

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

GABRIELE MEDEIROS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR DESOXINIVALENOL EM ARROZ E
FARELO DE ARROZ**

**Itaqui
2019**

GABRIELE MEIDEIROS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR DESOXINIVALENOL EM ARROZ E
FARELO DE ARROZ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharela em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Tiago André Kaminski

**Itaqui
2019**

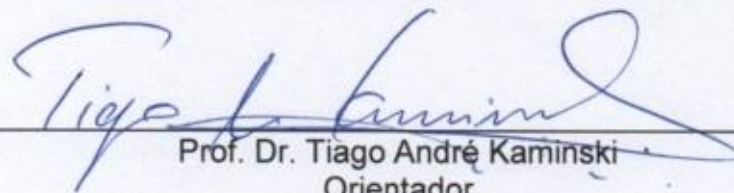
GABRIELE MEDEIROS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR DESOXINIVALENOL EM ARROZ E
FARELO DE ARROZ**

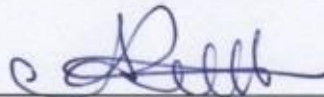
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial
para obtenção do Título de Bacharela em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 25 de junho de 2019.

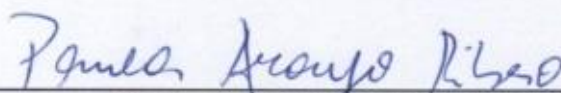
Banca examinadora:



Prof. Dr. Tiago André Kaminski
Orientador
UNIPAMPA



Me. Adriane Lettnin Roll Feijó
UNIPAMPA



Prof.ª Dr. Paula Ferreira de Araújo Ribeiro
UNIPAMPA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

A447a Almeida, Gabriele Medeiros

Avaliação da contaminação por desoxinivalenol em arroz e
farelo de arroz / Gabriele Medeiros Almeida.
24 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)--Universidade
Federal do Pampa, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2019.
"Orientação: Tiago André Kaminski".

1. fungos. 2. fusarium. 3. micotoxina. 4. arroz
parboilizado. 5. arroz integral. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar e iluminar meus caminhos.

À minha família pelo apoio, carinho e incentivo durante toda a graduação. Em especial ao meu pai Otavio, minha mãe do coração Maria Cristina, e minha irmã Amanda, pela força de sempre.

Ao meu Prof. Orientador Tiago Kaminski, por todo conhecimento e ensinamentos compartilhados. Pela paciência, dedicação e oportunidade de aprendizado e crescimento como pessoa e profissional.

À Adriane Feijó, por todos os ensinamentos e auxílios proporcionados para realização dessa pesquisa. Também, pela confiança depositada, incentivo e momentos de descontração, essenciais para meu crescimento. Além de contribuição direta para que este trabalho fosse possível.

À Prof^a. Paula Ribeiro, por aceitar contribuir com este trabalho e minha formação acadêmica.

Ao meu namorado Diego, pela amizade, amor e palavras de conforto proporcionadas durante toda a graduação. Por estar ao meu lado em todos os momentos, mesmo que à distância.

À minha amiga Mariana Oliveira, pela amizade, companheirismo e momentos de diversão. Por não medir esforços para me ajudar quando preciso, sempre demonstrando apoio em minhas decisões.

Ao meu amigo e colega de curso Christian Rafael Souza, pela amizade, trabalhos, apresentações, conversas, risadas e contribuições durante a graduação.

À Stefani San Martin, pela colaboração com as análises do experimento.

Aos professores da Unipampa, excelentes profissionais, fundamentais para meus conhecimentos e formação acadêmica.

E a todos que de alguma maneira contribuíram com minha graduação e concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 AMOSTRAS	11
2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS E SOLUÇÕES PADRÕES.....	11
2.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	12
2.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	12
2.5 EXTRAÇÃO DA MICOTOXINA	14
2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4 CONCLUSÕES	21
5 REFERÊNCIAS.....	21

ARTIGO CIENTÍFICO

O Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) está formatado nas normas para publicação de um artigo científico na revista Brazilian Journal of Food Technology (ISSN 1981 - 6723).

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR DESOXINIVALENOL EM ARROZ E FARELO DE ARROZ

EVALUATION OF DEOXYNIVALENOL CONTAMINATION IN RICE AND RICE BRAN

Resumo

O desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium* que tem alta estabilidade ao aquecimento e pode permanecer no produto por vários anos. O trabalho teve como objetivo avaliar o teor de DON em amostras de arroz comercializadas na região da Fronteira Oeste do Estado do Rio Grande do Sul e em amostras de farelo de arroz cedidas por empresas locais, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e detector ultravioleta visível (UV-VIS). O método analítico empregado foi validado seguindo os parâmetros de desempenho recomendados pelos guias da ANVISA e do INMETRO, sendo eles: seletividade, limite de detecção e de quantificação, linearidade, precisão e exatidão. A micotoxina foi extraída pela mistura de solventes acetonitrila:água (85:15), da qual foi coletado o sobrenadante, evaporado a 60 °C, ressuscendido com água:acetonitrila:metanol (90:5:5) e filtrado com filtro de seringa. O método mostrou-se seletivo, linear, preciso, robusto, com limites de quantificação (230 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$) e detecção (69 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$) adequados. Dessa forma, o método analítico proposto pode ser reproduzido em outros laboratórios, inclusive no controle de qualidade de rotina das indústrias de beneficiamento para determinação de DON em arroz beneficiado e farelo de arroz. Foi possível quantificar os teores de DON em duas amostras de arroz parboilizado polido, uma de arroz integral e todas as de farelo de arroz, por apresentarem quantidades superiores ao limite de quantificação do método desenvolvido. A amostra de farelo de arroz parboilizado apresentou maior contaminação por DON (754,26 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$) em relação às demais amostras. No entanto, todas as amostras avaliadas tiveram teores de DON em

27 conformidade com os limites máximos tolerados pela legislação brasileira para a
28 micotoxina.

29

30 **Palavras-chave:** fungos, *Fusarium*, micotoxina, arroz parboilizado, arroz integral,
31 cromatografia.

32

33 **Abstract**

34 Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced by fungi of the genus *Fusarium* that has
35 high stability to heating and can remain in the product for several years. The objective of
36 this work was to evaluate the DON content in rice samples commercialized in the region of
37 the West Frontier of the State of Rio Grande do Sul and in samples of rice bran yielded by
38 local companies, through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and visible
39 ultraviolet detector (UV-VIS). The analytical method employed was validated following the
40 performance parameters recommended by the ANVISA and INMETRO guides, being:
41 selectivity, limit of detection and quantification, linearity, precision and accuracy. The
42 mycotoxin was extracted by the solvent mixture acetonitrile:water (85:15), from which the
43 supernatant was collected, evaporated at 60 °C, resuspended with
44 water:acetonitrile:methanol (90:5:5) and filtered with a syringe filter. The method was
45 selective, linear, precise, robust, with adequate quantification (230 µg.Kg⁻¹) and detection
46 (69 µg.Kg⁻¹) limits. In this way, the proposed analytical method can be reproduced in other
47 laboratories, including in the routine quality control of the processing industries for the
48 determination of DON in rice and rice bran. It was possible to quantify DON contents in
49 two samples of polished parboiled rice, one of whole rice and all of rice bran, because they
50 presented higher quantities than the limit of quantification of the developed method. The
51 sample of parboiled rice bran presented higher contamination by DON (754.26 µg.Kg⁻¹) in
52 relation to the other samples. However, all the samples evaluated had levels of DON in
53 compliance with the maximum limits tolerated by Brazilian legislation for mycotoxin.

54

55 **Keywords:** fungi, *Fusarium*, mycotoxin, parboiled rice, whole rice, chromatography.

56

57 1 INTRODUÇÃO

58 O arroz (*Oryza sativa* L.) representa a base alimentar de grande parte da
59 população, sendo o segundo cereal mais produzido mundialmente, com área das
60 plantações em torno de 161 milhões de hectares, além de corresponder a 29% do total do
61 consumo de grãos (Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado, 2018).

62 No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz, responsável
63 por cerca de 70% da produção no país (Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado, 2018).
64 O arroz beneficiado é subdividido nos subgrupos integral, polido, parboilizado integral,
65 parboilizado polido (Brasil, 2009). O farelo de arroz é um dos subprodutos do processo de
66 beneficiamento dos grãos polidos, sendo normalmente empregado em rações animais,
67 embora com potencial de utilização na alimentação humana (Paz et al., 2015).

68 No arroz, assim como em outros cereais, pode incidir a presença de fungos
69 produtores de micotoxinas, o que pode acontecer desde o cultivo no campo até as etapas
70 de colheita e estocagem quando houver condições favoráveis, principalmente de
71 temperatura e umidade, para o desenvolvimento fúngico (Prado, 2014). A ingestão de
72 micotoxinas pode ocasionar micotoxicoses, com sintomas e intensidade que variam de
73 acordo com a espécie produtora e com a quantidade ingerida, mas os sintomas mais
74 comuns são perda de produtividade, perda de peso, imunossupressão, teratogênese e
75 carcinogênese, além da intoxicação aguda (Bianchini, 2003).

76 Dentre as micotoxinas, as de *Fusarium*, desoxinivalenol (DON) e zearalenona
77 (ZEA) são de especial importância, pois são principalmente formadas no campo, antes da
78 colheita dos grãos e sua ocorrência é difícil de ser evitada devido ao grande impacto das
79 condições abióticas (Heidtmann-Bemvenuti et al., 2012). DON é um tricoteceno do grupo

80 B das micotoxinas, típico do campo, também conhecido como vomitoxina (Oga et al.,
81 2008); pode estar presente em milho, cevada, arroz, centeio, aveia e rações para animais
82 (Prado, 2014); apresenta alta estabilidade, resiste ao aquecimento em temperatura de até
83 135 °C sem degradação e pode permanecer no produto por diversos anos em
84 temperatura ambiente (Garda & Badiale-Furlong, 2008).

85 Os níveis aceitáveis de micotoxinas nos alimentos são regulamentados pelo
86 Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A
87 legislação que vigora é a Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, da ANVISA, que
88 dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos para consumo
89 humano, estabelecendo que os níveis de micotoxinas devem ser tão baixos quanto
90 razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na
91 produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar
92 que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido (Brasil, 2011).

93 No Brasil, os limites máximos estipulados referem-se apenas às partes comestíveis
94 dos produtos alimentícios em questão e previam um período total de adaptação até 2016,
95 mais restritivo a cada ano de adequação (Brasil, 2011). No entanto, através da resolução
96 nº 138, de 8 de fevereiro de 2017, a ANVISA estendeu o período de adaptação dos limites
97 máximos tolerados de micotoxinas para alguns produtos, com prazo máximo até 2019
98 (Brasil, 2017a). Atualmente, os limites máximos tolerados de DON em vigência são de
99 750 $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ para arroz e, desde janeiro de 2019, de 1000 $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ para farelo de arroz
100 (Brasil, 2017a).

101 Mesmo ocorrendo em concentrações muito pequenas nos alimentos, as
102 micotoxinas têm alto grau de toxicidade, o que faz necessário o desenvolvimento de
103 métodos analíticos precisos, rápidos, confiáveis e economicamente viáveis em laboratório
104 para identificação dessas substâncias. Os métodos cromatográficos, em especial a
105 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), são os mais indicados para a

106 quantificação de micotoxinas por possuírem alta seletividade e sensibilidade (Heidtmann-
107 Bemvenuti et al., 2012).

108 Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o teor de DON em amostras
109 de arroz beneficiado comercializadas na região da Fronteira Oeste do Estado do Rio
110 Grande do Sul e em amostras de farelo de arroz cedidas por empresas locais, através de
111 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e detector ultravioleta visível (UV-VIS).

112

113 **2 MATERIAL E MÉTODOS**

114 **2.1 Amostras**

115 Entre os meses de janeiro e março de 2018, foram adquiridas amostras de seis
116 marcas comerciais de arroz beneficiado no comércio da região da Fronteira Oeste do
117 estado do Rio Grande de Sul, contemplando os subgrupos integral, polido, parboilizado
118 integral e parboilizado polido. As amostras de farelo foram concedidas por três empresas
119 de beneficiamento de arroz localizadas no município de Itaqui/RS, consistindo amostras
120 de farelo integral, parboilizado integral e desengordurado. Totalizaram-se 16 amostras de
121 arroz beneficiado e cinco de farelo de arroz, que foram mantidas a -18 °C e em suas
122 embalagens originais até o momento da realização das análises no laboratório de Análise
123 Instrumental da Universidade Federal do Pampa, campus Itaqui.

124 **2.2 Preparo das amostras e soluções padrões**

125 Previamente às análises, as amostras de arroz foram trituradas em moinho
126 analítico de bancada (IKA, A11BS32) até obtenção de farinhas. Para o preparo da
127 solução estoque de DON foram utilizados 2,5 mg do padrão analítico, com 99,9% de
128 pureza (ChemCruz), que foi diluído em metanol grau CLAE (Dinâmica Química
129 Contemporânea Ltda). A solução foi sonicada em banho ultrassônico (Unique, Ultra
130 Cleaner 1400) por 5 minutos e transferida para um balão volumétrico de 10 mL para

131 obtenção de concentração de 250 µg.mL⁻¹, da qual foram realizadas as diluições nas
132 concentrações de trabalho.

133 **2.3 Condições cromatográficas**

134 Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Dionex, Thermo Fisher
135 Scientific Inc.) constituído de bomba quaternária (LPG86 3400SD), amostrador automático
136 (WPS-3000TSL), compartimento de coluna com controlador de temperatura (TCC-
137 3000RS), coluna C18 (4,6 x 250 mm, partículas de 5 µm, Agela Technologies, Promosil) a
138 temperatura ambiente e detector ultravioleta visível (UV-VIS) (VWD-3100) a 220 nm. A
139 fase móvel constituiu-se de água ultrapurificada, acetonitrila grau CLAE (Vetec, Química
140 Fina) e metanol grau CLAE (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) na proporção de
141 90:5:5 (v/v/v), em eluição isocrática, com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume de injeção 20 µL,
142 em temperatura ambiente (Silva et al., 2017).

143 **2.4 Validação do método**

144 Foram avaliados parâmetros de desempenho recomendados pelos guias da
145 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto Nacional de Metrologia,
146 Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), sendo eles: seletividade, limite de
147 detecção (LD) e de quantificação (LQ), curva analítica e linearidade, precisão e exatidão
148 (recuperação) (Brasil, 2016; Brasil, 2017b).

149 A seletividade foi avaliada comparando-se o sinal gerado pela injeção das matrizes
150 isentas da micotoxina DON e das adicionadas de padrão no tempo de retenção, buscando
151 evitar a coeluição do analito com interferentes. As matrizes constituíram-se de uma das
152 amostras de arroz polido, parboilizado integral e integral, como também de uma amostra
153 de farelo de arroz integral (Brasil, 2016; Brasil, 2017b).

154 O LD do método foi determinado pela média do sinal do ruído, que correspondia à
155 linha de base da fase móvel, sendo considerado três vezes a concentração, enquanto que

156 o LQ foi considerado dez vezes a concentração. Os valores teóricos foram verificados
157 experimentalmente (Brasil, 2016; Brasil, 2017b).

158 A linearidade foi avaliada por curvas analíticas realizadas através da padronização
159 externa com soluções preparadas em triplicata nas concentrações de 0,25; 0,75; 1; 2 e
160 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DON, extrapolando o limite máximo tolerado pela legislação brasileira. A
161 comprovação da relação linear entre a concentração dos analitos e a resposta do
162 equipamento foi realizada por meio do teste unilateral de análise de variância (ANOVA)
163 (Brasil, 2016; Brasil, 2017b).

164 A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. Para
165 avaliação da repetibilidade, seis amostras ($n = 6$) de concentração 0,75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram
166 preparadas sob as mesmas condições, pelo mesmo analista, em um curto período de
167 tempo. Na determinação da precisão intermediária seis amostras nas mesmas
168 concentrações supracitadas foram preparadas sob as mesmas condições, durante três
169 dias diferentes, por três diferentes analistas ($n = 18$).

170 A exatidão do método foi avaliada pelo método de adição e recuperação de padrão
171 frente às matrizes, em três níveis, 70%, 100% e 120%, do limite máximo tolerado da
172 micotoxina para arroz beneficiado e farelo de arroz, em triplicata (Brasil, 2016; Brasil,
173 2017b).

174 A robustez foi avaliada a partir da determinação de DON mediante pequenas
175 alterações nas condições cromatográficas nominais do método desenvolvido (Brasil,
176 2016; Brasil, 2017b). Foram selecionados seis fatores e avaliados por delineamento
177 fatorial de Plackett-Burman ($n = 12$). Foram avaliadas alterações na vazão ($\pm 0,05$
178 unidades), proporção de acetonitrila na fase móvel ($\pm 2\%$), proporção de metanol na fase
179 móvel ($\pm 2\%$), comprimento de onda (± 2 nm), temperatura (± 2 °C) e marca de coluna.

180 **2.5 Extração da micotoxina**

181 A extração foi baseada na metodologia descrita por Liao et al. (2013), com
182 modificações, na qual 5 g de amostra de arroz (farinha) foram colocadas em tubo com
183 tampa de rosca. Adicionou-se 10 mL do solvente de extração constituído de
184 acetonitrila:água (85:15) (v/v), agitou-se manualmente por 15 minutos e centrifugou-se por
185 5 minutos a 4500 rpm. Após, foram coletados 2 mL do sobrenadante e transferidos para
186 *snap cap* para evaporação em banho-maria a 60 °C. O mesmo foi ressuscendido com
187 água:acetonitrila:metanol (90:5:5) (v/v/v), agitado em agitador vórtex por 1 minuto e
188 filtrado com filtro de seringa (13 mm x 0,22 µm politetrafluoretileno).

189 Para extração nos farelos, adicionou-se 20 mL do solvente de extração, coletou-se
190 4 mL de sobrenadante para evaporação e utilizou-se seringa com filtro diferente (13 mm x
191 0,45 µm polietersulfona). Quando fortificados, na etapa de ressuspensão, foi adicionado
192 solução de trabalho de DON juntamente com água:acetonitrila:metanol (90:5:5) (v/v/v) nas
193 concentrações de fortificação.

194 **2.6 Análise dos resultados**

195 A aquisição e análise dos dados foram realizadas pelos softwares Chromeleon
196 versão 6.8 (Dionex, Thermo Fisher Scientific Inc.), Origin (Pro) versão 8.0, além do
197 aplicativo Microsoft Office Excel®. No Statistica, versão 8.0, os dados foram submetidos à
198 análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey em nível de 5% de
199 significância.

200

201 **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

202 A fase móvel na proporção de água:acetonitrila:metanol (90:5:5) (v/v/v) apresentou
203 pico do padrão de DON em 19,6 minutos.

204 Para que um método analítico seja validado é necessário verificar os parâmetros
205 de adequabilidade do sistema após o desenvolvimento e otimização do mesmo, como

206 está preconizado na legislação brasileira (Brasil, 2017b). O desempenho do sistema
 207 cromatográfico foi avaliado por meio da verificação quanto ao número de pratos teóricos,
 208 resolução e fator de cauda nos cromatogramas obtidos, os quais foram satisfatórios.

209 Nas condições cromatográficas utilizadas foi possível averiguar a inexistência de
 210 interferentes nas matrizes que comprometeriam a identificação da micotoxina,
 211 apresentando satisfatória seletividade do método.

212 Na Tabela 1 estão apresentadas a precisão e a exatidão obtidas. A partir dos
 213 resultados, se verificou que a precisão do método desenvolvido esteve dentro dos limites
 214 aceitáveis, com desvio padrão relativo inferior a 2%, nas análises de repetibilidade e na
 215 precisão intermediária (Ribani et al., 2004). Através da utilização da extração adaptada de
 216 Liao et al. (2013) foi possível a obtenção de uma boa recuperação.

217

218 Tabela 1 – Precisão do método e recuperação das amostras fortificadas com diferentes
 219 concentrações de desoxinivalenol

PRECISÃO	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) n = 6	0,77	0,76	0,74
Desvio padrão	0,01	0,01	0,01
Média n = 18 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		0,75	
Desvio padrão		0,014	
Coeficiente de variação (%)		1,85	
EXATIDÃO ARROZ POLIDO			
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,53	0,75	0,90
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,39	0,65	0,66
Recuperação média (%)	73,44	87,93	73,57
Desvio padrão	2,43	8,68	1,83
EXATIDÃO ARROZ PARBOILIZADO POLIDO			
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,53	0,75	0,90
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,49	0,69	0,72
Recuperação média (%)	92,97	92,82	80,25
Desvio padrão	10,97	17,3	1,55
EXATIDÃO ARROZ PARBOILIZADO INTEGRAL			
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,53	0,75	0,90
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,50	0,87	0,84
Recuperação média (%)	94,51	117,04	94,90
Desvio padrão	9,44	5,13	6,91
EXATIDÃO FARELO DE ARROZ			
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,75	1,00	1,50
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,69	0,90	1,50
Recuperação média (%)	92,29	90,74	89,51
Desvio padrão	10,05	4,11	7,56

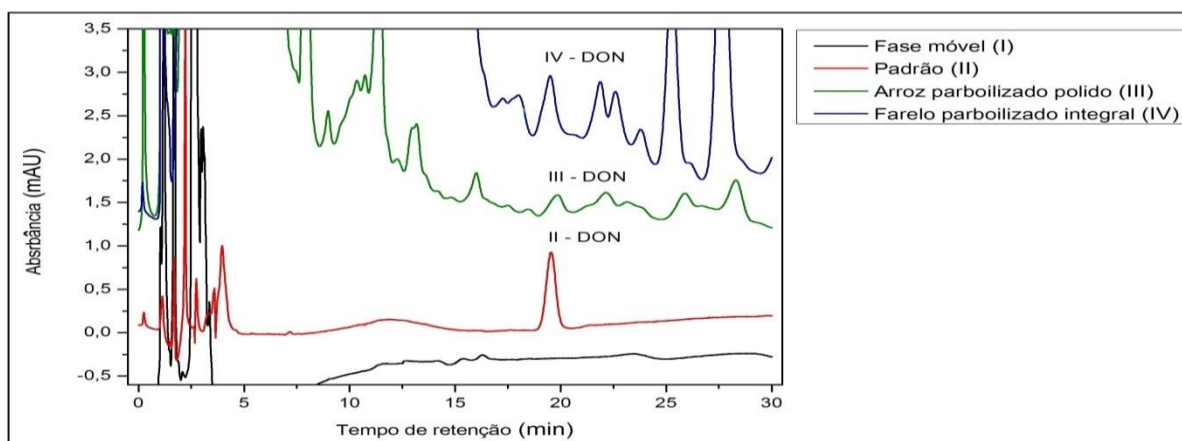
220 A equação obtida da curva de linearidade foi $y = 0,6614x - 0,0466$, com coeficiente
221 de correlação linear (r) de 0,9997. O modelo de regressão linear foi maior do que o
222 recomendado pelo INMETRO, de 0,90 (Brasil, 2016).

223 O LD do método foi de $0,069 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e o LQ de $0,23 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, apontando que a
224 sensibilidade do mesmo atende aos limites descritos na legislação brasileira (Brasil,
225 2011). Tais limites são resultantes da capacidade do aparelho cromatográfico, e embora
226 não seja possível quantificar teores de DON inferiores a $230 \mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ é possível verificar se
227 o grau de contaminação é inferior ao máximo permitido pela legislação, para as amostras
228 de arroz beneficiado e farelo de arroz.

229 O método proposto mostrou-se robusto, pois mesmo modificando as condições
230 nominais do sistema foi possível identificar e quantificar o analito desejado, com garantia
231 dos parâmetros de adequabilidade do sistema e resultados sem diferença estatística
232 significativa utilizando o teste T de *Student* para $p = 0,05$ (t crítico = 2,57).

233 Dessa forma, o método desenvolvido mostrou-se seletivo, linear, preciso, robusto,
234 com limites de quantificação e detecção adequados para determinação de DON no arroz
235 beneficiado e no farelo de arroz.

236 A Figura 1 demonstra cromatogramas obtidos com o padrão ($0,75 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de
237 DON), com amostra de arroz parboilizado polido ($247,50 \mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ de DON) e com farelo
238 parboilizado integral ($754,15 \mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ de DON).



239 Figura 1. Cromatogramas sobrepostos de matrizes farelo parboilizado integral, arroz
240 parboilizado polido naturalmente contaminadas e do padrão de DON.
241

242 A contaminação por DON nas amostras de arroz adquiridas está apresentada na
 243 Tabela 2. Em apenas três das amostras foi possível quantificar os teores de DON, as
 244 demais tiveram teores não detectáveis ou quantidades traço. As quantidades de DON
 245 encontradas nessas três amostras ficaram abaixo do limite de $750 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ descrito na
 246 legislação brasileira (Brasil, 2011), o que demonstra baixa contaminação nos lotes das
 247 amostras de arroz comercializadas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

248

249 Tabela 2 – Ocorrência de DON nas amostras comerciais de arroz adquiridas na região da
 250 Fronteira Oeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Subgrupo do arroz	Marca	Lote	Teor de DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
Polido	1	01/11/2018	ND
	2	12A	ND
	3	130918	ND
	4	CL 09 2018 23	ND
	5	21 out 18 03D	ND
Parboilizado polido	1	01/09/2018	ND
	2	11A	$233,87 \pm 19,86$ b
	3	230818	Tr
	4	CL 08 2018 23	ND
	5	01 dez 18 01M	$250,25 \pm 4,06$ b
	6	197-248	Tr
Parboilizado integral	1	01/10/2018	Tr
	3	221118	Tr
	4	CL 092018 32	ND
Integral	5	01/01/20 0554061701	Tr
	6	9 LOT 180 277	$325,65 \pm 16,44$ a

251 Valores expressos como média \pm desvio padrão seguidos por letras distintas que indicam
 252 diferença estatística significativa em nível de 5% pelo teste de Tukey.

253 ND = não detectado; quantidade inferior ao limite de detecção (LD) de $69 \mu\text{g.Kg}^{-1}$.

254 Tr = traços; quantidade entre o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) de
 255 $230 \mu\text{g.Kg}^{-1}$.

256

257 A amostra com maior teor de DON foi o arroz integral da marca 6, com
 258 $325,65 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, seguida das amostras de arroz parboilizado polido das marcas 2 e 5, com
 259 $233,87$ e $250,25 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, respectivamente. No subgrupo polido, nenhuma das amostras
 260 teve quantidades detectáveis de DON, o que sugere a observação de boas práticas de
 261 armazenamento e produção (Tabela 2). Também se deve considerar que no processo de

262 polimento do arroz são removidas as camadas mais externas do grão, onde há maior
263 ocorrência de micotoxinas, diminuindo o risco de contaminação (Dors et al., 2011).

264 Outros estudos que avaliaram contaminação por DON em amostras de arroz
265 descreveram valores semelhantes.

266 Nunes et al. (2003) avaliaram a presença de fungos e a ocorrência de diversas
267 micotoxinas em arroz, constatando a prevalência de 266 e 300 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de DON em uma
268 mesma amostra de arroz polido quando analisada pelas técnicas de cromatografia em
269 camada delgada e cromatografia gasosa, respectivamente.

270 Silva et al. (2019) avaliaram 42 amostras de arroz, das quais apenas duas tiveram
271 ocorrência de DON em quantidades médias de 62 e 157 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

272 Bertuzzi et al. (2019), ao monitorar a presença e relação entre fungos e
273 micotoxinas em 60 amostras de arroz produzidas na Itália, constataram a incidência de
274 diversos fungos, dentre eles o *Fusarium*, bem como a contaminação por DON em 18
275 amostras na quantidade de até 64 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

276 Xu et al. (2016) estudaram a ocorrência de DON em arroz, trigo e derivados,
277 constatando teores de 139,1 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de DON em uma de três amostras de arroz integral e
278 79,5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de DON em arroz glutinoso.

279 Rahmani et al. (2017) avaliaram amostras de arroz comercializado no Irã e não
280 encontraram contaminação por DON. Ok et al. (2014) também não detectaram a
281 ocorrência de DON em amostras de arroz polido, mas uma amostra de arroz integral (de
282 80 analisadas) apresentou contaminação com 43,2 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de DON.

283 Em alguns dos estudos citados (Bertuzzi et al., 2019; Ok et al., 2014), os métodos
284 utilizados tinham capacidade de quantificação superior ao método utilizado nesse
285 trabalho. Provavelmente devido a utilização de cromatografia gasosa acoplada à
286 espectrometria de massas (Bertuzzi et al., 2019) e CLAE com detector de fluorescência,
287 além da utilização de coluna de imunoafinidade para extração (Ok et al., 2014). Nesses

288 casos foi possível quantificar o analito em menores quantidades e não considerar apenas
289 a presença de “traços”. Todavia, é notável a possibilidade de quantificação satisfatória de
290 DON no presente estudo, em especial para as amostras com teores de DON mais altos.

291 A Tabela 3 apresenta os teores de DON nas amostras de farelo de arroz. Em
292 comparação, observou-se maior contaminação do farelo de arroz parboilizado integral, da
293 empresa B, seguido dos farelos integrais das empresas A e C. Os farelos integral da
294 empresa B e desengordurado da C tiveram menor ocorrência de DON.

295

296 Tabela 3 – Ocorrência de DON nas amostras de farelo cedidas por empresas de
297 beneficiamento de arroz do município de Itaqui, RS, Brasil

Empresa	Farelo de arroz	Teor de DON ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
A	Integral	458,75 \pm 24,91 b
B	Integral	384,94 \pm 37,58 c
B	Parboilizado integral	754,26 \pm 36,35 a
C	Integral	491,56 \pm 3,14 b
C	Desengordurado	379,45 \pm 7,48 c

298 Valores expressos como média \pm desvio padrão seguidos por letras distintas que indicam
299 diferença estatística significativa em nível de 5% pelo teste de Tukey.

300

301 Embora com teores superiores às amostras de arroz beneficiado (Tabela 2), as
302 amostras de farelo de arroz apresentaram teores de DON inferiores ao limite estabelecido
303 na legislação brasileira, tanto para o ano de 2018 quando as amostras foram recebidas,
304 como para o limite vigente, de 1250 e 1000 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, respectivamente (Brasil, 2017a).
305 Esses resultados são satisfatórios e sugerem boas práticas agrícolas e de
306 armazenamento dos grãos de arroz, pois quando as amostras de farelo foram concedidas
307 pelas empresas para análise (novembro de 2018), os grãos já estavam armazenados,
308 pelo menos, desde o fim da safra de arroz (março de 2018). Ao longo do período de
309 armazenamento do arroz, aumentam as chances de crescimento de fungos e
310 contaminação por micotoxinas, como o DON.

311 A maior ocorrência de DON no único farelo de arroz parboilizado sugere maior
312 contaminação do arroz que passa pelo processo de parboilização. Isso pode ser

313 decorrente da migração de micotoxinas oriundas da casca do arroz para o endosperma
314 amiláceo na etapa de encharcamento do grão (Coelho et al., 1999).

315 Ok et al. (2018) verificaram contaminação por DON em amostras de arroz polido,
316 arroz integral e farelo de arroz, nas respectivas concentrações médias de 27,9; 81,8 e
317 49,6 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. No entanto, o intervalo de valores de DON encontrados nas amostras de
318 farelo de arroz ficou entre 10,1 a 655,6 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

319 Heidtmann-Bemvenuti et al. (2012) analisaram a presença de micotoxinas no
320 endosperma, casca e farelo de arroz. As amostras de arroz polido não apresentaram
321 contaminação por DON, enquanto o mesmo estava presente em uma amostra de arroz
322 parboilizado. O farelo de arroz polido apresentou a micotoxina, já o farelo parboilizado não
323 continha teores detectáveis. Os autores constataram que modo geral a contaminação por
324 micotoxinas foi inferior no endosperma amiláceo em relação às demais frações do grão.

325 Almeida et al. (2012) avaliaram a ocorrência de micotoxinas em arroz, farelo de
326 arroz, casca de arroz e grãos quebrados, constatando contaminações médias de 119,3;
327 300,0; 56,0 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e ND (não detectado), respectivamente. Nota-se que a maior
328 contaminação por DON no farelo de arroz está em concordância com os resultados
329 obtidos no presente estudo.

330 Algumas regiões ainda não apresentam limites para o contaminante em questão.
331 Por exemplo, na União Europeia, o regulamento n° 1881/2006 não fixa limite de DON em
332 arroz e produtos à base de arroz, devido a alegação do mesmo encontrar-se em baixos
333 níveis nessa matéria-prima (União Europeia, 2006).

334 Para diminuir a incidência de fungos há recomendação de uma série de medidas
335 de prevenção durante toda a produção do grão, desde o plantio, colheita, transporte,
336 estocagem e processamento até o consumidor. Como o ajuste adequado dos
337 equipamentos de colheita, colher o grão assim que o mesmo atingir a maturidade e secá-
338 lo até uma atividade de água segura (Iamanaka et al., 2010). Para isso, cabem aos

339 produtores e às indústrias adequarem as medidas necessárias para que a contaminação
340 de micotoxinas seja tão baixa quanto possível, através das boas práticas agrícolas e boas
341 práticas de fabricação devido aos efeitos tóxicos quando ingeridas em grandes
342 quantidades (Food And Agriculture Organization Of The United Nations, 2004).

343

344 **4 CONCLUSÕES**

345 O método analítico proposto é adequado e pode ser reproduzido em outros
346 laboratórios, inclusive no controle de qualidade de rotina das indústrias de beneficiamento
347 de arroz, para determinação de DON em arroz beneficiado e farelo de arroz.

348 Foi possível quantificar os teores de DON em duas amostras de arroz parboilizado
349 polido, uma de arroz integral e todas as de farelo de arroz, por apresentarem quantidades
350 superiores ao limite de quantificação do método desenvolvido. A amostra de farelo de
351 arroz parboilizado apresentou maior contaminação por DON em relação às demais
352 amostras. No entanto, em todas as amostras avaliadas os teores de DON estiveram em
353 conformidade, ou seja, abaixo dos limites máximos tolerados pela legislação brasileira
354 para a micotoxina.

355

356 **5 REFERÊNCIAS**

357 Almeida, D. I., Almeida, N. G., Carvalho, K. L., Gonçalves, G. A. A., Silva, C. N., Santo, E.
358 A., Garcia, J. C. & Vargas, E. A. (2012). Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂,
359 ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food*
360 *Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk*
361 *Assessment*, 29(4), 694-703. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.651750>

362 Bertuzzi, T., Romani, M., Rastelli, S. & Giorni, P. (2019). Mycotoxins and Related Fungi in
363 Italian Paddy Rice During the Growing Season and Storage. *Toxins*, 11(3), 151.
364 <https://doi.org/10.3390/toxins11030151>

365 Bianchini, A. (2003). *Estudo comparativo entre manejos de secagem e armazenamento*
366 *de arroz na incidência de fungos toxigênicos e micotoxinas* (Dissertação de
367 mestrado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Rio
368 Grande do Sul, RS, Brasil. Recuperado de
369 <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/72619>

- 370 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2011). Dispõe sobre limites
371 máximos tolerados para micotoxinas em alimentos (Resolução – RDC nº 7, de 18 de
372 fevereiro de 2011). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
373 Recuperado de
374 http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html
- 375 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2017a). Altera a Resolução
376 da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre
377 limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT
378 da micotoxina desoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta
379 ao consumidor e os prazos para sua aplicação (Resolução – RDC nº 138, de 8 de
380 fevereiro de 2017). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
381 Recuperado de
382 [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-
383 5112-43dc-9142-932f502fc46b?version](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version)
- 384 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2017b). Dispõe sobre a
385 validação de métodos analíticos e dá outras providências (Resolução – RDC nº 166
386 de 24 de julho de 2017). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
387 Recuperado de
388 [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5f
389 b92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)
- 390 Brasil. (fevereiro, 2009). Aprovar o Regulamento Técnico do Arroz, definindo o seu padrão
391 oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o
392 modo de apresentação e a marcação ou rotulagem, na forma dos Anexos à presente
393 Instrução (Instrução normativa N° 6, de 16 de fevereiro de 2009). *Diário Oficial [da]
394 República Federativa do Brasil*, Brasília. Recuperado de Normativa
395 [http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizar
396 AtoPortalMapa&chave=1687046295](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1687046295)
- 397 Brasil, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).
398 (2016). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. *DOQ
399 CGCRE-008*. Revisão: 05. Recuperado de
400 http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf
- 401 Coelho, C. S. P., Furlong, E. B. & Almeida, T. L. (1999). Migração de Micotoxinas Durante
402 a Parboilização do Arroz. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2(1,2), 39-44.
403 Recuperado de <http://repositorio.furg.br/handle/1/4444>
- 404 Dors, G. C., Bierhals, V. S. da. & Baldiale-Furlong, E. (2011). Parboiled rice: chemical
405 composition and the occurrence of mycotoxins. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*,
406 31(1), 172-177. <http://dx.doi.org/10.1590/S010120612011000100025>
- 407 Food And Agriculture Organization Of The United Nations. (2004). Worldwide Regulations
408 for mycotoxins in food and feed. Food and Nutrition Paper. Recuperado de
409 <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm#Contents>
- 410 Garda, J. & Badiale-Furlong, E. (2008). Otimização De Metodologia Para Derivação De
411 Desoxinivalenol Através De Planejamento Experimental. *Química Nova*, 31(2), 270-
412 274. <http://dx.doi.org/10.1590>

- 413 Heidtmann-Bemvenuti, R., Hackbart, H. C. S., Souza, M. M. & Badiale-Furlong, E. (2012).
414 Determinação De Deoxinivalenol e Zearalenona Em Arroz Natural e Parboilizado e
415 Suas Frações Utilizando Quechers e HPLC/UV-FL. *Química Nova*, 35(6), 1244-1249.
416 <http://dx.doi.org/10.1590/S010040422012000600033>
- 417 Iamanaka, B. T., Oliveira, I. S. & Taniwaki, M. H. (2010). Micotoxinas em Alimentos. *Anais*
418 *da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, Pernambuco, Brasil, 7.
419 Recuperado de <http://www.journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/download/128/117>
- 420 Liao, C., Wong, J. W., Zhang, K., Hayward, D. G., Lee, N. S. & trucksess, M. W. (2013).
421 Multi-mycotoxin Analysis of Finished Grain and Nut Products Using High-Performance
422 Liquid Chromatography–Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural*
423 *and Food Chemistry*, 61, 4771-4782. <http://dx.doi.org/10.1021/jf4000677>
- 424 Nunes, I. L., Magagnin, G., Bertolin, T. E. & Furlong, E. B. (2003). Arroz Comercializado
425 Na Região Sul Do Brasil: Aspectos Micotoxicológicos e Microscópicos. *Ciência e*
426 *Tecnologia Alimentar*, 23(2), 190-194. [http://dx.doi.org/10.1590/S0101-](http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000200015)
427 [20612003000200015](http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000200015)
- 428 Ok, H. E., Lee, S. Y. & Chun, H. S. (2018). Occurrence and simultaneous determination of
429 nivalenol and deoxynivalenol in rice and bran by HPLC-UV detection and
430 immunoaffinity cleanup. *Food Control*, 87, 53-59.
431 <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.005>
- 432 Ok, H. E., Kim, D. M., Kim, D., Chung, S. H., Chung, M., Park, K. H. & Chun, H. S. (2014).
433 Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and
434 zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control*, 37, 284-291.
435 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.020>
- 436 Oga, S., Camargo, M. & Batistuzzo, J. (2008). *Fundamentos de toxicologia* (3a ed.). São
437 Paulo: Ateneu.
- 438 Paz, M. F., Marques, R. V. & SCHUMANN, C. (2015). Características tecnológicas de
439 pães elaborados com farelo de arroz desengordurado. *Brazilian Journal of Food*
440 *Technology*, 18(2), 128-136.
- 441 Prado, G. Contaminação De Alimentos Por Micotoxinas No Brasil e No Mundo. (2014).
442 *Gerais: Revista De Saúde Pública Do SUS/MG*, 2(2), 13-26. Recuperado de
443 <http://revistageraissaude.mg.gov.br/index.php/gerais41/issue/view/28>
- 444 Rahmani, M., Ghasemi, E. & Sasani, M. (2017). Application of response surface
445 methodology for air assisted-dispersive liquid- liquid microextraction of deoxynivalenol
446 in rice samples prior to HPLC-DAD analysis and comparison with solid phase
447 extraction cleanup. *Talanta*, 165, 27-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.031>
- 448 Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F. & Melo, L. F. C. (2004).
449 Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771-
450 780. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- 451 Silva, L. P., Madureira, F., Vargas, E. A. de., Faria, A. F. & Augustia, R. (2019).
452 Development and validation of a multianalyte method for quantification mycotoxins and
453 pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food*
454 *Chemistry*, 270, 420-427. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.126>

- 455 Silva, M. V., Pante, G. C., Romoli, J. C. Z., Souza, A. P. M. de., Rocha, G. H. O. de.,
456 Ferreira, F. D., . . . Machinski, M. Jr. (2017). Occurrence and risk assessment of
457 population exposed to deoxynivalenol in foods derived from wheat flour in Brazil. *Food*
458 *Additives & Contaminants: Part A*, 35(3), 546-554.
459 <https://dx.doi.org/10.1080/19440049.2017.1411613>
- 460 Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: recomendações técnicas da
461 pesquisa para o sul do Brasil. *XXXI reunião técnica da cultura do arroz irrigado*,
462 Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado, Brasil, 2016. Recuperado de
463 http://www.sosbai.com.br/docs/Boletim_RT_2018.pdf
- 464 União Europeia. (2006). Regulamento (CE) N° 1881/2006 Da Comissão de 19 de
465 Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes
466 nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas. Recuperado de
467 [https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:](https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF)
468 [PDF](https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF)
- 469 Xu, J., Zhou, J., Huang, B., Cai, Z., Xu, X. & Ren, Y. (2016). Simultaneous and rapid
470 determination of deoxynivalenol and its acetylate derivatives in wheat flour and rice by
471 ultra high performance liquid chromatography with photo diode array detection.
472 *Journal of Separation Science*, 39(11), 2013-2212.
473 <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201501316>