) foram fortificadas com aflatoxinas e submetidas aos dois tratamentos hidrotérmicos e avaliados quanto a redução delas após o processo. A bioacessibilidade das aflatoxinas foi avaliada pelo método de digestibilidade *in vitro*. O maior teor de amido resistente, 138 mg/g, foi encontrado no arroz branco polido tratado hidrotérmicamente em chapa térmica, que apresentou teor de amilose intermediário (19,2%). O maior percentual de redução na soma das quatro aflatoxinas foi 90,5% no arroz parboilizado submetido ao tratamento hidrotérmico em micro-ondas, verificando-se que entre 34% e 89,5 % foram liberadas após a digestão. Assim relacionando os valores de bioacessibilidade com os de redução, ficou demonstrado que os dois tratamentos hidrotérmicos aparentemente reduzem o nível de aflatoxinas, porém os resultados de bioacessibilidade mostram que estas se tornam disponíveis para absorção durante o processo de digestão.

Palavras-Chave: Amido resistente. Bioacessibilidade. Exposição crônica. Micotoxina.



# HYDROTHERMAL TREATMENT AND THE BIOACCESSIBILITY OF AFLATOXINS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> AND G<sub>2</sub> IN RICE

## ABSTRACT

Rice is among the world's largest cultivated and consumed cereals. Abiotic and biotic variables may favor its contamination with fungi, which if belonging to toxigenic species, can produce mycotoxins. These compounds when ingested cause damage to the digestive system, neurological, respiratory, immune and some are proven carcinogens. Food contamination by mycotoxins is of concern because they are thermoresistant, which allows them to remain intact after industrial or domestic preparation, such as hydrothermal treatment (cooking), which results from the structural stability of the toxin or its association with polymers of the biomolecules. These two possibilities may interfere with the availability and digestibility of nutrients and the levels of mycotoxins available to be absorbed from the diet. Among these polymers stands out the starch that is potentially digestible by the amylolytic enzymes in the digestive tract. A fraction of the starch may be in the nondigestible form, constituting the starch resistant. This study aims to evaluate the bioaccessibility of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> and their relationship with resistant starch in rice, after hydrothermal treatment in microwave and thermal plate. To determine the effect of the hydrothermal treatment the resistant starch content was determined by the official method of A.O.A.C. The aflatoxins determination was performed after the performance evaluation of three methods: Soares; Rodrigues-Amaya, QuEChERS and MSPD. The technique that obtained better indicator of efficiency and reliability was the MSPD technique, with recovery percentages around 70% for all aflatoxins. Samples of rice (integral, parboiled and polished white) were fortified with aflatoxins and submitted to two hydrothermal treatments and evaluated about their reduction after the process. The bioaccessibility of aflatoxins was evaluated by the *in vitro* digestibility method. The highest resistant starch content, 138 mg / g, was found in hydrothermally treated polished white rice in thermal plate, which had an intermediate amylose content (19.2%). The highest reduction percentage was 90.5% to the four aflatoxins in the parboiled rice submitted to hydrothermal treatment in microwaves. It was verified that between 34% and 89.5% were released after digestion. Thus, relating bioaccessibility values to those of reduction, it was shown that the two hydrothermal treatments apparently reduce the level of aflatoxins, but bioaccessibility results show that they become available for absorption during the digestion process.

Key words: Starch resistant. Bioaccessibility. Chronic exposure. Mycotoxin.





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal média (g/100g matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido. ....	30
Tabela 2 – Legislação para aflatoxinas para cereais.....	36
Tabela 3 - Condições para tratamento hidrotérmico de arroz. ....	44
Tabela 4 – Níveis de fortificação das amostras. ....	46
Tabela 5 – Combinações de suporte sólido e sais para a técnica MSPD.....	47
Tabela 6 - Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos do modelo de digestão <i>in vitro</i> . .....	51
Tabela 7 – Composição química do arroz integral, parboilizado e branco polido em base seca. .....	53
Tabela 8 – Perfil de textura do arroz integral, parboilizado e branco polido tratados hidrotermicamente. ....	57
Tabela 9 – Frações de amido disponível e resistente do arroz integral, parboilizado e branco polido tratados hidrotermicamente. ....	57
Tabela 10 – Recuperação das aflatoxinas em arroz branco polido <i>in natura</i> em diferentes métodos.....	60
Tabela 11 - Parâmetros analíticos avaliados em CLAE-FL. ....	62
Tabela 12 - Percentual de recuperação e o coeficiente de variação na determinação das aflatoxinas em arroz integral, parboilizado e branco polido na forma <i>in natura</i> e tratados hidrotermicamente em chapa térmica e os coeficientes de variação. ....	63
Tabela 13 – Níveis de redução percentual (%) de aflatoxinas em arrozes tratados hidrotermicamente (micro-ondas e chapa térmica). ....	64
Tabela 14 – Bioacessibilidade (%) de aflatoxinas em arrozes tratados hidrotermicamente (micro-ondas e chapa térmica). ....	65



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da aflatoxinas (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> ).....	34
Figura 2 – Esquema representativo da análise de bioacessibilidade <i>in vitro</i> .....	50
Figura 3 – Arroz branco polido tratado hidrotermicamente em chapa térmica.....	55
Figura 4 – Análise de componentes principais.....	67



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AACC – do inglês “*American Association of Cereal Chemists*”
- ACP – Análise de componentes principais
- AD – Amido disponível
- AF’s – Aflatoxinas totais
- AFB<sub>1</sub> – Aflatoxina B<sub>1</sub>
- AFB<sub>2</sub> – Aflatoxina B<sub>2</sub>
- AFG<sub>1</sub> – Aflatoxina G<sub>1</sub>
- AFG<sub>2</sub> – Aflatoxina G<sub>2</sub>
- AFM<sub>1</sub> – Aflatoxina M<sub>1</sub>
- AFM<sub>2</sub> – Aflatoxina M<sub>2</sub>
- ALD – Amido lentamente digerível
- ANOVA – Análise de variância
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC – do inglês “*Association of Official Analytical Chemist International*”
- AR – Amido resistente
- AR1 – Amido resistente tipo 1
- AR2 – Amido resistente tipo 2
- AR3 – Amido resistente tipo 3
- AR4 – Amido resistente tipo 4
- ARD – Amido rapidamente digerível
- CCDAE – Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
- CLAE – FL – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência
- CLAE - MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
- CV – Coeficiente de variação
- EM – efeito de matriz
- FAO – do inglês “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”
- IARC – do inglês “*International Agency for Research of Cancer*”
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- LMT – Limite máximo tolerado

LODi – Limite de detecção do instrumento  
LODm – Limite de detecção do método  
LOQi – Limite de quantificação do instrumento  
LOQm – Limite de quantificação do método  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MSPD – do inglês “*Matrix solid-phase dispersion*”  
pH – potencial hidrogeniônico  
PSA – Amina primária secundária  
QuEChERS – do inglês “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*”  
R – Coeficiente de correlação  
R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação  
TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos  
UE – União Europeia  
USDA – do inglês “*United States Department of Agriculture*”  
UV – Ultravioleta  
ε – Absortividade molar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>28</b>
3.1 ARROZ.....	28
3.2 AMIDO .....	30
3.3 CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS .....	32
<b>3.3.1 Aflatoxinas .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.2 Avaliação de biodisponibilidade de componentes da dieta .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3.3 Determinação de aflatoxinas .....</b>	<b>38</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 MATERIAL.....	41
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	42
4.3 PREPARO DE PADRÕES .....	42
4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	42
4.5 TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO PRODUTO .....	43
4.6 DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES DE AMIDO DISPONÍVEL E RESISTENTE .....	45
4.7 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS .....	45
<b>4.7.1 Métodos de extração .....</b>	<b>45</b>
<b>4.7.2 Quantificação de aflatoxinas em CLAE-FL .....</b>	<b>48</b>
<b>4.7.3 Validação de método analítico .....</b>	<b>48</b>
4.8 BIOACESSIBILIDADE DE AFLATOXINAS.....	49
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	53
5.2 TRATAMENTO HIDROTÉRMICO .....	55
5.3 DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES DE AMIDO DISPONÍVEL E RESISTENTE .....	57
5.4 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE AFLATOXINAS.....	59
5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS .....	61
5.6 EFEITO DE TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NA BIOACESSIBILIDADE.....	63
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>





## 1 INTRODUÇÃO

Alimentos destinados ao consumo humano podem ser contaminados sob condições bióticas e abióticas ao longo da cadeia produtiva. A ocorrência de algumas espécies de fungos toxigênicos em alimentos tem servido de alerta para o risco de contaminação com micotoxinas, que promovem danos à saúde quando ingeridas. No aspecto qualidade de grãos usualmente o maior enfoque é para as propriedades tecnológicas e nutricionais que definem o valor econômico. No entanto, o efeito mais difícil de ser contornado são os danos à saúde de humanos e de animais de criação, que nem sempre são associados à exposição crônica à contaminantes fúngicos da dieta (HUSSEIN; BRASEL, 2001; MISHIRA et al., 2013).

As micotoxinas são metabólitos secundários de algumas espécies de fungos, possuem amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, estabilidade térmica e atuam em baixas concentrações podendo causar danos ao sistema digestivo, neurológico, respiratório, imunológico e algumas são carcinógenos comprovados (BHAT; RAI; KARIM, 2010).

A preocupação com a segurança alimentar tem motivado legislações específicas que limitam a presença das micotoxinas em alimentos e matérias primas. Em destaque as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) que ocorrem frequentemente em alimentos de consumo rotineiro em várias regiões do mundo, além disso elas são termorresistentes devido a sua estabilidade estrutural ou por sua associação com polímeros de biomoléculas como exemplo o amido, o qual possui uma forma não digerível o amido resistente. Contudo, é importante ressaltar que o limite máximo tolerado para a presença delas em alimentos é estabelecido, na maioria das vezes, para os grãos no estado *in natura* ou processados para comercialização, não considerando o efeito do preparo doméstico nos níveis residuais destes contaminantes. A observação da legislação nem sempre evita a exposição crônica, especialmente para cereais como arroz que faz parte da rotina de alimentação de muitos países e que vem ganhando espaço cada vez maior pela ausência de glúten, o que atende a necessidade de um grupo da população com sensibilidade a este. Ainda que os níveis de micotoxinas sejam aceitáveis, não se conhece a biodisponibilidade delas após o preparo dos alimentos à base desses cereais para uma estimativa da exposição crônica da população consumidora do grão (BRASIL, 2011). Portanto, há necessidade permanente de proteger a saúde dos seres humanos e dos animais suscetíveis, mitigando sua exposição à micotoxinas pela ingestão de alimentos contaminados.

Apesar de muitos anos de pesquisa e a introdução de boas práticas na cadeia de produção, armazenamento e distribuição de alimentos, as micotoxinas continuam a ser um

problema de difícil controle. Portanto, estudos sobre a biodegradação de aflatoxinas, a influência de operações pré e pós-colheita na distribuição de aflatoxinas em diferentes frações do grão de arroz e o efeito do tratamento hidrotérmico vem sendo realizados como forma de propor maneiras que minimizem a exposição crônica a estas micotoxinas especialmente considerando que o consumo brasileiro per capita anual de arroz é de 40,0 kg (FAO, 2015).

Tendo em vista, a importância de se entender o tratamento térmico e seus efeitos sobre o nível de contaminantes para prevenir danos à saúde humana, destaca-se o interesse para as AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> presente em alimentos de consumo rotineiro por toda população como fonte de nutrientes básicos, especialmente pela possibilidade de interação delas com formas poliméricas de carboidratos e proteínas (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). Neste estudo se propõe avaliar a biodisponibilidade de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> e sua relação com o amido resistente formado em arroz, após tratamento hidrotérmico, similar ao empregado para o preparo doméstico destes grãos e seus derivados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> em arroz e sua relação com o amido resistente formado após tratamento hidrotérmico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito do tratamento hidrotérmico no conteúdo de amido resistente no arroz integral, parboilizado e branco polido.
- Padronizar procedimento analítico para determinação de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> em arroz tratado hidrotermicamente.
- Correlacionar a bioacessibilidade das AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> com a formação de amido resistente durante o tratamento hidrotérmico do arroz.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*, L.) um dos principais cereais cultivados é considerado alimento básico para maioria da população em várias regiões do mundo por fornecer balanceamento nutricional satisfatório ao fazer parte da dieta. Além disso, é uma cultura rústica, o que aumenta o potencial de produção para o combate à fome no mundo (FAO, 2015).

O arroz é originário do sudoeste da Ásia, pertence à família *Gramineae* e subfamília *Pooideae*. O gênero *Oryza* é constituído por 21 espécies, das quais 7 são as mais produzidas no mundo, *Oryza barthii*, *Oryza glaberrima*, *Oryza latifolia*, *Oryza longistaminata*, *Oryza punctata*, *Oryza rufipogon* e *Oryza sativa* (JULIANO, 1985).

A espécie *Oryza sativa* L. é a de maior importância comercial no Brasil e esta é dividida em três principais subespécies: índica, japônica e javanica, sendo as duas primeiras as mais consumidas. Os grãos da subespécie índica são longos, finos e apresentam-se mais longos quando cozidos do que os da subespécie japônica, que tem normalmente grãos curtos e largos, neste caso, devido ao baixo teor de amilose (KENNEDY; BURLINGAME, 2003).

O grão de arroz é basicamente constituído pela cariopse e a casca. A casca constitui cerca de 20% do grão integral e é composta de duas folhas modificadas, a pálea e a lema, compostas por celulose e minerais que juntos propiciam uma barreira do grão para prevenir os danos causados por insetos e fungos (HOSENEY, 1991).

A cariopse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona, que representam 5 a 8% do grão integral, constituídas por corpos lipídicos e proteicos. Na base do grão está localizado o gérmen, que é rico em proteínas e lipídios representando 2 a 3% do grão integral. O endosperma forma a maior parte do grão (89-94%) e caracteriza-se por possuir células ricas em grânulos de amido e alguns corpos proteicos (ZHOU et al. 2002).

No Brasil, a classificação do arroz está regulamentada pela Instrução Normativa nº 6 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece os seguintes critérios: primeiramente o arroz é classificado em dois grupos de acordo com a sua forma de apresentação: arroz em casca e arroz beneficiado cujo subgrupos são definidos em relação ao tipo de beneficiamento aplicado. O arroz em casca pode ser dividido nos subgrupos: natural e parboilizado, enquanto o arroz beneficiado se divide em: integral, polido, parboilizado integral e parboilizado polido (BRASIL, 2009).

O arroz integral é obtido pela retirada da casca do grão, podendo ser polido com a remoção do farelo (pericarpo, tegumento, camada de aleurona e gérmen), que representa de 8,5 a 14,8% do grão integral, resultando no arroz branco polido. O arroz parboilizado é resultante de processo hidrotérmico dos grãos, podendo ser consumido na forma integral ou polido (JULIANO; BECHTEL, 1985).

Segundo o Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a produção mundial de arroz beneficiado será aproximadamente 483,6 milhões de toneladas na safra de 2017/2018 como resposta ao clima favorável à cultura nas regiões produtoras. A China é líder na produção mundial de arroz, responsável por mais de 30% do volume total produzido no mundo. Os países integrantes do Mercosul deverão produzir o total de 15,4 milhões de toneladas de arroz em casca, na safra 2017/18 (retração de 1,1 % em relação à safra 2016/17), sendo o Brasil responsável por aproximadamente 76% da produção do bloco. A cultura do arroz no Brasil está atrás apenas da cultura de soja e milho, ocupando o 3º lugar na produção de grãos. Atualmente, o Rio Grande do Sul é responsável por volta de 2/3 de toda produção do grão no Brasil (CONAB, 2017).

O arroz é constituído principalmente por amido, seguido de proteínas e menos que 4% de lipídios, cinzas e vitaminas. Durante o beneficiamento o arroz é separado em frações, resultando na composição diferente de cada uma delas, sendo todas afetadas por variáveis abióticas do ambiente, do manejo, do processamento e do armazenamento, além de variáveis bióticas que resultam em grãos com características nutricionais diferenciadas, dependendo da fração em que estão contidos (ZHOU et al., 2002; STORCK; SILVA; FAGUNDES, 2005).

As camadas externas do grão apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibras minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido. A forma mais usual de consumo é o endosperma amiláceo cujo polimento resulta em redução no teor de nutrientes, exceto de amido, originando as diferenças na composição entre o arroz integral, o branco polido e o parboilizado (Tabela 1) (STORCK, 2004).

**Tabela 1** – Composição centesimal média (g/100g matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido.

Constituinte	Arroz Integral	Arroz Branco Polido	Arroz Parboilizado Polido
Amido total	74,1	87,6	85,1
Proteínas	10,5	8,9	9,4
Lipídios	2,5	0,4	0,7
Cinzas	1,2	0,3	0,7
Fibra total	11,7	2,9	4,1
Fibra insolúvel	8,9	1,1	1,6
Fibra solúvel	2,8	1,8	2,5

Fonte: Adaptado STORCK, 2004.

### 3.2 AMIDO

Um dos principais constituintes de alimentos, base da dieta humana, como o arroz, é o amido, um polissacarídeo composto por cadeias de amilose (ligações  $\alpha$ -1,4, linear) e amilopectina (ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, ramificado). O teor de amido e a proporção amilose/amilopectina variam entre as diferentes fontes (cereais, tubérculos e raízes) e genótipos da fonte (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

O amido ocorre na natureza em grânulos que são insolúveis em água fria e também são resistentes ao ataque enzimático, porém se a parede externa do grânulo for rompida ou houver o fornecimento de água e calor, os grânulos absorvem água, incham e iniciam um processo de desintegração, podendo ficar mais disponíveis. Nestas condições, a estrutura das cadeias, tanto de amilose, quanto de amilopectina é desenovelada, tornando-se mais susceptível à hidrólise (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Por possuir somente ligações  $\alpha$  glicosídicas, o amido quando ingerido é potencialmente digerível pelas enzimas amilolíticas no trato digestivo humano, sendo absorvido na forma de glicose (ENGLYST; HUDSON, 1996). Na década de 80 considerava-se que todo amido era hidrolisado pela enzima pancreática amilase, porém, em estudos verificou-se que alguns fatores como a relação de amilose/amilopectina, o processamento do alimento (cocção, extrusão, resfriamento, congelamento), a forma física do alimento, inibidores enzimáticos, entre outros, podem influenciar na hidrólise e conseqüentemente na absorção do amido (WOLF, BAUER; FAHEY, 1999).

Em termos de digestibilidade o amido é classificado em amido resistente (AR) e amido disponível (AD). O primeiro é definido como a fração não digerível do amido no intestino delgado de indivíduos saudáveis, portanto não fornece glicose e o amido disponível representa a fração digerível do amido no intestino delgado. O amido resistente é fermentado no intestino grosso pela microflora bacteriana para produzir gases e ácidos graxos de cadeia curta, contribuindo para a prevenção de doenças associadas à alimentação, além de diminuir o risco de doenças cardiovasculares e contribuir para a perda de peso. Entre esses benefícios, têm-se o aumento do volume fecal devido ao amido resistente. Isto é importante para a diluição de compostos tóxicos, potenciais formadores de células cancerosas. Diante disso, a AACC (Associação Americana de Química dos Cereais) estabeleceu o amido resistente como um tipo de fibra alimentar (CHAMP; FAISANT, 1996; PEREIRA, 2007).

O amido disponível ainda é classificado quanto a taxa de liberação de glicose e absorção no intestino delgado determinados por testes *in vitro*, sendo amido lentamente digerível o que fornece uma resposta glicêmica dentro de 20 a 110 minutos (ALD) enquanto que o amido rapidamente digerível (ARD) tem resposta glicêmica até 20 minutos (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992).

O amido resistente possui as frações fisicamente inacessíveis (AR1), grânulos de amido resistente (AR2), amido retrogradado (AR3) e amido modificado quimicamente (AR4). O AR1 é caracterizado pela forma física do grão que pode impedir o acesso das enzimas digestivas e diminuir a digestão. O AR2 ocorre quando o amido é armazenado na forma de corpos intracelulares parcialmente cristalinos denominado grânulos, sendo o grau de resistência dependente da fonte de amido. O AR3 é o mais comum, é o amido submetido a tratamentos hidrotérmicos que resulta na gelatinização e retrogradação e o torna resistente à digestão. O AR4 ocorre quando o amido sofre modificações em sua estrutura química para atender necessidades específicas da indústria, como por exemplo amidos com ligações cruzadas, sendo estes resistentes à digestão no intestino delgado (MUIR; O'DEA, 1992; CHAMP; KOZLOWSKI; LECANNU, 2001).

A digestibilidade do amido pode ser afetada por fatores intrínsecos como a presença de complexos amido-lípido e amido-proteína, de inibidores enzimáticos, bem como por fatores extrínsecos como o tempo de mastigação, tempo de trânsito até o trato gastrointestinal, a concentração de enzimas digestivas, a quantidade de amido presente no alimento e a presença de outros componentes que podem retardar a hidrólise enzimática. Portanto, os alimentos crus e processados contêm quantidades de amido resistente que variam em decorrência da fonte

botânica e do tipo de processamento (moagem, cozimento e resfriamento) (GOÑI; GARCÍA-DIZ; MAÑAS, 1996; THARANATHAN, 2002).

A determinação do amido resistente pode ser realizada por método *in vivo*, realizando coletas de amostra diretamente do íleo do indivíduo que ingere alimento amiláceo ou estimativa da quantidade de amido fermentado no cólon. Porém, estas técnicas são dificultadas por envolver experimentos com animais ou humanos. Os métodos *in vitro* que simulam a hidrólise utilizando enzimas amilolíticas da parte superior do trato digestivo, determinando o teor de amido disponível de acordo com a glicose liberada, sendo os mais utilizados. Neles o amido remanescente passa por outra hidrólise com hidróxido de potássio ou dimetilsulfóxido e enzimas amilolíticas e é determinado como amido resistente (CHAMP; FAISANT, 1996).

Os métodos *in vitro* variam com relação ao modo de preparo da amostra, tipos e quantidades de enzimas, condições de tempo e temperatura de incubação e substâncias utilizadas para a solubilização da fração resistente. Estas variações dificultam a comparação dos resultados de amido resistente obtidos pelas distintas técnicas discutidas na literatura (WALTER; SILVA; EMANUELLI, 2005).

### 3.3 CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS

Fungos são microrganismos aeróbios, heterotróficos, ou seja, necessitam de compostos orgânicos como fonte de energia e estão presentes em todos os ambientes. Eles podem ser importantes economicamente nas áreas da medicina, fitopatologia e na indústria, ou podem ser um risco quando classificados como decompositores. Nesse caso, podem contaminar os alimentos, reduzindo o valor nutritivo, produzindo substâncias tóxicas e doenças em humanos e animais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

A presença destes microrganismos em cereais é decorrente da necessidade de obterem nutrientes para seu desenvolvimento. Portanto podem contaminar grãos tanto no campo quanto ao longo do armazenamento, causando degradação dos mesmos (ZHAO et al., 2010). Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos nos cereais são umidade, temperatura, período de armazenamento, nível inicial de contaminação de esporos, impurezas, insetos, concentração de CO<sub>2</sub>, condições físicas e sanitárias dos grãos. Em condições ambientais favoráveis, os esporos dos fungos germinam, formando hifas que se distribuem pelos grãos e/ou outros substratos. (TANAKA et al., 2007).



Os fungos podem contaminar os grãos no campo antes da colheita e são denominados fungos de campo ou durante o armazenamento. Ambos podem persistir em alimentos e rações destinados ao consumo humano e de animais. (CARVAJAL; ARROYO, 1997).

Os fungos toxigênicos são aqueles capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos. Os principais gêneros encontrados em alimentos são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*. Eles também podem ser os principais responsáveis pela deterioração dos grãos na pré-colheita e, posteriormente, durante o armazenamento (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Os metabólitos secundários sintetizados e excretados por fungos toxigênicos, contaminantes de cereais, empregando um conjunto de vias metabólicas induzidas por estresse, desbalanço de nutrientes e condições ambientais são denominadas micotoxinas (SWEENEY; DOBSON, 1998). A ingestão de micotoxinas pode provocar manifestações patológicas do tipo imunossupressoras, mutagênicas e carcinogênicas (BHAT; RAI; KARIM, 2010).

O impacto das micotoxinas na cadeia alimentar humana pode se dar de forma direta ou indireta. A forma direta é caracterizada pelo consumo dos cereais, oleaginosas e derivados contaminados e a forma indireta ocorre quando animais se alimentam com rações previamente contaminadas, podendo excretar micotoxinas no leite, carne e ovos, e conseqüentemente constituir-se fonte de contaminação para humanos (MOLIN; VALENTINI, 1999).

As micotoxinas são contaminantes naturais de difícil controle, são resistentes a condições drásticas de pH, temperatura, luminosidade entre outras. Por isso aparecem no material *in natura*, em produtos processados e prontos para consumo (BENNETT; KLICH, 2003). Existe uma grande variedade de estruturas químicas de baixa massa molecular, agrupadas de acordo com o grau e tipo de toxicidade ao homem e animais, o que dificulta seu monitoramento (HEIDTMANN et al., 2011).

Cerca de 400 tipos de micotoxinas já foram isolados e identificados. No entanto, as de maior importância em cereais e derivados são as aflatoxinas e ocratoxinas, produzidas pelos gêneros fúngicos *Penicillium* e *Aspergillus*, e as zearalenona, fumonisinas e tricotecenos, produzidas principalmente por algumas espécies do complexo *Fusarium*. Entre estas micotoxinas, as aflatoxinas destacam-se devido aos danos que podem causar à saúde humana e animal. No arroz a síntese delas pode ocorrer durante as operações de pós-colheita, principalmente durante o armazenamento, devido aos menores percentuais de umidade, o que altera o perfil da micota e/ou seu padrão metabólico (FEDDERN; BADIALE-FURLONG; SOARES, 2007; HEIDTMANN et al., 2012).

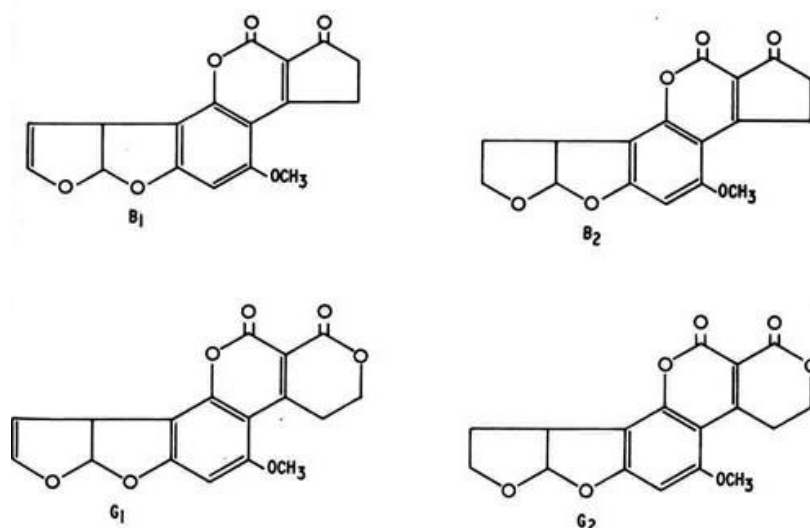
### 3.3.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas são produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Existem aproximadamente 20 compostos denominadas aflatoxinas, porém as que podem ocorrer naturalmente em alimentos de origem vegetal são AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (SWEENEY; DOBSON, 1998). A denominação “B” e “G” das aflatoxinas está baseada na cor de sua fluorescência sob luz ultravioleta (UV), ou seja, B (*blue*) indica que apresenta fluorescência na cor azul e G (*green*) indica fluorescência na cor verde (REITER; ZENTEK; RAZZAZI, 2009).

A AFB<sub>1</sub> possui o dobro da toxicidade de AFG<sub>1</sub> é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) no Grupo 1 de toxicidade como a micotoxina mais tóxica e carcinogênica para seres humanos. Duas outras micotoxinas são derivadas hidroxiladas resultantes do metabolismo das AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, denominadas aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) e aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) que têm sido detectadas em leite e seus derivados, urina e fezes de mamíferos. Estas formas são menos tóxicas que a AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, porém não menos importante por estarem presentes em alimentos infantis (IARC, 1993; IHA et al., 2013).

As aflatoxinas (Figura 1) possuem estruturas semelhantes, formando um único grupo de compostos heterocíclicos (complexo furocumarinas). O que difere a série “G” da “B” é a presença de um anel 3-lactona, no lugar do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação 9,9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas aflatoxinas AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>, mas não nas aflatoxinas AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> (JAIMEZ et al., 2000).

**Figura 1** – Estrutura química da aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>).



Fonte: JAIMEZ et al., 2000.

Em relação à solubilidade, as aflatoxinas são solúveis em solventes de polaridade média e alta, como clorofórmio e metanol e seus pesos moleculares são: AFB<sub>1</sub>: 312,3; AFB<sub>2</sub>: 314,3; AFG<sub>1</sub>: 328,3; AFG<sub>2</sub>: 330,3 g.mol<sup>-1</sup>. Absorvem luz ultravioleta na faixa entre 362 e 363 nm e a emissão de fluorescência para a aflatoxinas AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> ocorre em 425 nm e para as aflatoxinas AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> em 450 nm (SWEENEY; DOBSON, 1998).

As doenças provocadas por exposição à aflatoxinas são conhecidas como aflatoxicoses, porém nem sempre reconhecida como patologia específica, pois os sintomas agudos são semelhantes ao desencadeado por diversos tipos de contaminantes. Nos níveis crônicos os sintomas são relacionados à danos hepáticos, incluindo a carcinogenicidade (ROCHA et al., 2014).

Bioquimicamente as aflatoxinas podem afetar o metabolismo de obtenção de energia, de carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e das proteínas (BRADBURN; COKER, 1993). A sua toxicidade pode ser aguda para o fígado, sendo alguns dos efeitos nocivos da exposição a hepatocarcinogênese, teratogênese, mutagênese, imunossupressão, efeito anticoagulante, anemia e diminuição da fertilidade (BUTLER, 1974)

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450. A matriz sobre a qual se encontram as aflatoxinas é outra variável importante para determinar a toxicidade por estarem ligadas as macromoléculas do alimento de forma diferente e assim mais ou menos protegidas contra a absorção ou degradação. Vidal e colaboradores (2018) investigaram a ocorrência de possíveis aflatoxinas ligadas no milho, e constataram que ao tratar a matriz com  $\alpha$  amilase e celulase houve aumentos significativos no conteúdo total de aflatoxinas livres (15 e 13% respectivamente), o que mostra a possibilidade de associação de aflatoxinas a substâncias matriciais (BASSAPA; SHANTHA, 1996; VIDAL, et al., 2018).

A legislação brasileira que regulamenta limites máximos toleráveis (LMT) para as micotoxinas presentes nos alimentos é a RDC n° 7 de 2011 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). A Tabela 2 apresenta os limites máximos permitidos de aflatoxinas para cereais, incluindo o arroz, no Brasil e na União Europeia (UE) (EC, 2010; BRASIL, 2011).

**Tabela 2** – Legislação para aflatoxinas para cereais.

Micotoxinas	BRASIL ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	UE ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )
Aflatoxinas (AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> )	5	4
AFB <sub>1</sub>	-	2

Fonte: EC, 2010; BRASIL, 2011.

Na década de 60 foram iniciados os estudos de ocorrência de aflatoxinas devido ao fato da morte de 100.000 mil perus na Inglaterra após a ingestão de farelo de amendoim brasileiro (TURNER; SUBRAHMANYAMB; PILETSKY, 2009).

Tem sido relatado a ocorrência de diversas micotoxinas em arroz. Al-Zoreky e Saleh (2017) analisaram amostras de arroz do Egito, Arábia Saudita, Austrália, Estados Unidos, Paquistão e Índia, verificaram que pelo menos um tipo de aflatoxina foi detectado nas amostras. A contaminação com AFB<sub>1</sub> variam de 0,014 a 0,123  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , enquanto que valores AF's totais variou de 0,052 a 2,58  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Em um estudo realizado com 370 amostras de arroz de diferentes estados da China, verificou-se que 235 amostras apresentaram níveis detectáveis de contaminação por aflatoxinas, com níveis médios de 0,65  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 0,60  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> respectivamente, sendo que 5 amostras excederam os níveis máximos de AFB<sub>1</sub> para arroz estabelecido pela União Europeia, a contaminação máxima encontrada foi de 20,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  em uma amostra (LAI et al., 2015).

Katsurayama e colaboradores (2018) coletaram 187 amostras de arroz dos estados do Rio Grande do Sul, Maranhão e São Paulo. A ocorrência de aflatoxinas foi considerada baixa, 25 amostras (13%) estavam contaminadas, sendo a média do nível total de AF's de arroz irrigado (Rio Grande do Sul) e de arroz de sequeiro (Maranhão) de 0,35  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 0,14  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente. No estado de São Paulo, foi relatada a presença de AF's em 9 amostras (5%) (<LOD - 70,9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), que é acima do máximo permitido pela ANVISA.

Considerando que a principal forma de exposição à micotoxinas, por humanos e animais, se dá pela ingestão de alimentos contaminados, atenção deve ser dada aqueles consumidos diariamente pela população, como o arroz, uma vez que este comportamento propicia a exposição crônica (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; BECKER-ALGERI et al. 2013).

### 3.3.2 Avaliação de biodisponibilidade de componentes da dieta

Um conjunto de reações denominadas digestão ocorre quando o alimento ingerido e passa pelos diferentes órgãos no trato gastrointestinal. Os macronutrientes que compõe os alimentos são transformados em moléculas menores que são absorvidas para posterior síntese de compostos característicos de cada indivíduo. Esse processo é importante para promover a distribuição dos compostos benéficos ou tóxicos nos diferentes compartimentos do organismo humano (MÉNARD et al., 2014).

Na avaliação dos riscos de danos para a saúde humana, a ingestão de alimentos é considerada uma via importante pois promove a exposição a contaminantes de diferentes pontos da cadeia produtiva. A quantidade total de um contaminante ingerido (ingestão) nem sempre reflete o quanto estará disponível para o organismo manter suas funções, pois somente a fração biodisponível para absorção será atuante nos processos metabólicos. A biodisponibilidade é definida como a quantidade do contaminante liberado da matriz alimentar no trato gastrointestinal e, em seguida, absorvido. Este conceito pode ser considerado para a avaliação da biodisponibilidade também de micotoxinas em alimentos (VERSANTVOORT, et al., 2005).

Estudos em animais e em humanos mostram que a biodisponibilidade por via oral de compostos a partir de alimentos pode ser significativamente diferente dependendo da matriz, do processamento ou da preparação dos alimentos. Por exemplo, a ingestão de um contaminante em uma matriz alimentar pode levar a toxicidade, enquanto a ingestão da mesma quantidade deste contaminante em uma diferente não estará disponível para ser absorvida e promover alterações metabólicas. Assim, uma melhor compreensão do efeito da matriz sobre a biodisponibilidade oral de um contaminante levará a uma avaliação mais precisa do risco para a saúde. A biodisponibilidade oral pode ser vista como o resultado de três processos (WIENK; MARX; BEYENEN, 1999):

1. Liberação do composto a partir da sua matriz em suco digestivo no trato gastrointestinal (bioacessibilidade);
2. Transporte através do epitélio intestinal para a veia porta (transporte intestinal);
3. Metabolização do composto no fígado e intestino (metabolismo).

A biodisponibilidade pode ser reduzida durante o transporte do contaminante pelo epitélio intestinal ou por sua transformação metabólica. Portanto, a determinação do composto de interesse, após o processo digestivo de sua matriz, denominada bioacessibilidade (Processo 1), pode ser vista como um indicador para a biodisponibilidade oral máxima e da quantidade real que pode estar ativa metabolicamente (VERSANTVOORT et al., 2005).

A avaliação quantitativa da biodisponibilidade e bioacessibilidade de compostos a partir de diferentes matrizes é um processo complexo, principalmente devido às etapas que compreendem a digestão e ao custo da condução de experimentos com animais, por isso, modelos de digestão *in vitro* vêm sendo cada vez mais utilizados para estudar a biodisponibilidade oral de compostos contaminantes de leites e outros alimentos (BECKER-ALGERI, 2016).

Os modelos de digestão *in vitro* simulam o processo de digestão a partir da aplicação das condições fisiológicas reais, como por exemplo composição dos fluidos digestivos, pH, temperatura e tempo de permanência do alimento em cada compartimento. Os fluidos digestivos são preparados artificialmente e a digestão inicia no compartimento da boca (saliva), seguindo ao estômago (suco gástrico) e intestino delgado (suco duodenal e bile), a fim de avaliar a bioacessibilidade do composto tóxico durante o trânsito da matriz no trato gastrointestinal (OOMEN et al. 2003; VERSANTVOORT et al., 2005; KABAK; OZBEY, 2012).

Kabak e Ozbey (2012) avaliaram a bioacessibilidade de aflatoxinas em diferentes matrizes alimentícias (amendoins, pistaches, avelãs, figos secos, páprica, trigo e milho) e observaram valores que variaram entre 80 e 98%, concluindo que nestes casos a biodisponibilidade das aflatoxinas não depende diretamente dos níveis de contaminação do alimento e sim do tipo de matriz contaminada.

### **3.3.3 Determinação de aflatoxinas**

Os métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em alimentos geralmente se caracterizam pelas etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação, como para outros analitos. Métodos sensíveis e confiáveis são necessários, pois a toxicidade das micotoxinas ocorre a partir de baixas concentrações. Estabelecer um método padrão para extração e detecção de todas micotoxinas não é possível, em função das diferentes estruturas, ou até mesmo da matriz na qual elas estão contidas (TURNER; SUBRAHMANYAMB; PILETSKY, 2009; WELKE et al., 2010).

A extração de micotoxinas requer o uso de solventes ou mistura de água e solventes relativamente polares. Quando a matriz é constituída por compostos hidrossolúveis, metanol, acetona e acetato de etila são os mais indicados, no entanto, se a matriz for constituída por compostos não hidrossolúveis a acetonitrila é o mais indicado (STROKA et al., 1999). Os procedimentos de limpeza do extrato envolvem colunas multifuncionais que contenham carvão ativo e alumina, ou com a utilização de sais específicos (LANGSETH; RUNDBERGET, 1998).

Além do desenvolvimento de novas tecnologias para determinar micotoxinas, são necessários métodos que apresentem o mínimo impacto ambiental, tempo de exposição dos analistas a solventes tóxicos e determinem uma ampla faixa de substância em uma única extração (ZOUAGH; RÍOS, 2008).

Na matriz em análise podem estar presentes substâncias que na etapa de extração serão co-extraídas, sendo necessária uma etapa posterior de limpeza para remoção dos possíveis interferentes. Os principais métodos para extração de micotoxinas são: partição líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE), MSPD, (do inglês *matrix solid phase dispersion*) QuEChERS, (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e colunas de imunoafinidade (ANASTASSIADES et al., 2003; BAKER, 2007; LAGANÁ et al., 2010).

Baker e colaboradores (1989) desenvolveram a técnica MSPD, originada da técnica clássica SPE que consiste na dispersão da matriz em um suporte sólido de forma a permitir a homogeneização da amostra com um suporte sólido adequado para promover o rompimento celular. Com esta técnica é possível isolar várias classes de analitos presentes em baixas concentrações e em diferentes matrizes, considerando sua simplicidade, rapidez, flexibilidade e utilização de pequenas quantidades de amostras e de solventes (LAGANÁ et al., 2010). São poucos os relatos sobre o uso desta técnica de extração para a determinação de micotoxinas.

O método de QuEChERS foi antes utilizado para extrair agrotóxicos em matrizes a base de cereais, frutas e de água, vêm sendo adaptado para extração de micotoxinas, tais como tricotecenos e aflatoxinas (HEIDTMANN et al., 2012; BECKER-ALGERI, 2016). Como outros métodos de extração, emprega solventes e clarificantes, porém tem como vantagem a utilização de menores quantidades de reagentes e maior rapidez (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).

O procedimento de Soares e Rodrigues–Amaya (1989), que consiste num processo clássico de partição sólido líquido ainda é muito empregado para determinação de aflatoxinas em alimentos, pois apresenta recuperações que atendem aos requisitos de qualidade analítica em diferentes cereais, garantindo a limpeza da amostra e separação adequada. Sua simplicidade e custo fez com que fosse adotado em muitos laboratórios no Brasil, mas resulta numa quantidade grande de material para descarte (PRIETTO et al., 2015).

Em relação às técnicas para quantificação destes compostos, a cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE) é a mais simples e antiga para determinação de aflatoxinas uma vez que estas são fluorescentes quando observadas sob luz ultravioleta. Outras micotoxinas são mais difíceis para serem determinadas por esta técnica. Porém, novos equipamentos cromatográficos têm sido desenvolvidos, e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE) acoplada a detectores de fluorescência ou massa, que emprega colunas de fase reversa e como fases móveis misturas de água, metanol e acetonitrila, tem sido muito utilizada para determinar aflatoxinas (KRSKA; MOLINELLI, 2007). A detecção por fluorescência é por natureza muito específica e sensível para as aflatoxinas, pois estas emitem fluorescência azul e verde, representando uma vantagem para determinação quantitativa em que a influência da matriz é negligenciável em comparação com os possíveis problemas que podem surgir com a quantificação em CLAE-MS (CIGIC; PROSEN, 2009). A vantagem da detecção em espectrômetro de massa é permitir obter informação estrutural referente aos analitos, assegurando maior exatidão à determinação (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008)

A validação de um método analítico para determinação de traços é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica, pela padronização das condições instrumentais, e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência entre laboratórios. Estudos experimentais devem demonstrar que o método atende às exigências das especificidades analíticas recomendáveis, assegurando a confiabilidade dos resultados pela estimativa dos seguintes indicativos: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão adequados à análise. Estes indicativos devem ser avaliados tanto no instrumento quanto no método que será utilizado para a determinação de aflatoxinas nas diferentes matrizes alimentares (BRASIL, 2003).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Os reagentes e solventes empregados nos experimentos foram: albumina de soro bovino (Inlab), ácido acético P.A. (Merck), metanol grau CLAE (J. T. Baker), acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker), éter de petróleo P.A. (Neon), álcool etílico 95% (Dinâmica), clorofórmio P.A. (Neon), tolueno P.A. (CRQ), água destilada, água ultra pura (Milli- Q, resistividade de 18,2 MΩ cm), hidróxido de sódio P.A. (Cinética), ácido clorídrico P.A. (Vetec), iodo P.A. (Synth), cloreto de sódio P.A. (Synth), bicarbonato de sódio P.A. (Synth), sulfato de sódio P.A. (Vetec), ácido cítrico P.A. (Vetec), citrato de sódio P.A. (Synth), citrato de sódio tribásico (Sigma-Aldrich), acetato de sódio P.A. (Synth), dimetil sulfóxido P.A. (Neon), cloreto de potássio P.A. (Vetec), cloreto de amônio P.A. (Synth), cloreto de magnésio P. A. (Synth), cloreto de cálcio P. A. (Synth), tiocianato de potássio P.A. (Synth), ácido 3,5-dinitrosalicílico P.A. (Vetec), sulfato de amônio P.A. (Synth), sulfato de magnésio P.A. (Synth), fosfato de sódio monobásico (Vetec), fosfato de potássio dibásico P.A. (Synth), celite (Sigma Sul), C18 (Allcrom), alumina neutra (Merck), PSA (Sigma-Aldrich), ácido glucurônico P.A. (Sigma-Aldrich), ácido úrico P.A. (Sigma-Aldrich), cloridrato de glicosamina P.A. (Sigma-Aldrich), uréia (Sigma-Aldrich), glicose P.A. (Synth), mucina (de estômago suíno – Sigma-Aldrich), pepsina (Dinâmica), pancreatina (de pâncreas suíno – Sigma-Aldrich), lipase (pâncreas suíno – Sigma-Aldrich), bile (ovino e bovino),  $\alpha$  amilase (produzida por *Aspergillus oryzae*, 30U/mg, Sigma-Aldrich), amiloglicosidade (produzida por *Aspergillus niger*, 1,8 U/mL, Sigma-Aldrich) e protease (produzida por *Aspergillus oryzae*, 1 U/mL, Sigma-Aldrich).

Os principais equipamentos utilizados foram espectrofotômetro (UV-Vis modelo Cirrus 80, Femto; modelo SP220, Biospectro), balança analítica de precisão (modelo AY220, Marte), banho termostático com agitação (Quimis), banho ultrassônico (modelo Ultrasonic Cleaner, Unique), centrífuga refrigerada (modelo CT-5000R, Cientec), microcentrífuga (modelo Mini Spin, Eppendorf); agitador tipo vórtex (modelo VTX-2500, Biomixer), mesa agitadora orbital (modelo TE141, Tecnal); mufla (Quimis), pHmetro (modelo HI221, Hanna Instruments), peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica), bloco digestor (Oxylab), destilador (modelo TE0363, Tecnal), digestor (Gerhardt Kjeldatherm), estufa de secagem com circulação de ar (modelo Q314M222, Quimis), extrator Soxhlet (modelo Q30826B, Quimis), cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu com detector de fluorescência (modelo RF20A) conectado em software LC solution data acquisition.

## 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de arroz tipo 1, classe longo fino (integral, parboilizado e polido) foram aleatoriamente adquiridas no comércio da região sul do Brasil, sendo usado como critério, a marca com preço médio dentre as disponíveis no comércio da região. O material adquirido foi separado, identificado e acondicionados em sacos de polietileno no laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da FURG, sendo mantidas sob congelamento até sua utilização.

As amostras in natura foram trituradas em moinho de martelos e peneiradas para a granulometria inferior a 0,5 mm (35 mesh) antes da tomada de alíquotas analíticas para as determinações químicas.

## 4.3 PREPARO DE PADRÕES

Os padrões de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> adquiridos da Sigma-Aldrich, foram mantidos sob temperatura de congelamento (-12 °C), devidamente protegido da luz e vedado até o preparo das soluções. As soluções padrão foram preparadas segundo procedimento oficial, pela dissolução dos padrões sólidos em mistura tolueno:acetonitrila (98:2 v/v). As concentrações teóricas das soluções estoque foram de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> para cada aflatoxina. Essas soluções estoque foram diluídas para o preparo de soluções padrão contendo 10 µg.mL<sup>-1</sup>. As soluções foram secas sob atmosfera de nitrogênio e ressuspensas em metanol para determinação da concentração em espectrofotômetro (Biospectro – SP220) nos comprimentos de onda de 360 nm para a AFB<sub>1</sub> e 362 nm para as demais. A estimativa das concentrações foi realizada utilizando os valores de absorvidade molar (ε) 19800, 20900, 17100 e 18200 mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente. As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas após evaporação do solvente a -18°C (AOAC, 2000).

## 4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química das amostras de arroz integral, parboilizado e branco polido in natura foi avaliada pela determinação dos componentes: umidade, cinzas, proteína bruta e extrato etéreo, seguindo os métodos descritos pela “Association of Official Analytical Chemist International” – AOAC (2000). A umidade foi determinada empregando o método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C (n° 935.29). A determinação de cinzas foi realizada por método gravimétrico pela incineração das amostras em forno mufla a 560 °C (n° 923.03).

O teor de lipídios foi determinado pela extração com solvente éter de petróleo em extrator tipo Soxhlet (n° 920.85). Os níveis proteicos foram determinados pelo método de Kjeldahl, empregando fator de conversão para proteínas de 5,95 para o arroz (920.87).

O teor de amilose foi determinado pelo método colorimétrico do iodo, que se baseia na transmissão da luz pelo complexo colorido que a amilose forma ao reagir com iodo, de acordo com o método descrito por Martinez e Cuevas (1989). Uma amostra de 100 mg foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, sendo acrescentada de 1 mL de álcool etílico 96% e 9 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH 1 M), seguindo-se em repouso por 16 horas para a hidrólise parcial do amido. Foi retirada uma alíquota de 5 mL de cada amostra e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em que foi adicionado 1 mL de ácido acético 1M e 2 mL de solução de iodo 2% (p/v) preparada três horas antes da análise, então, o balão volumétrico foi avolumado com água destilada.

Para a construção da curva padrão, foram utilizados 40 mg de amilose pura submetida ao mesmo procedimento que as amostras de arroz. Alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL foram retiradas do balão volumétrico e foram acrescentados de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL de ácido acético e 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2 mL de iodo, respectivamente, completando o volume a 100 mL com água destilada. A leitura de transmitância das soluções foi realizada 30 min após adição da solução de iodo a 610 nm.

#### 4.5 TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO PRODUTO

Os tratamentos hidrotérmicos consistiram em tomar 20 g de arroz (integral, parboilizado e branco polido), adicionar 0,2 g de cloreto de sódio (NaCl); 0,4 g de óleo de soja comercial e quantidade suficiente de água destilada para atingir textura característica de arroz cozido quando submetidas a aquecimento em chapa térmica e micro-ondas cozido (Tabela 3). Para verificar o atingimento desta textura foi usado um teste qualitativo após ebulição em intervalos de 2 em 2 minutos. Ele consistia em pressionar o grão de arroz entre duas placas de vidro até que o centro do grão estivesse completamente gelatinizado, ou seja, transparente (JULIANO; BETCHEL, 1985).

**Tabela 3** - Condições para tratamento hidrotérmico de arroz.

Variáveis	Micro-ondas			Chapa Térmica		
	Arroz integral	Arroz parboilizado	Arroz branco polido	Arroz integral	Arroz parboilizado	Arroz branco polido
<b>Volume de água (mL)</b>	160	100	90	60	50	50
<b>Temperatura (°C)</b>	-	-	-	180	180	180
<b>Tempo (min)</b>	15	10	8	25	20	15
<b>Potência (W)</b>	656	656	656	-	-	-

Para definir as condições de tratamento hidrotérmico de forma mais objetiva, tanto em chapa térmica, quanto em micro-ondas, foram adotados os parâmetros de textura determinada em texturômetro modelo TA XT2, utilizando o *software Exponent* da *Stable Micro System*. Foi utilizado uma célula de carga de 5 g com uma compressão de dois ciclos para comprimir 80% da espessura original do grão cozido, retornar à sua posição original e novamente comprimir. A velocidade de pré-teste e pós-teste de  $1 \text{ mm.s}^{-1}$ , velocidade de teste de  $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$  e distância inicial de teste de 20 mm (MEULLENET et al., 1997; PARK; KIM; KIM, 2001).

Os parâmetros determinados, conforme descrito por Bourne (2002), foram:

- Dureza: definida como a força máxima requerida para comprimir a amostra numa dada porcentagem pré-estabelecida, em N;
- Adesividade: definida como a força necessária para remover o alimento que adere na língua, nos dentes e nas mucosas, em  $\text{N.s}^{-1}$ .
- Gomosidade: definida como a energia requerida para desintegrar um alimento semissólido para um estado pronto para ser ingerido, sem mastigar, em N;
- Mastigabilidade: definida como o número de mastigações necessárias para tornar a consistência do alimento adequada para ser engolido, em  $\text{N.mm}^{-1}$ ;
- Elasticidade: definida como o grau que o alimento retoma a sua forma após uma compressão parcial da língua contra os dentes ou o céu da boca, em mm.

Antes das determinações químicas as amostras tratadas hidrotermicamente foram amassadas em gral com auxílio de um pistilo, sendo a pasta passada em peneira para terem seu tamanho reduzido a 0,5 mm (35 mesh).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES DE AMIDO DISPONÍVEL E RESISTENTE

A determinação de amido disponível e resistente foi realizada segundo o método da AOAC 996.11 modificado por Walter, Silva e Emanuelli (2005) para as amostras de arroz integral, parboilizado e branco polido submetidas aos tratamentos hidrotérmico (micro-ondas e chapa térmica) imediatamente após resfriamento e após 48 horas de tratamento térmico.

Em tubo de centrífuga foram adicionados 0,3 g de amostra e 10 mL de etanol 80% a 80 °C para remover açúcares livres e lipídeos, seguido por centrifugação a 3220 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento realizado mais uma vez. As amostras foram submetidas à hidrólise com 180 µL de  $\alpha$ -amilase (30 U.mg<sup>-1</sup>); 0,2 mL de etanol 80% e 6 mL de tampão citrato pH 6,0. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e incubada à 50 °C por 5 minutos. A etapa seguinte consistiu em uma hidrólise com 25 µL de protease (1 U.mL<sup>-1</sup>), a mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e incubada à 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 3,0 mL de amiloglicosidase (1,8 U.mL<sup>-1</sup>) e 4 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5; a mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e incubada à 50 °C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas (10 minutos a 3220 x g) e o resíduo lavado com 10 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5 e centrifugado novamente (10 minutos a 3220 x g). O sobrenadante das duas centrifugações foram utilizados para determinação de amido disponível.

Ao resíduo foi adicionado 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), após repouso por 5 minutos a 95 °C, o conteúdo foi submetido à hidrólise com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase nas mesmas condições anteriores. As amostras foram centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para determinação de amido resistente. Para a quantificação dos teores de amido disponível e resistente foi utilizado o método DNS (MILLER, 1959). A quantidade de glicose liberada foi convertida para amido utilizando o fator de conversão de 0,9.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS

##### 4.7.1 Métodos de extração

Para a extração de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> nas amostras de arroz foi comparada a eficiência de três métodos de extração: conforme Soares e Rodrigues – Amaya (1989), método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) modificado por

Koesukwiwat, Sanguankaew e Leepipatpiboon (2014) e a técnica MSPD (Dispersão de matriz em fase sólida) segundo Rubert, Soler e Mañes (2011). Para a padronização da extração uma amostra de arroz branco polido *in natura* foi fortificada com padrão de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> nas concentrações do LOQ, 5xLOQ e 10xLOQ ng.mL<sup>-1</sup> (Tabela 4). O arroz branco polido foi escolhido para padronizar o método de extração por apresentar maior teor de amido resistente nas determinações preliminares. O método de extração que promoveu maior recuperação das AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foi validado.

**Tabela 4** – Níveis de fortificação das amostras.

	AFB <sub>2</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	AFB <sub>1</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	AFG <sub>1</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	AFG <sub>2</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )
LOQ	0,06	0,02	0,04	0,05
5xLOQ	0,3	0,1	0,2	0,25
10xLOQ	0,6	0,2	0,4	0,5

a) Método de Soares; Rodrigues – Amaya (1989) modificado

A extração por este método consistiu em adicionar a 1g de arroz branco polido *in natura*, 6 mL de solução de metanol: cloreto de potássio 4% na proporção 9:1. Essa mistura foi agitada em sonda ultrassônica por 5 minutos a 60 Hz. Em seguida foi centrifugada por 5 minutos a 3220 x g e 3 mL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de centrífuga, sendo adicionados 3 ml de sulfato de amônio 30% e 1 cm<sup>3</sup> de celite para a clarificação do extrato. Após repouso de 5 minutos, o conteúdo foi centrifugado (3220 x g). Em seguida, 3 mL do sobrenadante foram recolhidos e transferidos para outro tubo de centrífuga onde foram adicionados 3 mL de água e particionados 3 vezes com 1 mL de clorofórmio. A fração clorofórmica foi acondicionada em frascos âmbar com tampa de rosca e o conteúdo seco em banho-maria a 80 °C por 25 minutos (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Para a quantificação das aflatoxinas, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura e acetoneitrila (9:1 v/v) e 20 µL foram injetados em HPLC-FL, conforme item 4.7.2.

b) Método QuEChERS

Em 10 g de arroz branco polido *in natura* foram adicionados 10 mL de água destilada e 10 mL de acetoneitrila acidificada com 1% de ácido acético glacial. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e após em cuba ultrassônica por 2 minutos a 60 Hz. Em seguida foram

adicionados 4 g de sulfato de magnésio, 1 g de cloreto de potássio, 1 g de citrato de sódio tribásico di-hidratado e 0,5 g de citrato de sódio dibásico ses-quihidratado. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos a 3220  $x$  g. Uma alíquota de 8 mL do sobrenadante foi transferida para outro tubo de centrifuga com adição de 1,2 g de sulfato de magnésio, 0,25 g de C18, 0,25 g de alumina neutra e 0,4 g de PSA (Amina primária secundária), a mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e centrifugada novamente. Foram coletados 5 mL do sobrenadante que foram secos em banho-maria a 60 °C (KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2014). Para a quantificação das aflatoxinas, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura e acetonitrila (9:1 v/v) e 20  $\mu$ L foram injetados em HPLC-FL, conforme item 4.7.2

### c) Método MSPD adaptado

Em um graal de porcelana, 1 g de arroz branco polido *in natura* foi macerado suavemente com a combinação de suporte sólido e sal (Tabela 5) durante 5 minutos utilizando um pistilo para obter uma mistura homogênea. A mistura foi transferida para tubos de centrifuga com adição de com 10 mL de acetonitrila:metanol (50:0 v/v) e o conteúdo foi agitado em vórtex por 3 min. Após centrifugação (10 minutos a 3220  $x$  g) foi retirada uma alíquota de 5 mL do sobrenadante que foi seca em banho-maria a 60 °C. Para a quantificação das aflatoxinas, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura e acetonitrila (9:1 v/v) e 20  $\mu$ L foram injetados em HPLC-FL conforme item 4.7.2.

Este método de extração e limpeza de extrato teve estudada as combinações entre suporte sólido e sais para promover maior recuperação das micotoxinas

**Tabela 5** – Combinações de suporte sólido e sais para a técnica MSPD.

Teste	Varição de suporte sólido e sal
1	0,025 g C18
2	0,25 g C18
3	0,25 g PSA
4	0,25 g C18 + 0,25 g PSA
5	0,25 g C18 + 0,25 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
6	0,25 g PSA + 0,25 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
7	0,25 g C18 + 0,25 g PSA + 0,25 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

#### 4.7.2 Quantificação de aflatoxinas em CLAE-FL

A quantificação das aflatoxinas foi realizada em cromatógrafo à líquido de alta eficiência (Shimadzu – CTO-20AC) acoplado a um detector de fluorescência (FL), unidade de derivatização pós coluna (Romer®) para intensificar o sinal das AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>. A coluna utilizada foi a Kromasil C18 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm). Para eluição das aflatoxinas foi utilizada uma fase móvel constituída por uma mistura de água ultrapura, acetonitrila e metanol na proporção de 62:12:26 (v/v/v), previamente desgaseificada em banho ultrassônico, com vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 40 °C e tempo de corrida de 16 minutos. O comprimento de onda de excitação foi de 360 nm e emissão de 435 nm. Para detecção os extratos foram ressuspensos em 1 mL de água ultrapura e acetonitrila (9:1), centrifugado a 1400 x g por 5 minutos e 20 µL foram injetados no equipamento.

#### 4.7.3 Validação de método analítico

O método que apresentou melhor percentual de recuperação foi o teste 5 da combinação de suporte sólido e sal na extração MSPD (0,25 g C18 + 0,25 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Assim este foi validado para os três tipos de arroz (integral, parboilizado e branco polido) na forma *in natura* e tratados hidrotermicamente (micro-ondas e chapa térmica). Nas amostras *in natura* e tratadas hidrotermicamente foi utilizada a massa de 1 g. A validação do método para determinação das AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foi realizada utilizando as seguintes figuras de mérito: curva analítica, linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade) e efeito de matriz (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; EC, 2006).

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do instrumento foram estimados pela injeção de soluções padrão das aflatoxinas em ordem decrescente de concentração, considerando o LOD a concentração correspondente ao pico que representa 3 vezes o sinal/ruído da linha de base do equipamento. O LOQ foi estimado a partir da concentração que gerou o pico com relação 10 vezes o sinal/ruído. Os limites de detecção e quantificação do método foram estimados considerando as diluições do procedimento de preparo da amostra.

A linearidade do instrumento foi avaliada pela construção da curva analítica por meio de soluções padrão das quatro aflatoxinas em mistura de água ultrapura e acetonitrila (9:1 v/v), injetados em triplicata, sendo o primeiro ponto da curva a concentração correspondente ao limite de quantificação.



A exatidão do método (Equação 1) foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação das aflatoxinas em amostras fortificadas em três níveis (LOQ, 5 x LOQ e 10 x LOQ) na forma *in natura* e tratada hidrotérmicamente nas quais os padrões foram adicionados após o cozimento, seguindo orientações para validação de método.

$$R (\%) = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Em que:

*C1* = concentração determinada na amostra fortificada;

*C2* = concentração determinada na amostra não fortificada;

*C3* = concentração determinada no padrão fortificação.

A precisão foi avaliada pela estimativa da repetibilidade, verificada por 3 determinações em triplicata sucessivas das soluções de extrato empregadas para estimar a recuperação de aflatoxinas por CLAE-FL. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação entre os resultados obtidos (BRASIL, 2003).

Para avaliar o efeito de matriz na determinação das aflatoxinas, foram preparadas curvas padrão no extrato da matriz, adicionando-se as mesmas concentrações empregadas para as curvas no solvente. O efeito matriz foi determinado comparando o coeficiente angular das curvas padrão no solvente e no extrato das amostras conforme a Equação 2.

$$EM (\%) = 100 \times \left( 1 - \frac{Sm}{Ss} \right) \quad \text{Eq.2}$$

Onde:

EM - efeito de matriz;

Sm - inclinação da curva analítica preparada em extrato “branco” da matriz;

Ss - inclinação da curva analítica preparada em solvente.

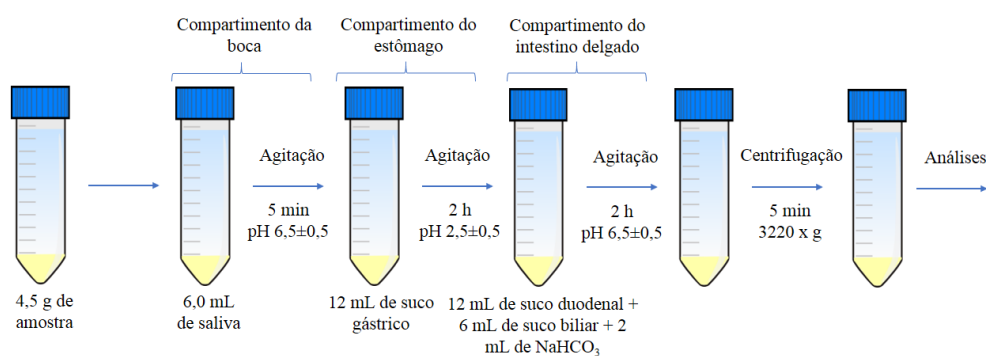
#### 4.8 BIOACESSIBILIDADE DE AFLATOXINAS

As amostras de arroz integral, parboilizado e branco polido foram fortificadas com solução padrão (10 x LOQ) de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, e submetidas ao tratamento hidrotérmico em condições previamente definidas no item 4.5 para posterior determinação da bioacessibilidade *in vitro*. O método utilizado foi o desenvolvido pelo Instituto Nacional de

Saúde Pública e Meio de Ambiente (RIVM, Bilthoven, Holanda) (KABAK; OZBEY, 2012; OOMEN et al., 2003; VERSANTVOORT et al., 2005), cujo modelo de digestão está baseado nas três principais etapas de digestão no organismo humano. Primeiramente, foi realizada simulação da fase inicial de digestão, mantendo as amostras em contato com saliva artificial (4,5:6,0 p/v) durante 5 minutos. Posteriormente as mesmas foram mantidas sob condições gástricas durante 2 horas, e por fim foi simulado a digestão no intestino delgado por 2 horas. Todas etapas foram realizadas na temperatura de 37° C.

Uma solução orgânica e uma inorgânica foram preparadas para a saliva, suco gástrico, suco duodenal e bile. Os constituintes e suas concentrações estão descritos na Tabela 6. A Figura 2 representa o modelo de digestão *in vitro*. Em um tubo de centrífuga foram adicionados 4,5 g de arroz tratado hidrotérmicamente (integral, parboilizado e branco polido) e 6 mL de saliva (pH 6,5±0,5) que foram incubados por 5 minutos a 37 °C. Em seguida, 12 mL de suco gástrico (pH 2,5±0,5) foram adicionados e a mistura submetida à agitação por 2 horas a 37 °C. Por fim, 12 mL de suco duodenal (pH 6,5±0,5), 6 mL de bile e 2 mL de bicarbonato de sódio 1M (NaHCO<sub>3</sub>) foram adicionados simultaneamente e a mistura foi agitada durante 2 horas a 37 °C. O digerido (sobrenadante) e não digerido (resíduo sólido) foram separados por centrifugação 5 minutos a 3220xg.

**Figura 2** – Esquema representativo da análise de bioacessibilidade *in vitro*.



Fonte: Adaptado de Kabak e Ozbey (2012).

O digerido foi avaliado quanto aos níveis de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, seguindo o método de extração descrito por Versantvoort et al. (2005), em que 20 mL do digerido foi transferido para um tubo de centrífuga e feita partição líquido-líquido com 5 mL de clorofórmio (3 vezes). As frações clorofórmicas foram coletadas após centrifugação (5 minutos a 3220 x g), transferidas para frasco âmbar e seca em banho-maria a 60 °C. A quantificação das aflatoxinas

foi realizada em CLAE-FL de acordo com o item 4.7.2. A bioacessibilidade foi calculada de acordo com a Equação 3.

**Tabela 6** - Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos do modelo de digestão *in vitro*.

	Saliva	Suco Gástrico	Suco Duodenal	Suco Biliar
<b>Solução Inorgânica</b>	10 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	15,7 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	40 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	30 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL KSCN 20 g.L <sup>-1</sup>	3 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g.L <sup>-1</sup>	40 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>	68,3 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88,8 g.L <sup>-1</sup>	9,2 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	10 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g.L <sup>-1</sup>	4,2 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>
	10 mL Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 57 g.L <sup>-1</sup>	18 mL CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>	6,3 mL KCl 89,6 g.L <sup>-1</sup>	150 uL HCl 37% g/g
	1,7 mL NaCl 175,3 g.L <sup>-1</sup>	10 mL NH <sub>4</sub> Cl 30,6 g.L <sup>-1</sup>	10 mL MgCl <sub>2</sub> 5 g.L <sup>-1</sup>	
	20 mL NaHCO <sub>3</sub> 84,7 g.L <sup>-1</sup>	6 mL HCl 37% g/g	180 uL HCl 37% g/g	
<b>Solução Orgânica</b>	8 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>	10 mL glicose 65 g.L <sup>-1</sup> 10 mL ácido glucurônico 2 g.L <sup>-1</sup> 3,4 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup> 10 mL glicosamina hidrócloride 33 g.L <sup>-1</sup>	4 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>	10 mL ureia 25 g.L <sup>-1</sup>
<b>Adicionar à mistura orgânica + inorgânica</b>	290 mg α-amilase	1 g BSA	9 mL CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>	10 mL CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O 22,2 g.L <sup>-1</sup>
	15 mg ácido úrico	2,5 g pepsina	1 g BSA	1,8 g BSA
	25 mg mucina	3 g mucina	9 g pancreatina	30 g bile
			1,5 g lipase	
<b>pH</b>	6,8 ± 0,2	1,3 ± 0,02	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

As soluções orgânicas e inorgânicas foram aumentadas para 500 mL com água destilada. Após misturar a solução orgânica e inorgânica, alguns constituintes foram adicionados e dissolvidos. Quando necessário, o pH foi ajustado para o intervalo apropriado.

Fonte: Adaptado de Versantvoort et al. (2005).

$$\text{Bioacessibilidade} = \frac{\text{Concentração do composto determinado no sobrenadante (ng)}}{\text{Concentração composto adicionado antes da digestão (ng)}} \times 100 \quad \text{Eq.3}$$

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram avaliadas as médias dos experimentos realizados em triplicata e a significância de suas diferenças, empregando o teste de Tukey ao nível de significância de ( $p < 0,05$ ) empregando o programa *Statistica 7.0* no seu modo Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança. A correlação entre os níveis de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> e amido resistente foi avaliada por técnica multivariada análise de componentes principais (ACP) empregando o programa *Past 3.0*, ao nível de significância  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição dos alimentos influencia diretamente a contaminação fúngica e a produção de micotoxinas (MILANI, 2013). O arroz é constituído principalmente por amido, contendo menores níveis de proteínas, lipídeos e cinzas (Tabela 7). Com relação ao principal componente da composição química, o amido, pode ser classificado em amido disponível e amido resistente, ambas as frações são determinadas pela relação amilose e amilopectina, características varietais, tipo de beneficiamento e preparo para consumo (WALTER; SILVA; EMANUELLI, 2005).

**Tabela 7** – Composição química do arroz integral, parboilizado e branco polido em base seca.

Tipo arroz	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Cinzas	Amido	Amilose	Amilopectina	Amilose/
	(%)	(%)	(%)	(%)	Total (%)	(%)	(%)	Amilopectina
<b>Integral</b>	11,3 <sup>b</sup> (1,8)	10,0 <sup>a</sup> (7,0)	3,8 <sup>a</sup> (5,0)	1,2 <sup>a</sup> (8,3)	70,9 <sup>a</sup> (4,4)	17,1 <sup>b</sup> (2,4)	53,8 <sup>a</sup> (2,6)	0,31
<b>Parboilizado</b>	11,8 <sup>a</sup> (2,8)	9,5 <sup>a</sup> (7,7)	0,6 <sup>b</sup> (7,7)	0,5 <sup>b</sup> (6,8)	71,0 <sup>a</sup> (3,3)	22,0 <sup>a</sup> (11,9)	49,0 <sup>b</sup> (4,7)	0,44
<b>Br. Polido</b>	11,7 <sup>a</sup> (1,0)	8,0 <sup>a</sup> (4,4)	0,3 <sup>b</sup> (4,3)	0,3 <sup>c</sup> (7,0)	71,8 <sup>a</sup> (1,3)	19,2 <sup>ab</sup> (2,2)	52,6 <sup>a</sup> (6,8)	0,36

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa  $p < 0,05$  entre as amostras.

A composição química das amostras de arroz integral, parboilizado e branco polido coletados neste trabalho foi semelhante aos valores encontrados por outros autores e segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011). As pequenas diferenças se devem a efeitos varietais, ambientais, de manejo, beneficiamento e armazenamento... O grão de arroz possui maiores concentrações de proteínas, lipídeos, fibras, minerais e vitaminas nas camadas externas, enquanto que o centro apresenta maior concentração de amido. O polimento, que origina o arroz branco polido, reduz o teor de nutrientes, exceto de amido (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008), conforme se observa nas diferenças na composição entre o arroz integral e o branco polido...

O teor de umidade dos grãos de arroz é de determina a conservação e manutenção da qualidade pois interfere com as alterações endógenas e exógenas dele. Este teor de umidade pode ser afetado pelo principalmente pelo processo de secagem, acondicionamento e

armazenamento dos grãos. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o limite máximo de umidade recomendável para grãos de arroz beneficiado é de 14%. Salientando-se que as amostras estudadas atendem este parâmetro, pois o maior percentual de umidade foi de 11,8% para o arroz parboilizado, que pelo beneficiamento passa por imersão em água aquecida (BRASIL, 2009).

O arroz integral não apresentou conteúdo proteico significativamente maior que nos demais, o que poderia ter ocorrido pelo fato de as proteínas estarem concentradas nas camadas externas do grão e este constituinte diminui proporcionalmente como o grau de polimento. O conteúdo de lipídeos do arroz branco polido é menor que 1% (0,3%), entretanto o arroz integral contém 3,8% pois nele está presente parte do farelo, a camada periférica e gérmen do grão que é reduzido após o polimento.

Quanto ao conteúdo mineral foi observado um teor aumentado dele no arroz parboilizado (0,5%) quando comparado ao arroz branco polido (0,3%), pois ocorre a migração de minerais das camadas externas para o endosperma durante o processo de parboilização. O arroz integral destacou-se pelo conteúdo de minerais, pois ao não ser submetido a processo de polimento retém parte das camadas externas do grão nas quais os minerais (STORCK; SILVA; FAGUNDES, 2005).

O amido é o principal constituinte dos cereais e a fonte mais importante de carboidrato na alimentação da população de algumas regiões do planeta, também estão presentes açúcares livres e fibra. Os teores de amido determinados foram 70,9%; 71 % e 71,8% para o arroz integral, parboilizado e branco polido, respectivamente. A concentração de amido no arroz pode variar devido a fatores genéticos e ambientais, como observado por Frei, Sidduhuraju e Becker (2003), que obteve teores de amido entre 72 e 82% em diferentes cultivares de arroz integral.

Os teores médios de amilose foram de 17,1%; 22% e 19,2% para o arroz integral, parboilizado e branco polido, respectivamente. Kennedy e Burlingame (2003) determinaram o teor de amilose em 2000 variedades de arroz e relataram uma variação de 0,5 a 33%. O arroz pode ser classificado de acordo com o conteúdo de amilose, em ceroso (1-4%), baixo conteúdo de amilose (12-19%), com conteúdo intermediário (20-24%) ou com alto conteúdo (25-32%) (JULIANO, 2003). Essa característica é muito importante para fins tecnológicos, pois ocorre uma relação direta entre o conteúdo de amilose e a formação de amido resistente, que influencia a digestibilidade do alimento e as próprias características dos produtos aonde são utilizados.

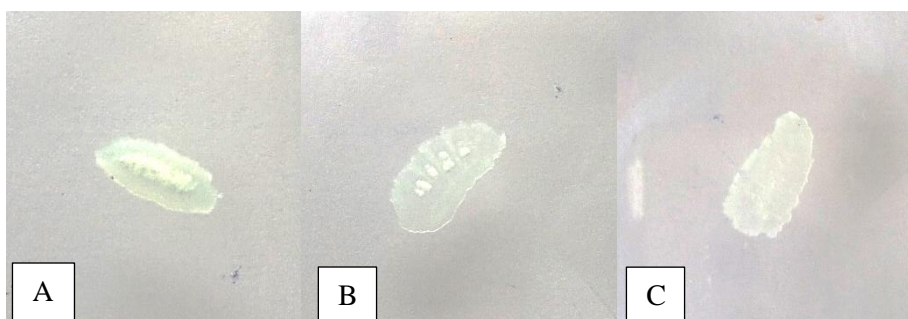
A amilopectina tem papel principal na cristalinidade dos grânulos de amido. Altas temperaturas de gelatinização têm sido relatadas como resultantes do alto grau de amilopectina,

que fornece estabilidade estrutural aos grânulos e maior resistência a gelatinização. A presença de amilose reduz o ponto de fusão das regiões cristalinas e a energia para iniciar a gelatinização, pois as cadeias de amilopectina requerem uma maior temperatura para dissociar completamente, do que aquela requerida para cadeia de duplas hélices de amilose (SINGH et al., 2003).

## 5.2 TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

Para que as amostras de arroz fossem consideradas cozidas foi necessário a completa gelatinização dos grânulos de amido presentes no grão. Preliminarmente foi empregado um teste qualitativo que consistia em pressionar o grão cozido entre duas placas de vidro. Quando os grãos estivessem totalmente transparentes, foram então considerados cozidos (Figura 3). Foram testadas neste procedimento as condições descritas na Tabela 3. Assim foi definido o volume de água e tempo de tratamento hidrotérmico (chapa térmica e micro-ondas) para cada tipo de arroz.

**Figura 3** – Arroz branco polido tratado hidrotérmicamente em chapa térmica



Arroz branco polido tratado hidrotérmicamente em chapa térmica. Tempos de tratamento: A - 5 minutos, B - 10 minutos e C - 15 minutos.

O teste visual das placas é subjetivo, fato que é relacionado às preferências de consumo de arroz em cada região. Por exemplo, os japoneses preferem o arroz mais úmido e glutinoso, enquanto no Brasil as pessoas preferem os grãos cozidos e soltos. Fatos que dificultam um procedimento padrão de cozimento do arroz de forma a garantir a confiabilidade nas determinações feitas no material e as inferências nutricionais e/ou tecnológicas relativas ao tratamento hidrotérmico. Neste sentido, o teste é adequado para avaliar a textura de cozimento conforme a preferência nacional. Cabe salientar que a expansão do volume, a absorção de água e a resistência à desintegração do arroz beneficiado durante o cozimento, estão diretamente

relacionadas com a proporção de amilose/amilopectina no grão submetido ao tratamento hidrotérmico (SINGH et al., 2003).

No estudo foi verificado que o volume de água utilizado no tratamento hidrotérmico em micro-ondas foi maior quando comparado ao em chapa térmica. Isto se deve à maior evaporação de água durante o cozimento, pois ocorre o atrito molecular gerado pela rotação dipolar das moléculas polares na presença de um campo elétrico modificado. Também foram observadas diferenças nos volumes de água necessários para cozimento dos diferentes tipos de arroz. O integral e o parboilizado precisaram de maior quantidade de água nos dois tratamentos, isso se deve a presença do farelo (pericarpo, aleurona e tegumento) que diminuem a difusão da água para o centro do grão no caso do primeiro e no caso do arroz parboilizado o processamento propicia uma estrutura mais rígida quando comparado com o arroz branco polido, pois durante o tratamento de encharcamento ocorre um rearranjo nas cadeias de amilose e amilopectina (MOHAPATRA; BAL, 2006).

O tempo de tratamento em micro-ondas para que ponto de cozimento fosse alcançado foi menor, pois a distribuição da energia é mais eficiente que no aquecimento convencional, atingindo maior profundidade na camada de amostra no recipiente aonde está sendo tratada, assegurando homogeneidade de encharcamento e cozimento. O arroz integral nos dois tratamentos necessitou maior tempo para atingir o ponto “cozido”, uma vez que as camadas externas do pericarpo estão associadas ao endosperma, dificultando a transferência de energia e massa.

Para que o ponto para considerar o produto cozido não fosse afetado pela subjetividade da determinação qualitativa, as amostras cozidas foram caracterizadas em texturômetro (Tabela 8).

A dureza expressa a força máxima requerida para comprimir a amostra numa dada percentagem pré-estabelecida, enquanto que a adesividade indica a força necessária para remover o alimento que adere na língua, dentes e mucosas. Os maiores valores de dureza foram observados no arroz parboilizado, resultado da gelatinização do amido no processo de parboilização (encharcamento) (PARKER; RING, 2001). Segundo Swasdisevi et al. (2010), o aumento da dureza é provocado pelo maior grau de gelatinização durante o encharcamento no processo de parboilização. Villanova e colaboradores (2014) obtiveram 54,61 e 56,78 N de dureza para o arroz integral e parboilizado, respectivamente, quando trataram termicamente em chapa térmica. Cabe salientar que não foram encontrados na literatura parâmetros para definir a textura para o tratamento hidrotérmico em micro-ondas, embora este seja uma medida inovadora para definir o ponto de cozimento de arroz, não foi possível realizar comparação dos



resultados obtidos no presente trabalho com outros autores que estudaram tratamento hidrotérmico.

**Tabela 8** – Perfil de textura do arroz integral, parboilizado e branco polido tratados hidrotermicamente.

		Dureza (N)	Adesividade (N.s <sup>-1</sup> )	Gomosidade (N)	Magastibilidade (N.mm <sup>-1</sup> )	Elasticidade (mm)
Micro-ondas	Integral	95,10 <sup>b</sup> (4,4)	-0,73 <sup>a</sup> (18,0)	18,20 <sup>b</sup> (13,2)	9,96 <sup>b</sup> (12,8)	0,07 <sup>ab</sup> (11,9)
	Parboilizado	136,14 <sup>a</sup> (10,9)	-1,12 <sup>a</sup> (7,2)	36,42 <sup>a</sup> (2,0)	26,21 <sup>a</sup> (18,0)	0,10 <sup>a</sup> (14,0)
	Branco Polido	131,75 <sup>a</sup> (12,2)	-3,19 <sup>bc</sup> (5,4)	31,62 <sup>a</sup> (1,3)	8,40 <sup>bc</sup> (4,1)	0,10 <sup>a</sup> (14,7)
Chapa Térmica	Integral	54,94 <sup>cd</sup> (1,9)	-4,17 <sup>c</sup> (3,6)	8,19 <sup>bc</sup> (13,8)	1,29 <sup>bc</sup> (3,5)	0,05 <sup>b</sup> (12,0)
	Parboilizado	66,61 <sup>c</sup> (5,4)	-2,93 <sup>ab</sup> (17,4)	10,65 <sup>bc</sup> (2,9)	5,20 <sup>bc</sup> (1,4)	0,06 <sup>ab</sup> (13,9)
	Branco Polido	32,67 <sup>d</sup> (17,3)	-4,83 <sup>c</sup> (13,3)	3,61 <sup>c</sup> (4,4)	0,18 <sup>c</sup> (0,1)	0,03 <sup>b</sup> (15,1)

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa  $p < 0,05$  entre as amostras.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES DE AMIDO DISPONÍVEL E RESISTENTE

A determinação de amido disponível e resistente foi realizada para as amostras de arroz integral, parboilizado e branco polido submetidas aos tratamentos hidrotérmico (micro-ondas e chapa térmica) logo após o cozimento e após resfriamento por 48 horas (Tabela 9).

**Tabela 9** – Frações de amido disponível e resistente do arroz integral, parboilizado e branco polido tratados hidrotermicamente.

		0 horas (após cocção)		48 horas (resfriada)	
		Amido resistente (mg.g <sup>-1</sup> )	Amido disponível (mg.g <sup>-1</sup> )	Amido resistente (mg.g <sup>-1</sup> )	Amido disponível (mg.g <sup>-1</sup> )
Micro-ondas	Integral	61,6 <sup>c</sup> (4,97)	569,4 <sup>ab</sup> (1,99)	72,9 <sup>c</sup> (2,53)	662,9 <sup>a</sup> (2,51)
	Parboilizado	71,8 <sup>c</sup> (5,80)	519,0 <sup>b</sup> (1,60)	84,7 <sup>bc</sup> (5,80)	550,1 <sup>ab</sup> (2,11)
	Branco Polido	84,9 <sup>bc</sup> (6,05)	539,2 <sup>ab</sup> (3,05)	119,5 <sup>a</sup> (3,12)	550,1 <sup>ab</sup> (2,97)
Chapa Térmica	Integral	81,7 <sup>bc</sup> (6,76)	598,4 <sup>ab</sup> (3,08)	65,1 <sup>c</sup> (5,37)	583,8 <sup>ab</sup> (2,19)
	Parboilizado	83,1 <sup>bc</sup> (5,21)	599,2 <sup>ab</sup> (2,82)	76,4 <sup>c</sup> (9,37)	648,0 <sup>ab</sup> (1,90)
	Branco Polido	138,1 <sup>a</sup> (3,59)	580,2 <sup>ab</sup> (3,57)	111,8 <sup>ab</sup> (1,52)	600,9 <sup>ab</sup> (1,31)

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa  $p < 0,05$  entre as amostras.

Para verificar o efeito dos tratamentos os dados da determinação de amido resistente e não resistente foram empregados numa análise de variância trifatorial, sendo o fator 1 os tratamentos (micro-ondas e chapa térmica), o fator 2 o tempo de armazenamento (logo após o tratamento e refrigerado por 48 horas) e o fator 3 o tipo de arroz (integral, parboilizado e branco polido). Ao analisar os resultados de amido disponível, o valor de  $p$  para os efeitos do fator tratamento é menor que 0,05, ou seja, são significativos, assim o tratamento hidrotérmico sofre influência do tipo de equipamento utilizado, micro-ondas ou chapa térmica. Também a interação entre tratamento e tipo de arroz também foi significativa ( $p < 0,05$ ).

Os fatores tratamento e tipo de amostra tem efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) e as interações tratamento e amostra, tratamento e tempo de armazenamento e tratamento, tempo e amostra também são significativas, ou seja, influenciam na variável resposta amido resistente.

O arroz branco polido apresenta maior teor de amido resistente ( $138,1 \text{ mg.g}^{-1}$ ) quando submetido ao tratamento hidrotérmico em chapa térmica e este é determinado logo após o cozimento. Isto é atribuído ao fato que neste caso ocorre a transferência de calor por condução, enquanto que no micro-ondas o fenômeno de transferência de calor se dá pela irradiação, gerando o atrito molecular pela rotação dipolar das moléculas polares na presença de um campo elétrico modificado promovido por ondas eletromagnéticas (INCROPERA; DEWITT, 2014). Portanto o cozimento em micro-ondas permite uma distribuição uniforme do calor, conseqüentemente a cocção também, tornando o amido mais disponível que resistente.

Com o tratamento hidrotérmico em micro-ondas em seguida ao cozimento e após 48 horas de resfriamento, o arroz branco polido apresentou maior teor de amido resistente, demonstrado por um acréscimo de 3,4 %, atribuído ao processo de retrogradação. Quando o arroz gelatinizado foi armazenado e resfriado, as moléculas do amido perderam energia e as interações de hidrogênio se tornam mais fortes, assim, as cadeias começam a se reassociar em um estado mais ordenado, com formação de simples e duplas hélices, formando áreas cristalinas e resistentes a digestão enzimática, característico do amido resistente tipo 3. Este é o fenômeno de retrogradação que depende de vários fatores como temperatura de armazenamento e tempo, pH, fonte de amido, presença de componentes não amiláceos e condições de processamento. As principais conseqüências da retrogradação são na textura, aceitabilidade e digestibilidade dos alimentos que contém amido.

Rosin, Lajolo e Menezes (2002) determinaram amido resistente em amostras de arroz, submetendo-os ao cozimento e refrigeração a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 dias, verificando que as condições de armazenamento elevaram o teor de amido resistente, de 2,6 para 5,5% no arroz integral e de 2,4 para 3,4% no arroz branco.

O conteúdo de amido resistente nos dois tratamentos para o arroz parboilizado não diferiu significativamente do arroz integral ( $p < 0,05$ ). Cabe salientar que no arroz integral o amido é tipo b – cristal, amido resistente tipo 2, que é altamente resistente a amilase, o arroz parboilizado se caracteriza pelo amido resistente tipo 3, encontrado em alimentos processados, onde ocorre a modificação da estrutura do amido, tornando a digestão mais lenta (CASIRAGHI et al., 1993). Chung, Liu e Hoover (2009) também relataram níveis mais altos de amido resistente em amidos de alto teor de amilose, como ervilhas e lentilhas em comparação com o amido de milho. Um estudo realizado por Helbig e colaboradores (2008) com arroz de alto (31,6%), médio (21,84%) e baixo (6,31%) teor de amilose, mostrou que os maiores teores de amido resistente foram obtidos para amostras com médio teor de amilose.

Amostras de arroz com alto (31,6%), médio (21,8%) e baixo (6,3%) teor de amilose foram parboilizadas e armazenadas por 30, 60 e 120 dias. A determinação de amido resistente foi realizada no arroz branco polido e no parboilizado, em grãos crus e cozidos, e no arroz parboilizado cru armazenado. Os resultados indicaram que o processo de parboilização resulta em aumento do teor de amido resistente em arroz de baixo teor de amilose, e provoca diferenças na composição centesimal em relação ao arroz branco polido. O aumento do tempo de armazenamento de arroz parboilizado provoca diminuições no teor de amido resistente. A cocção aumenta o teor de amido resistente no arroz branco polido, mas não interfere no arroz parboilizado. A secagem de arroz cozido não altera esses teores se os grãos forem beneficiados pelo processo convencional de arroz branco polido, ou se forem parboilizados obtidos de grãos de alto e de médio teor de amilose (HELBIG et al., 2008).

O arroz parboilizado quando tratado hidrotérmicamente em chapa térmica e refrigerado por 48 horas tem seu conteúdo de amido resistente reduzido, o mesmo não ocorre quando tratado em micro-ondas, assim o processo de parboilização e tipo de tratamento hidrotérmico influenciam no conteúdo de amido resistente.

#### 5.4 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE AFLATOXINAS

A escolha do método de extração utilizado para a validação do método em amostras de arroz *in natura* e tratados hidrotérmicamente, foi realizada a partir dos resultados de recuperação (%) e coeficiente de variação (CV) (%) (Tabela 10) obtidos com os métodos testados em arroz branco polido cru (item 4.7.1).

**Tabela 10** – Recuperação das aflatoxinas em arroz branco polido *in natura* em diferentes métodos.

Método	AFB <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFG <sub>2</sub>	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
<b>Soares</b>	17,9	16,1	59,6	11,4	116,6	35,3	99,9	13,8
<b>QuEChERS</b>	14,3	23,4	20,9	13,5	16,6	17,9	23,8	40,3
<b>MSPD (Teste 1)</b>	35,4	8,9	30,3	10,4	43,3	23,4	28,0	19,9
<b>MSPD (Teste 2)</b>	102,9	14,6	111,1	12,5	231,4	15,6	253,1	12,8
<b>MSPD (Teste 3)</b>	98,3	25,4	68,9	8,7	182,6	9,4	185,3	18,3
<b>MSPD (Teste 4)</b>	117,0	23,5	105,1	14,7	98,4	16,4	225,6	11,2
<b>MSPD (Teste 5)</b>	70,3	11,3	70,4	13,4	73,2	7,4	119,7	12,7
<b>MSPD (Teste 6)</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MSPD (Teste 7)</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Fortificação 5LOQ. ND: não detectado.

O método de Soares; Rodrigues-Amaya (1989) modificado apresentou valores de recuperação (%) entre 17,9 e 116,6% para o nível de 5 x LOQ com coeficiente de variação para a recuperação de AFG<sub>1</sub> acima de 20%, ou seja, acima do recomendável para conferir confiabilidade a determinação (BRASIL, 2003; EC, 2006). Este fato pode ser atribuído a modificação do método, o qual foi minimizado reduzindo em 10 vezes o uso de solventes, com a intenção de diminuir custos e impacto ambiental. No entanto esta modificação não foi satisfatória, pois não permite a tomada inicial de grande quantidade de amostra, o que não permite a posterior pré concentração do extrato.

O método de QuEChERS modificado por Koesukwiwat, Sanguankaew e Leepipatpiboon (2014) mostrou percentuais de recuperação muito baixos, variando de 14,3 % a 23,8%. Além disso, para a AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> os coeficientes de variação ultrapassaram 20%. Esses valores indicam grande variação e a dificuldade da interação do solvente utilizado com o analito na matriz.

A técnica de MSPD teste 5 segundo Rubert, Soler e Mañes (2011) para as aflatoxinas mostrou valores de recuperação (%) entre 70,3 e 119,7%, estando todos os coeficientes de variação de acordo com o recomendado, abaixo de 20%. De acordo com a União Europeia, métodos para a determinação e quantificação de aflatoxinas com níveis de fortificação menores que 1 µg.kg<sup>-1</sup> devem ter recuperação ente 50 e 120% com coeficientes de variação abaixo de 20% (EC 2006).

Esse resultado foi obtido utilizando 0,25 g de C18 e 0,25 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, enquanto o método original utiliza 1 g de C18 e 20 mL de solvente. Experimentalmente foi verificado que reduzindo o volume de solvente e adequando a combinação de C18 e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se obtinha percentuais de recuperação dentro dos níveis recomendáveis para a confiabilidade do método, reduzia os interferentes analíticos, bem como resíduos para descarte e o custo da determinação.

O sal sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi adicionado nos testes com a finalidade de remover a água residual durante a limpeza do extrato junto com o adsorvente. A amina primária secundária (PSA) atua como trocador aniônico e pode interagir com outros compostos da matriz, removendo vários coextrativos interferentes. Em cereais é utilizado com o intuito de remover de forma mais eficiente os compostos polares. O C18 é muito utilizado para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, em especial aquelas que contem interferentes apolares, tais como lipídeos.

A combinação de sal e suporte sólido escolhida foi a que resultou em melhores indicativos de mérito para os três tipos de arroz (integral, parboilizado e branco polido) na forma *in natura* e tratados hidrotermicamente (micro-ondas e chapa térmica), sendo que nesta última forma, a massa de amostra cozida também era de 1 g, seguindo o protocolo de método descrito no item 4.7.1 (c) teste 5, mantendo mesmo volume de solventes, suporte sólido e sais, estabelecido como método de extração das aflatoxinas.

## 5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS

O procedimento de validação de método analítico para determinação de aflatoxinas em arroz foi realizado para assegurar a confiabilidade dos resultados. A Tabela 11 apresenta os indicativos avaliados.

Os coeficientes de determinação e correlação foram maiores que 0,99 para ambas as curvas mostrando a linearidade do intervalo de concentração e o sinal analítico, fatos que cumprem as recomendações de confiabilidade recomendadas pelo INMETRO (2003) e ANVISA (2003), de 0,90 e 0,99 respectivamente. Os limites de quantificação do instrumento foram de 0,06; 0,01; 0,02 e 0,05 ng.mL<sup>-1</sup> para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente. Outros autores encontraram o mesmo valor para a AFG<sub>2</sub>, enquanto que para a AFB<sub>1</sub> e a AFB<sub>2</sub>, 2 e 0,03 ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (TELLES; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2017), ou seja, superiores aos limites de quantificação encontrados neste estudo. Portanto, os limites de

quantificação do instrumento são satisfatórios para a determinação das quatro micotoxinas simultaneamente.

**Tabela 11** - Parâmetros analíticos avaliados em CLAE-FL.

Parâmetros analíticos	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
<b>Curva analítica</b>	$y = 49838x - 658,76$	$y = 211335x + 1453,1$	$y = 119472x + 1040$	$y = 43199x + 459,77$
<b>Curva matriz</b>	-	-	$y = 83988x + 237$	$y = 31060x + 356,3$
<b>Linearidade (ng.mL<sup>-1</sup>)</b>	0,06 – 6	0,01 – 2	0,02 – 4	0,05 – 5
<b>Coefficiente de correlação (R)</b>	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
<b>Coefficiente de Determinação (R<sup>2</sup>)</b>	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
<b>LODi (ng.mL<sup>-1</sup>)</b>	0,02	0,005	0,01	0,02
<b>LOQi (ng.mL<sup>-1</sup>)</b>	0,06	0,01	0,02	0,05
<b>LODm (ng.g<sup>-1</sup>)</b>	0,04	0,01	0,02	0,03
<b>LOQm (ng.g<sup>-1</sup>)</b>	0,12	0,02	0,04	0,1

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. LODi: limite de detecção do instrumento; LOQi: limite de quantificação do instrumento. LODm: limite de detecção do método; LOQm: limite de quantificação do método.

Os limites de detecção e quantificação do método foram de 0,01 a 0,04 ng.g<sup>-1</sup> e 0,02 a 0,12 ng.g<sup>-1</sup>. Esses valores são menores quando comparados com o estudo de Rubert, Soler e Mañes (2011) que encontraram limite de detecção do método de 0,1 a 1 ng.g<sup>-1</sup> e limite de quantificação de 0,25 a 1,5 ng.g<sup>-1</sup> utilizando como técnica de extração o MSPD em farinhas de cereais e quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas. Portanto, o método proposto apresentou valores de LOD e LOQ adequados para determinar compostos traços como as micotoxinas.

A determinação do efeito de matriz é importante para verificar se interferentes aumentam ou reduzem o sinal e a magnitude do efeito (INMETRO, 2003). Quando os valores para o efeito matriz estiverem entre -20 e +20 %, considera-se baixo; se estiverem entre -50 e -20 % ou entre +20 e +50 % é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50 % ou acima de +50% o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU et al., 2009). O efeito de matriz para o arroz branco polido *in natura* foi de 19,4; 18,3; 16,6 e 13,5 % para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente, valores aceitáveis para determinações de contaminantes em nível de traços. No arroz parboilizado *in natura* foi observado efeito de matriz médio para a AFG<sub>1</sub> (29,7%) e AFG<sub>2</sub> (30,1%) e baixos para AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, 16,4 e 18,6% respectivamente. No arroz integral *in natura* também foi observado efeito de matriz médio para AFG<sub>1</sub> (29,7%) e AFG<sub>2</sub> (28,1%), e baixo para AFB<sub>1</sub> (12,4%) e AFB<sub>2</sub> (15,8%). Para os arrozes tratados hidrotermicamente não foi observado efeito de matriz. Quando o efeito de matriz foi superior a 20 %, foi utilizada a curva analítica da matriz para quantificar o composto na amostra.

Os percentuais de recuperação das aflatoxinas (Tabela 12) foram determinados para os três tipos de arroz (integral, parboilizado e branco polido) na forma *in natura* e tratados hidrotérmicamente. Os intervalos aceitáveis de recuperação para métodos de quantificação de aflatoxinas com níveis de fortificação menor que  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  devem ter recuperação ente 50 e 120% com coeficientes de variação abaixo de 20% (EC 2006). As recuperações obtidas no método padronizado e coeficiente de variação atenderam as recomendações.

Como os resultados de recuperação ficaram dentre os limites aceitáveis, o método pode ser utilizado com confiabilidade para determinar o comportamento das aflatoxinas após tratamento hidrotérmico, sendo a maneira mais adequada de inferir sobre o risco de exposição a esses contaminantes.

**Tabela 12** - Percentual de recuperação e o coeficiente de variação na determinação das aflatoxinas em arroz integral, parboilizado e branco polido na forma *in natura* e tratados hidrotérmicamente em chapa térmica e os coeficientes de variação.

Arroz Integral								
	<i>in natura</i>				Tratados hidrotérmicamente			
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
<b>LOQ</b>	60,3 (7,4)	70,3 (8,2)	73,2 (9,3)	109,7(15,3)	65,8 (9,4)	78,4 (17,8)	68,3 (10,3)	74,5 (4,6)
<b>5xLOQ</b>	65,6 (12,3)	99,8 (11,7)	103,3 (6,9)	101,9 (16,7)	75,9 (8,2)	72,6 (15,6)	79,9 (11,1)	112,0 (13,4)
<b>10xLOQ</b>	66,4 (15,7)	86,0 (3,6)	60,8 (7,8)	82,2 (11,6)	119,9 (7,4)	89,8 (9,1)	78,9 (8,9)	110,3 (5,6)
Arroz Parboilizado								
<b>LOQ</b>	69,1 (6,7)	98,8 (12,3)	74,0 (5,6)	94,3 (7,1)	78,2 9 (16,7)	91,7 (9,6)	65,9 (10,8)	76,3 (9,8)
<b>5xLOQ</b>	97,6 (8,5)	82,4 (7,9)	107,9 (4,9)	116,3 (14,3)	60,7 (9,6)	70,8 (8,3)	61,7 (6,9)	67,1 (13,2)
<b>10xLOQ</b>	83,2(14,2)	74,8 (9,3)	71,9 (10,9)	100,3 (15,2)	105,9 (8,8)	80,3 (11,3)	71,9 (17,4)	102,3 (4,9)
Arroz Branco Polido								
<b>LOQ</b>	62,6 (8,7)	84,4 (16,2)	100,1 (8,3)	62,8 (9,1)	89,2 (13,2)	67,3 (17,5)	91,4 (8,8)	65,3 (17,2)
<b>5xLOQ</b>	114,5 (11,8)	117,2 (8,9)	116,6 (7,1)	106,6 (6,8)	62,1 (18,9)	63,5 (9,6)	61,4 (7,2)	62,5 (11,6)
<b>10xLOQ</b>	62,8 (6,1)	62,3 (5,1)	60,2 (17,3)	72,5 (12,8)	75,8 (6,7)	117,6 (8,7)	76,1 (5,2)	85,8 (13,3)

## 5.6 EFEITO DE TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NA BIOACESSIBILIDADE

Tendo em vista a preocupação com a presença de aflatoxinas e outras micotoxinas nos alimentos, estudos tem buscado estratégias para prevenção pré-colheita com o controle da contaminação fúngica e pós-colheita com operações de armazenamento adequado, porém nem sempre é o suficiente, o que exige a adição de técnica ou processo de descontaminação, ou até

mesmo a redução durante ou após estas etapas. Processos físicos tem sido utilizados com a finalidade de reduzir a contaminação por aflatoxinas, como por exemplo processos térmicos de preparo (cocção, extrusão e forneamento). Tendo em vista que as aflatoxinas são muito estáveis ao calor, o que dificulta a redução dos seus níveis por operações térmicas convencionais, o conteúdo de umidade, temperatura de aquecimento, matriz alimentar e métodos de processamento são parâmetros importantes na redução dos níveis ou da toxicidade delas durante o processamento térmico de alimentos (PANKAJ; SHI; KEENER, 2018).

O efeito dos tratamentos hidrotérmicos (chapa térmica e micro-ondas) nos níveis de redução de aflatoxinas ( $10 \times$  LOQ) dos diferentes tipos de arroz (integral, parboilizado e branco polido) estão apresentados na Tabela 13. Esses resultados estão em base úmida, visto que cada tipo de arroz necessita uma quantidade diferente de água para cozimento, isto dificulta a comparação entre os tratamentos, embora, tenha sido constatado que cada um deles absorve água durante o cozimento, aproximadamente três vezes a sua massa *in natura*.

**Tabela 13** – Níveis de redução percentual (%) de aflatoxinas em arrozes tratados hidrotérmicamente (micro-ondas e chapa térmica).

		Redução (%)				Média AF's
		B1	B2	G1	G2	
Micro-ondas	Arroz Integral	88,9 <sup>a</sup> (4,5)	80,4 <sup>b</sup> (5,6)	67,4 <sup>d</sup> (14,3)	88,3 <sup>ab</sup> (6,7)	81,3
	Arroz Parboilizado	85,8 <sup>a</sup> (7,8)	90,4 <sup>a</sup> (13,4)	90,5 <sup>a</sup> (5,2)	79,9 <sup>bc</sup> (12,4)	86,7
	Arroz Branco Polido	85,8 <sup>a</sup> (9,3)	86,6 <sup>ab</sup> (5,7)	86,9 <sup>ab</sup> (4,9)	82,7 <sup>bc</sup> (9,4)	85,5
Chapa Térmica	Arroz Integral	87,5 <sup>a</sup> (11,2)	94,5 <sup>a</sup> (8,3)	77,0 <sup>c</sup> (9,8)	76,1 <sup>c</sup> (7,3)	83,8
	Arroz Parboilizado	92,6 <sup>a</sup> (6,4)	95,0 <sup>a</sup> (3,1)	81,7 <sup>bc</sup> (6,3)	93,0 <sup>a</sup> (4,9)	90,6
	Arroz Branco Polido	90,7 <sup>a</sup> (8,1)	92,3 <sup>a</sup> (6,4)	86,6 <sup>ab</sup> (11,7)	78,8 <sup>bc</sup> (9,1)	87,1

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa  $p < 0,05$  entre as amostras.

A redução média da soma das aflatoxinas para o tratamento hidrotérmico em micro-ondas foi de 81,3; 86,7 e 85,5% para o arroz integral, parboilizado e branco polido, respectivamente. No tratamento hidrotérmico realizado em chapa térmica a redução média para a soma das aflatoxinas foi de 83,8; 90,6 e 87,1% para o arroz integral, parboilizado e branco polido, respectivamente.

Vários estudos investigaram a eficácia do tratamento térmico por micro-ondas para redução de aflatoxinas. Estudos da década de 80 mostraram que a redução de aflatoxinas por este método é função da energia aplicada, tempo de tratamento e temperatura de aquecimento. A taxa de aquecimento pode ter efeito ou não sobre a degradação das aflatoxinas, visto que



pode ser obtida uma degradação similar da aflatoxina com um nível de potência maior por um tempo de tratamento mais curto ou a um nível de potência mais baixo por um tempo de tratamento mais longo (LUTER, WYSLOUZIL, KASHYAP, 1982)

Shi (2016) comparou o aquecimento convencional usando forno de convecção forçada e banho de água com o tratamento usando micro-ondas, aproximadamente na mesma temperatura de aquecimento, e obteve melhor resultado de degradação de padrão de aflatoxinas com o micro-ondas, sendo 5 a 8% mais efetivo do que o aquecimento convencional em condições úmida e seca. Hussein e Luttfullah (2009), aplicaram um tratamento em micro-ondas por 9 minutos a 450 W e obtiveram 72, 5% de redução da AFB<sub>1</sub> no arroz polido tipo Basmati. No entanto, nenhum destes autores considerou que após o tratamento térmico a extração analítica pode ter sido prejudicada pela gelatinização do amido ou pelo rearranjo estrutural de outros polímeros presentes no grão, resultando numa aparente decomposição das micotoxinas.

Apesar de resultados satisfatórios de redução, é importante o conhecimento do valor real acessível para absorção. Portanto, neste estudo para avaliar o risco de ingestão das aflatoxinas, as amostras de arroz tratadas hidrotermicamente foram submetidas a um modelo de digestão *in vitro* para estimar a bioacessibilidade conferida por este processo ao contaminante para ser absorvido e distribuído no metabolismo. Os valores obtidos para bioacessibilidade das aflatoxinas nas amostras de arroz tratadas hidrotermicamente estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** – Bioacessibilidade (%) de aflatoxinas em arrozes tratados hidrotermicamente (micro-ondas e chapa térmica).

		Bioacessibilidade (%)				Média (AF's)
		AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	
Micro-ondas	Arroz Integral	34,2 <sup>d</sup> (4,5)	76,1 <sup>a</sup> (8,3)	124,3 <sup>a</sup> (5,1)	123,5 <sup>b</sup> (4,8)	89,5
	Arroz Parboilizado	74,7 <sup>b</sup> (7,8)	43,5 <sup>c</sup> (15,6)	104,1 <sup>c</sup> (2,5)	56,4 <sup>d</sup> (14,3)	69,7
	Arroz Polido	66,8 <sup>c</sup> (12,4)	63,9 <sup>b</sup> (7,2)	72,0 <sup>e</sup> (9,2)	76,2 <sup>c</sup> (3,3)	69,7
Chapa Térmica	Arroz Integral	16,4 <sup>e</sup> (11,7)	15,0 <sup>e</sup> (9,4)	32,8 <sup>f</sup> (12,7)	71,4 <sup>c</sup> (7,1)	33,9
	Arroz Parboilizado	67,9 <sup>c</sup> (6,1)	28,2 <sup>d</sup> (11,9)	96,3 <sup>d</sup> (6,8)	54,6 <sup>d</sup> (11,2)	61,7
	Arroz Polido	89,7 <sup>a</sup> (3,2)	26,1 <sup>d</sup> (4,2)	118,4 <sup>b</sup> (5,6)	106,0 <sup>a</sup> (4,1)	58,5

Resultados expressos com média e coeficiente de variação. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa  $p < 0,05$  entre as amostras.

A bioacessibilidade das aflatoxinas nossas amostras de arroz integral, parboilizado e branco polido variaram bastante tanto entre os tratamentos, quanto entre os tipos de arroz, alguns valores estão acima de 100%, isto se deve a contaminação natural já existente. O

tratamento hidrotérmico em chapa térmica para os três tipos de arroz é o que torna as aflatoxinas menos disponíveis. Não há relatos de avaliação da bioacessibilidade das aflatoxinas em arroz por meio de modelos *in vitro*, no entanto altos valores de AFB<sub>1</sub> disponíveis após a digestão já foram reportados para amendoim, pistache, avelã, figos secos, páprica, trigo e milho com 85,9 e 98,5% de bioacessibilidade (KABAK; OZBEY, 2012).

Relacionando os valores de bioacessibilidade com os de redução, é visto que os dois tratamentos hidrotérmicos aparentemente reduzem o nível de aflatoxinas, porém os resultados de bioacessibilidade mostraram que estas se tornam disponíveis após a ação das enzimas hidrolíticas que atuam no processo de digestão de mamíferos monogástricos. Diante disso, fica evidente a necessidade de avaliar processos de degradação e/ou redução por métodos que considerem a real exposição dos consumidores após preparo e digestão de cereais quando estes estão contaminados com aflatoxinas ou outros contaminantes.

O arroz integral tratado hidrotérmicamente em chapa térmica tem a menor bioacessibilidade média, e menor teor de amido resistente, que pode ser atribuído a sua composição quanto ao conteúdo lipídico e carboidratos como celulose e lignina presentes no grão. As aflatoxinas podem estar ligadas a estas outras macromoléculas que no processo de digestão simulado não foram liberadas para absorção, porém esta hipótese precisa ser confirmada com estudos mais aprofundados neste sentido.

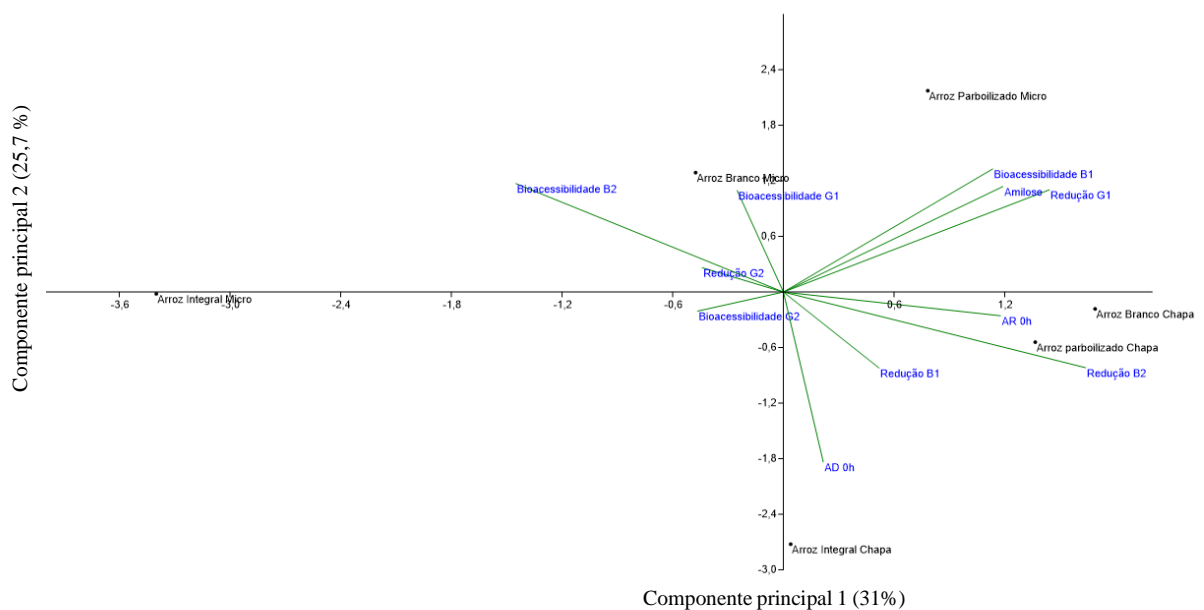
Considerando que o consumo per capita de arroz é de 40,0 Kg e a legislação estabelece como limite máximo tolerado para as quatro aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) 5 µg/kg, considerando esses valores, uma pessoa poderia então ingerir 200 µg de aflatoxinas ao ano, porém se a bioacessibilidade média do arroz integral tratado hidrotérmicamente em chapa é de 34% para as quatro aflatoxinas, a exposição real a este contaminante seria de 68 µg ao ano, o que acarretaria menor exposição crônica a estes contaminantes.

Estes resultados levam a considerar com mais cuidado a maneira de avaliar a recuperação de métodos analíticos validados para amostras *in natura* se aplicados em amostras tratadas por processos térmicos, como a cocção. Especialmente considerando que segundo a convenção analítica para avaliar recuperação as amostras são fortificadas após o tratamento, e, no entanto, a redução deve ser avaliada realizando a fortificação antes de aplicar o tratamento. Fica demonstrado então que durante o tratamento hidrotérmico as aflatoxinas podem ter se ligado a macromoléculas como amido resistente e disponível, e que o método de extração, embora com boa performance analítica, não possibilitou a extração delas nesta forma, possivelmente por estarem retido na rede do amido gelatinizado e de outras macromoléculas. Como recomendação para um próximo estudo, fica a necessidade de propor um método

analítico que utilize processos enzimáticos próximos ao da digestão para determinar as concentrações reais de exposição às aflatoxinas especialmente em produtos prontos para consumo.

Para melhor verificar melhor a relação entre a bioacessibilidade, redução das aflatoxinas e teores de amido resistente, disponível e amilose foi realizada uma análise de componentes principais (Figura 4) relacionando com os tipos de arroz estudados (integral, parboilizado e branco polido).

**Figura 4** – Análise de componentes principais.



Existe diferença entre os tratamentos hidrotérmicos (micro-ondas ou chapa térmica) que pode estar associado a componente 2, sendo o tratamento hidrotérmico em chapa está mais relacionada com a redução, principalmente das AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>. O tratamento hidrotérmico em micro-ondas está mais relacionado com a bioacessibilidade, ou seja, fica elevada quando aplica este tratamento. O amido resistente relacionado com a bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> e redução de AFB<sub>2</sub>. O amido disponível está relacionado com a redução de AFB<sub>1</sub> e bioacessibilidade de AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> e AFB<sub>2</sub>. A amilose está fortemente correlacionada com a bioacessibilidade de AFB<sub>1</sub> e redução de AFG<sub>1</sub>. Como recomendação de forma de preparo para o arroz integral, parboilizado e branco polido, é visto que o tratamento em chapa térmica apresenta menores valores de bioacessibilidade.

## 6 CONCLUSÃO

Foi padronizado o método de extração de aflatoxinas em arroz utilizando a técnica de MSPD dentro da performance analítica confiável, com menores quantidades de reagentes e solventes, gerando menos resíduos.

O arroz branco polido tem maior teor de amido resistente quando comparado ao arroz integral e parboilizado, quando submetido aos dois tratamentos hidrotérmicos. Os três tipos de arroz (integral, parboilizado e branco polido) quando submetidos a resfriamento por 48 horas após cocção em micro-ondas apresentaram o teor de amido resistente aumentado. O contrário acontece quando o tratamento ocorre em chapa térmica.

Os dois tratamentos hidrotérmicos (micro-ondas e chapa térmica) promovem redução aparente das micotoxinas estudadas (acima de 80%), no entanto, após a digestão elas se tornam disponíveis para absorção. O arroz integral cozido em chapa térmica apresentou menor bioacessibilidade para as quatro aflatoxinas, 34%; sendo as AFB<sub>2</sub> e AFB<sub>1</sub>, as menos bioacessíveis. No entanto, quando o arroz integral é tratado hidrotérmicamente em micro-ondas, sua bioacessibilidade para as AF's é de 89,5 % em média.

A hipótese quanto mais amido resistente, menor a bioacessibilidade não pode ser confirmada neste estudo, pois o arroz integral apresentou menores teores de amido resistente e no entanto, mostrou a menor bioacessibilidade das aflatoxinas, este comportamento pode estar relacionado com a formação de complexos com outros tipos de carboidratos e macromoléculas presentes nele.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZOREK, N. S.; SALEH, F. A. Limited survey on aflatoxina contamination in rice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *in press*, 2017. Disponível em:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.010>.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC**: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.

BASSAPA, C., SHANTHA, T. Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds-a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, v. 33, n. 2, p. 95 - 107, 1996.

BARKER, S. A. Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 70, p.151-162, 2007.

BECKER-ALGERI, T. A. **Ação de micro-organismos probióticos na composição nutricional e nos níveis de micotoxinas em leite**. 2016. 196 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. 2016.

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

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

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 57 - 81, 2010.

BOURNE, M. C. Food texture and viscosity: concept and measurement. 2nd. ed. Academic Press, 2002. 416 p.

BRADBURN, N.; COKER, R.D. Aflatoxin contamination in maize. *Tropical Science*. v. 33, n. 44, p. 418 - 428, 1993.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 6 de 16 de fevereiro de 2009. **Regulamento Técnico do Arroz**. Disponível em:<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1687046295>. Acesso em: jan. 2018.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2011.

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

BUTLER, W.H. Aflatoxins. In: PURCHASE, I.F.H. (Ed.). **Mycotoxins**, Elsevier, p. 1 – 28, 1974.

CARVAJAL, M.; ARROYO, G. Management of aflatoxin contaminated maize in Tarmaulipas, México. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1301 - 1305, 1997.

CASIRAGHI, M. C.; BRIGHENTI, F.; PELLEGRINI, N.; LEOPARDI, E.; TESTOLIN, G. Effect of processing on rice starch digestibility evaluated by *in vivo* and *in vitro* methods. **Journal Cereal Science**, v. 17, p. 147-156, 1993.

CHAMP, M.; FAISANT, N. Resistant starch: analytical and physiological aspects. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 37 - 43, 1996.

CHAMP, M.; KOZLOWSKI, F.; LECANNU, G. *In vivo* and *in vitro* methods for resistant starch measurement. In: Mc Cleary, V.; Prosky, L. Advanced dietary fibre technology, Oxford. **Blackwell Science**, p. 106-119, 2001.

CHIARADIA, M. C.; COLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CHUNG, H-J; LIU, Q.; HOOVER, R. Impacto f annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistente starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 436-447, 2009.

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária – Safra 2017/2018**. Brasília. v.4, p. 1-129. 2017.

EC (European Commission) - Commission Regulation 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 70, n. 12, 2006.

EC (European Commission) - **Commission regulation 165/2010** of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1464022171696&uri=CELEX:32010R0165>. Acesso em: jan. 2018.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multiclass pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009.

ENGLYST, H. N.; HUDSON, G. J. The classification and measurement of dietary carbohydrates. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 15 - 21, 1996.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J.H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, n. 2, p. S33-S50, 1992.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024**, OECD Publishing, Paris., 2015.

FEDDERN, V.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 800 – 804, 2007.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Editora Artmed, 2010.

FREI, M.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Studies on *in vitro* starch digestibility and the glycemic index of six diferente indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v. 83, p. 395-402, 2003.

GOÑI, I.; GARCÍA-DIZ, L.; MAÑAS, E. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. **Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 445 - 449, 1996.

HEIDTMANN, R. B.; MENDES, G. L.; SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011.

HEIDTMANN, R. B.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS E HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1244 – 1249, 2012.

HELBIG, E.; DIAS, A. R. G.; TAVARES, R. A.; SHIRMER, M. A.; ELIAS, M. C. Arroz parboilizado: efeito na glicemia de ratos wistar. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, n. 2, p. 149-155, 2008.

HOSENEY, R. C. **Principios de ciencia y tecnología de los cereales**. Ed. Acribia. Zaragoza, Espanha. 1991.

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

HUSSAIN, A.; LUTTFULLAH, G. Reduction of aflatoxin B1 and ochratoxin-A levels in polished basmati rice (*oryza sativa linn.*) by different cooking methods. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 31, p. 911–915, 2009.

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

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; HECK, A. R.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M<sub>1</sub> and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto - SP, Brazil. **Food control**, v. 40, p. 310-313, 2013.

INCROPERA, F. P.; DEWITT, D. P. Fundamentos de transferência de calor e massa. 6<sup>a</sup> ed. Editora LTC, Rio de Janeiro, 653 p. 2014.

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

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

JULIANO, B. O. Production and utilization of rice. In\_\_**Rice: chemistry and technology**. 2 ed. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists. 1985.

JULIANO, B. O.; BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. In\_\_ **Rice: chemistry and technology**. 2 ed. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1985.

JULIANO, B. O. Rice chemistry and quality. Philippines: **Philippine Rice Research Institute**, 480 p., 2003.

KABAK, B.; OZBEY, F. Aflatoxin M<sub>1</sub> in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an *in vitro* digestion model. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 338 - 344. 2012.

KATSURAYAMA, A. M.; MARTINS, L. M.; IAMANAKA, B. T.; FUNGARO, M. H. P.; SILVA, J. J.; FRISVAD, J. C.; PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 213-221, 2018.

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

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

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

LAGANÁ, A.; CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, P.; GUBBIOTTI, R. S. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, p. 2521-2532, 2010.



LAI, X.; LIU, R.; CHUNQIANG, R.; ZHANG, H.; LIU, C. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. **Food Control**, v. 50, p. 401-404, 2015.

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, food stuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 103 - 121, 1998.

LUTER, L.; WYSLOUZIL, W.; KASHYAP, S. C. The destruction of aflatoxins in peanuts by microwave roasting. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 15, n. 3, p. 236-238, 1982.

MARTINEZ, C.; CUEVAS, F. Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz. Guia del estudio. **Centro Internacional de Agricultura Tropical**, 75p. 1989.

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

MÉNARD, O.; CATTENOZ, T.; GUILLEMIN, H.; SOUCHON, I.; DEGLAIRE, A.; DUPONT, D.; PICQUE, D. Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1039-1045, 2014.

MEULLENET, J. F. C.; CARPENTER, J. A.; LYON, B. G.; LYON, C. E. Bi-cyclical instrument for assessing texture profile parameters and its relationship to sensory evaluation of texture. **Journal of Texture Studies**, v. 28, n. 1, p. 101-118, 1997.

MILANI, J. M. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, p. 405-411, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MISHRA, S.; ANSARI, K. M.; DWIVEDI, P. D.; PANDEY, H. P.; DAS, M.; Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. **Food Control**, v. 30, p. 549 - 555, 2013.

MOHAPATRA, D.; BAL, S. Cooking quality and instrumental textural attributes of cooked rice for different milling fractions. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 253-259, 2006.

MOLIN, R. & VALENTINI, M.L. Simpósio sobre micotoxinas em grãos. **Fundação Cargill, Fundação ABC**, 1999.

MUIR, J. G.; O'DEA, K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starches caping digestion *in vitro*. **The Animal Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 123 - 127, 1992.

OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; BRUIL, M. A.; DOBBE, C. J. G.; PEREBOM, D. P. K. H.; SIPS, A. J. A. M. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Arquives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 281 - 287, 2003.

PANKAJ, S. K.; SHI, H.; KEENER, K. M. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 73-83, 2018.

PARK, J. K.; KIM, S. S.; KIM, K. O. Effects of milling ratio on sensory properties of cooked rice and on physicochemical properties of milled and cooked rice. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 151-156, 2001.

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n. 1, p. 1-17, 2001.

PEREIRA, K. D. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 88 – 92, 2007.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRIETTO, L.; MORAES, P. S.; KRAUS, R. B.; MENEGHETTI, V.; FAGUNDES, C. A. A.; BADIALE-FURLONG, E. Post-harvest operations and aflatoxin levels in rice (*Oryza sativa*). **Crop Protection**, v. 78, p. 172-177, 2015.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001.

REITER, E.; ZENTEK, J., RAZZAZI, E. Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 4, p. 508 - 524, 2009.

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

ROSIN, P. M.; LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Measurement and characterization dietary starches. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 367-377, 2002.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC–MS/MS. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 206-215, 2011.

SHETTY, P. H.; TERPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontamination agents. **Trends Food Science Technology**, v. 17, p. 48-55, 2006.

SHI, H. Investigation of methods for reducing aflatoxin contamination in distillers grains. **West Lafayette, Indiana: Purdue University**. 2016.

SING, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.

SOARES L. M. V., RODRIGUEZ-AMAYA D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, p. 22 - 26, 1989.

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

STORCK, C. R.; SILVA, L. P.; FAGUNDES, C. A. A. Categorizing rice cultivars based on differences in chemical composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 4, p. 333-341, 2005.

STROKA, J; PETZ, M; JOERISSEN, U; ANKLAM, E. Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B1 in different food and feed matrices. **Food Additives and Contaminants**. v. 16, n. 8, p. 331 – 338, 1999.

SWASDISEVI, T.; SRIARIYAKULA, W.; TIA, W.; SOPONRONNARIT, S. Effect of pre-steaming on production of partially-parboiled rice using hot-air fluidization technique. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 3, p. 455-462, 2010.

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

TACO- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>. Acesso em: jan, 2018.

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

TELLES, A. C.; KUPSKI, L.; FURLONG, E. B. Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. **Food chemistry**, v. 214, p. 293-299, 2017.

THARANATHAN, R. N. Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 22, n. 1 p. 65 - 84, 2002.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAMB, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168–180, 2009.

VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; KAMP, E. V.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 2005.

VIDAL, A.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; DE SAEGER, S.; DE BOEVRE, M. Hydrolyzers of modified mycotoxins in maize:  $\alpha$ -amylase and cellulase induce an underestimation of the total aflatoxin content. **Food Control**, v. 248, p. 86-92, 2018.

VILLANOVA, F. A.; ANTUNES, M. D.; BUBOLZ, V.; SCHWARTZ, J. A.; PARAGINSKI, R. T.; OLIVEIRA, M. Parâmetros viscoamilográficos e de cocção de arroz integral, parboilizado integral, preto e vermelho após beneficiamento. Disponível em:

[http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/110\\_20142111\\_02-11-36\\_1838.pdf](http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/110_20142111_02-11-36_1838.pdf). Acesso em: jan, 2018.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 974 - 980, 2005.

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

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A.; NOLL, I. B. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. **Food Control**, v.20, p.48-52, 2009.

WIENK, K. J. H.; MARX, J.J.M; BEYENEN, A. C. The concept of iron bioavailability and its assessment. **European Journal of Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 51-75, 1999.

WOLF, B. W.; BAUER, L. L.; FAHEY G. C. Jr. Effects of chemical modification on *in vitro* rate and extent of food starch digestion: an attempt to discover a slowly digested starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n.10, p. 4178 - 4183, 1999.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 292–297, 2010.

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

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