

# Técnicas cromatográficas acessíveis para determinação de contaminantes fúngicos

## *Accessible chromatographic techniques for fungal contaminants determination*

### **Eliana Badiale Furlong\***

Universidade Federal do Rio Grande,  
Escola de Química e Alimentos,  
Laboratório de Micotoxinas e  
Ciência de Alimentos.  
Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS  
\*dqmebf@furg.br

Recebido: 08 Set 2015  
Aceito: 03 Nov 2015

### **Resumo**

Neste texto estão comentadas aplicações de técnicas cromatográficas simples e acessíveis, como a cromatografia de camada delgada e cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama, para determinar contaminantes fúngicos em alimentos. Estão enfatizados a importância de cuidados operacionais e a validação de métodos para geração de dados confiáveis, que possam subsidiar providência ao longo da cadeia produtiva e garantir a segurança de alimentos. Espera-se motivar a busca de informações acerca do problema micotológico, independente do grau de sofisticação da instrumentação analítica, para descrever o panorama e disponibilizar soluções exequíveis.

**Palavras chave:** aflatoxinas, micotoxinas, ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona.

### **Abstract**

This text compiles simple and available chromatographic techniques, such as thin layer chromatography and gas chromatography with flame ionization detection, as determination tools of fungal contamination in foods. Operational protocol and validation methods are emphasized, in order to ensure reliable data generation. Trustworthy data is the cornerstone of food safety throughout the production chain. Hopefully, this text will motivate further studies about mycotoxins contamination regardless of the analytic technique sophistication, thus ensuring a wider outlook of the situation and enable feasible solutions.

**Keywords:** aflatoxins, mycotoxins, ochratoxin A, trichotecenes, zearalenone.

## 1. Introdução

A adoção de estratégias que garantam a segurança dos alimentos depende primeiramente de dados referentes à qualidade das matérias primas e alimentos, enfatizando a presença de contaminantes físicos, químicos ou biológicos. Pode-se salientar a determinação de contaminantes fúngicos, os pontos críticos para controle deles, estabelecimento de limites aceitáveis de exposição, formas de inativa-los e definição da sua toxicidade, dentre outras<sup>[1]</sup>.

Os contaminantes fúngicos, as micotoxinas, são produzidos sob condições difíceis de serem controladas, em grãos, frutas e outras matrizes alimentares primeiramente colonizados por fungos toxigênicos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e outros<sup>[2,3]</sup>. Ao contrário dos fungos, as micotoxinas podem permanecer no material contaminado mesmo após a inviabilidade dos micro-organismos produtores, pois possuem estruturas químicas estáveis termicamente, pouco solúveis em água, não fotossensíveis e que podem estar adsorvidas em macromoléculas como carboidratos e proteínas<sup>[4,5]</sup>.

Os efeitos tóxicos destes compostos variam: sintomas gastrointestinais, danos no sistema sanguíneo e imunológico, distúrbios neurológicos e hormonais, diminuição da velocidade de crescimento, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e morte<sup>[1,2,6,7]</sup>. Os danos agudos são mais facilmente identificados e associados ao consumo de alimentos em animais tratados com ração ou dietas mais restritas<sup>[7]</sup>. Em humanos a diversidade da dieta dificulta a associação do sintoma a um dado contaminante, além disso, as doses de exposição podem ser menores e contínuas desencadeando danos crônicos nem sempre atribuídos aos alimentos consumidos<sup>[1,7]</sup>.

Para prevenir estes riscos à saúde de humanos ou de animais de criação os órgãos responsáveis por controle da saúde em nível mundial<sup>[8]</sup> (FAO, 2004) e individualmente vários países definiram limites aceitáveis para os grupos destes contaminantes considerando a comercialização e consumo<sup>[9]</sup>. No caso do Brasil, até

2011, a legislação era restrita a poucos alimentos e a um grupo de micotoxinas, as aflatoxinas<sup>[9,10]</sup>. Estes limites vem sendo revistos em função da demonstração da toxicidade dos compostos, da frequência da ocorrência e da disponibilidade de métodos confiáveis para determina-los. Junto da definição dos limites aceitáveis são necessários métodos cuja performance analítica permita monitorar os alimentos quanto a presença das micotoxinas de maior risco<sup>[9,11]</sup>.

Identificar e quantificar micotoxinas é um desafio tendo em vista as características destes compostos que pertencem a várias famílias químicas, ocorrem de forma aleatória e simultânea num alimento em quantidades traços<sup>[9,11]</sup>. A diversidade tóxica e química inclusive na própria família, a localização em pontos distintos das estruturas celulares, a geração de sinais determináveis fracos gera a demanda por métodos analíticos constituídos por etapas de separação cromatográfica para determinação múltipla e sensível dos contaminantes<sup>[9,11]</sup>.

O conhecimento sobre as micotoxinas em alimentos foi beneficiado pela evolução das técnicas cromatográficas. A instrumentalização da determinação em fluxo contínuo com o emprego de gases como fase móvel, a eluição sob fluxo líquido controlado para determinação empregando refratometria, espectrofotometria de absorção molecular ultravioleta- visível, infravermelho, espectrometria de massas, eletroquímicas ampliaram as possibilidades de determinação simultânea, aumentaram a sensibilidade e repetibilidade dos métodos analíticos<sup>[12-16]</sup>.

A evolução tecnológica chegou também a técnica de cromatografia em camada delgada, cujos efeitos da separação eram limitados pela avaliação subjetiva do analista e propriedade do analito. Fases estacionárias uniformes e com partículas com dimensões nano, detecção por densitometria ou diagnóstico fotométrico da imagem, softwares que garantem o significado quali ou quantitativo dos sinais do analito contribuem beneficentemente com a aplicação da técnica de forma confiável para alguns grupos químicos de micotoxinas<sup>[12,13,15,17]</sup>.

Ao mesmo tempo, que se observa um ganho em possibilidades de monitoramento das micotoxinas ou dos fenômenos a elas associados, algumas demandas surgiram, destacando-se os materiais necessários para preparo de amostra, pureza de padrões e reagentes, padrões certificados e analistas capacitados para operar e interpretar os resultados das separações<sup>[12-15,17]</sup>.

A consequência negativa destes avanços pode decorrer dos custos destas demandas, especialmente em países que precisam importar os equipamentos e insumos. Outro aspecto é que os resultados obtidos em condições menos sofisticadas são questionados, pela comunidade científica ou pelos órgãos de fiscalização, quanto a validade da informação gerada.

Com este critério, pela impossibilidade de atualizar a infraestrutura analítica alguns setores públicos e privados, que poderiam disponibilizar dados importantes sobre a situação micotoxicológica dos alimentos, podem deixar de realizar o controle ou mesmo a capacitação de pessoal com sólida compreensão das técnicas de separação e de cuidados analíticos para garantir a confiabilidade dos resultados.

Considerando o risco que a ocorrência de micotoxinas pode representar para a saúde pública, tomar providências fica limitado pelo impasse de dispor de informações seguras, geradas com recursos analíticos menos sofisticados, ou incentivar e considerar apenas os resultados obtidos em condições operacionais pouco acessíveis à maioria dos setores envolvidos com o problema. Salta a vista que esta última possibilidade restringe o monitoramento apenas a produtos de maior valor agregado e a regiões específicas aonde a infraestrutura acompanha os avanços tecnológicos de instrumentação analítica.

Neste texto estão descritas técnicas cromatográficas simples e acessíveis, como a cromatografia de camada delgada e cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama, aplicadas a determinação de micotoxinas em matrizes

alimentares. Espera-se motivar a busca de informações acerca do problema micotoxicológico, independente da sofisticação da infraestrutura analítica, para descrever o panorama e disponibilizar soluções exequíveis ao longo da cadeia agroindustrial e efetivação do cumprimento dos limites aceitáveis de exposição às micotoxinas.

É importante salientar que a proposta não é incentivar um retrocesso na tecnologia analítica, mas sim motivar a geração de informações úteis para o manejo do problema de contaminação micotoxicológica, tendo como base a experiência da rotina de um laboratório com infraestrutura de médio porte.

## 2. Cromatografia de Camada Delgada aplicada à determinação de Micotoxinas.

Até a década de 90 a técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) era recomendada por órgãos oficiais para avaliação da ocorrência de corantes sintéticos, carotenoides, açúcares, aminoácidos, grupos de metais e micotoxinas em alimentos<sup>[9-13,17]</sup>. Para compostos não coloridos ou não fluorescentes serem detectados são necessárias etapas de derivação (reações químicas) que os tornem coloridos, fluorescentes para visualização, determinação densitométrica<sup>[18]</sup> ou imagem fotométrica e também para confirmação da identidade deles<sup>[13,17-19]</sup>. Em qualquer um dos casos o resultado é usualmente considerado semi-quantitativo, pois a variabilidade dos resultados pode ser superior a 20% e os limites de detecção promoverem resultados falsos negativos<sup>[9,16,17]</sup>.

### 2.1. Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>

As aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (AFAs) são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* que contaminam alimentos e rações sob condições de umidade elevada, temperatura variável entre outros fatores abióticos e bióticos<sup>[10,11]</sup>. Este grupo de micotoxinas vem sendo foco de estudos, pois seus efeitos tóxicos causam impacto na saúde humana e de animais de criação. Os danos mais característicos são a hepatotoxicidade e a carcinogenicidade demonstrada deles<sup>[1,2,7,9]</sup>.

Quimicamente as AFAs constituem um grupo de compostos heterocíclicos (furanocumarinas) que apresentam fluorescência azul (B) ou verde (G) sob luz ultravioleta (360 nm). A diferença estrutural (penta ou hexa anéis, insaturações) e o potencial tóxico de cada uma, torna necessário conhecimento dos teores individuais delas nos alimentos<sup>[9-11]</sup>. Os métodos oficiais para determiná-las recomendam técnicas cromatográficas, incluindo, até hoje a cromatografia de camada delgada, associada a detecção por fluorescência<sup>[2,9,19,20]</sup>. Até a última década foram realizados muitos estudos colaborativos para estabelecer protocolos que propiciassem o uso eficiente da técnica<sup>[20-24]</sup>. A CCD ainda pode ser utilizada por recomendação de órgãos oficiais para monitoramento de limites legislados para elas em muitos países, inclusive no Brasil (RDC, nº7, 2011)<sup>[25]</sup>, pois os limites de quantificação da CCD são da ordem de ng, devido a propriedade de fluorescência das AFAs<sup>[9,10,18,19]</sup>.

Para a determinação cromatográfica destas micotoxinas em matrizes alimentares a primeira operação consiste em uniformizar a granulometria, no caso de alimentos sólidos; seguindo-se de homogeneização com água e solventes medianamente polares (acetonitrila, metanol, acetato de etila); clarificação com agentes precipitantes (soluções aquosas de sulfato de amônio, sulfato de cobre entre outros) e adsorventes (celite, C18); partição líquido-líquido, em fase sólida ou em colunas de imunoafinidade antes da determinação cromatográfica dos extratos contendo os contaminantes<sup>[9,10,15,16,18-21,23]</sup>.

O método de Soares e Rodrigues-Amaya<sup>[10]</sup> é muito utilizado para determinação de AFAs. Ele consiste na extração, partindo de 50 g de amostra, homogeneização com 300 mL de metanol e solução aquosa de cloreto de cálcio; clarificação com celite e solução aquosa de sulfato de amônio 40% ou sulfato de cobre. O extrato clarificado passa por partição líquido-líquido com clorofórmio que é evaporado. O resíduo seco é ressuspensão em benzeno para posterior separação das AFAs em CCD (sílica) eluídas por uma

mistura de tolueno, acetato de etila e ácido fórmico. A visualização é realizada sob luz UV (360 nm). Os padrões de aflatoxinas para identificação pelo tempo de retenção (Rf) e quantificação visual são preparados e quantificados em função de suas absorvidades molares. Os autores ainda recomendam a confirmação da identificação da micotoxina por co-cromatografia e reação delas com anidrido trifluoroacético<sup>[18]</sup>.

Para adequar a performance do método para aplicá-lo a diferentes matrizes, foram necessárias algumas adaptações no preparo das amostras (granulometria, porções analíticas e tempo de contato com o solvente), ativação das placas cromatográficas e ajustes nas proporções dos solventes de eluição<sup>[26-30]</sup>.

Por exemplo, para determinação das AFAs em amostras de pães de forma foi adotado separar a crosta do miolo, pois a homogeneização de ambos resultava em variabilidade acima de 30%, como consequência da pouca uniformidade granulométrica e dos interferentes (dados não publicados). Para aplicá-lo à massas de pizzas semi-prontas foi necessário reduzir a umidade até 15%. A melhor recuperação para as amostras de pizzas pre-prontas foi obtida com a remoção prévia da gordura com hexano antes de homogeneização com metanol e solução aquosa de cloreto de potássio<sup>[28]</sup>.

Um detalhe operacional que melhorou a recuperação das AFAs, aumentava em 12%, em amostras de farinhas e produtos de panificação foi a homogeneização manual com a solução extratora, repouso de 20 minutos e posterior homeoneização em blender. Atribuiu-se o efeito a maior penetração do solvente<sup>[25,28,30]</sup>.

Para a determinação de AFAs em amostras de arroz branco, integral e parboilizado o principal cuidado no preparo das amostras consistiu em moer, separar as frações granulométricas e compor uma amostra analítica contendo 50% da fração de 42 mesh e proporções uniformes das frações granulométricas maiores<sup>[27,29]</sup>.

O método original de Soares e RodriguezAmaya<sup>[10]</sup> emprega volumes que geram em média 180 mL de resíduo líquido e 70g de resíduo sólido por cada determinação, pois a massa analítica inicial é elevada (50g), requerendo maiores volumes do solvente extrator durante as etapas de limpeza e clarificação para que não ocorra saturação dos extratores ou perdas do analito.

Com o surgimento das folhas cromatográficas de alta resolução (HPTLC) os limites de detecção foram diminuídos passando da média de 5 ng para 1 ng por ponto; portanto adequadas para detectar os contaminantes dentro dos limites recomendados pela FAO<sup>[8]</sup> e da ANVISA<sup>[25]</sup>. Em termos de repetibilidade os progressos foram decorrentes quantificação baseada em detecção fotométrica usando o software Image J<sup>[19]</sup>.

A associação das cromatofolhas de HPTLC e a determinação fotométrica da fluorescência permitiu a miniaturização do método original, passando se a empregar 10 g para amostra analítica, mantendo as proporções de solventes extratores e clarificantes. Em função disso houve uma diminuição em torno de 4 vezes na quantidade dos resíduos gerados (relatório técnico de divulgação restrita, 2011; 2012). O método original<sup>[10]</sup> com as adaptações características para cada amostra foi validado conforme as recomendações da ANVISA<sup>[25]</sup>, Wernimont<sup>[31]</sup>, Horwitz<sup>[32,33]</sup>.

Estando a técnica adequada para preparo das matrizes foi estudada a ocorrência de AFAs em farinhas de trigo comercial<sup>[26,30]</sup> arroz branco, integral e parboilizado<sup>[26,27,29]</sup>, além de outras matrizes farelo de arroz e meios de cultivo<sup>[34-37]</sup>. A migração destas micotoxinas durante o processo de parboilização foi estudada por Coelho et al.<sup>[27]</sup> empregando o método adaptado e foi possível encontrar equações preditoras da migração das AFAs em função dos parâmetros operacionais do processo.

O efeito do tratamento térmico e da fermentação de farelo de arroz com fungos GRAS (Generally

Recognized as Safety) para degradar AFAB<sub>1</sub>, foi estudado por Cacciamani et al.<sup>[34]</sup> e Badiale-Furlong et al.<sup>[35]</sup> ficando registrada a redução média de 68% após a fermentação conduzida sobre diferentes parâmetros. Oliveira e Badiale-Furlong<sup>[36]</sup> e Souza et al.<sup>[37]</sup> adaptaram o método para determinação de AFAs produzida por biomassa de *Aspergillus oryzae* em presença e ausência de antifúngicos naturais.

Após a miniaturização o método original<sup>[10]</sup> foram monitorados, ao longo de 4 anos, a ocorrência destas micotoxinas em arroz e seus derivados de beneficiamento, cultivados em campos experimentais submetidos a condições controladas de manejo do cultivo para avaliar o impacto no arroz colhido e propor ajustes no manejo da cultura, pelo controle de fatores de risco para a contaminação fúngica (informação restrita).

A CCD ainda é utilizada na rotina no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande para detecção de aflatoxinas em matérias primas (grãos) destinadas a alimentação humana. Sempre são observados cuidados operacionais específicos para a preparação das amostras e condução da técnica cromatográfica de determinação dos analitos após a validação, considerando no mínimo as três figuras de mérito: limite de detecção e quantificação, recuperação e repetibilidade<sup>[31-33]</sup>. Na Tabela 1 estão alguns indicativos de confiabilidade do método empregando CCD com as adaptações já descritas para as diferentes matrizes.

Para avaliar o efeito de parâmetros operacionais se adota o teste de robustez ou planejamento experimental para decidir sobre a significância das variáveis<sup>[31]</sup>. A extração baseada no método original<sup>[10]</sup> miniaturizado é empregada para a preparação de extratos para a determinação das AFAs por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência<sup>[38-40]</sup> ou visando confirmar a contaminação em casos de amostras suspeitas na CCD<sup>[37]</sup>.

**Tabela 1.** Indicativos de confiabilidade do método de CCD aplicado a determinação de AFA B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

Amostras	LQ (ng g <sup>-1</sup> )	Repetibilidade (CV%)	Recuperação (%)	Autores
Pães e pizzas	4; 4,5; 3,5; 3	15; 15; 18; 20	84; 80; 80; 77	Pinho, B-Furlong <sup>[28]</sup>
Farinha de trigo	5; 4,5; 3; 5	5; 4,5; 3; 5	80; 70; 60; 66	Vieira et al. <sup>[30]</sup>
Arroz parboilizado e integral	5; 4; 5; 4	15; 18; 15; 19	88; 78; 70; 72	Coelho et al. <sup>[27]</sup> Nunes et al. <sup>[29]</sup>
Arroz branco	3; 4; 5; 4	12; 17; 15; 16	91; 83; 78; 75	Badiale-Furlong et al. <sup>[26]</sup>
Farelo de arroz fermentado	6,5; 5; 6; 6	16; 19; 23; 25	80; 70; 70; 68	Badiale-Furlong et al. <sup>[35]</sup>
Biomassa fúngica	4; 5; 5; 4	8; 8; 10; 9	86; 80; 76; 82	Oliveira, B.Furlong <sup>[36]</sup>
Arroz e derivados	2; 1; 2; 1,5	4; 3; 5; 4	90; 83; 80; 86	Relatório técnico

LQ: limite de quantificação; CV: coeficiente de variação.

## 2.2. Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) passou a fazer parte da legislação brasileira a partir de 2011<sup>[25]</sup>, mas vem sendo limitada em vários países há mais de duas décadas, pois estão demonstrados os seus efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos, teratogênicos e imunossupressores<sup>[1,2,7,9]</sup>. Ela é produzida em cereais e seus derivados por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*.

Quimicamente a OTA caracteriza-se por possuir uma estrutura de beta fenilalanina associada a isocumarina que lhe confere a propriedade de fluorescer sob luz ultra violeta, cuja detecção visual ou instrumental é possível em níveis acima de 5 ng<sup>[9,10,41,42]</sup>. A família das ocratoxinas é constituída por formas derivadas, sendo OTA, a mais tóxica e moderadamente estável a condições de beneficiamento e tratamento térmico ao longo da cadeia industrial<sup>[42]</sup>. Em vista disso tem sido propostas estratégias para limitar seus níveis a valores aceitáveis de exposição para não causar prejuízos a saúde de humanos e de animais de criação<sup>[34,35,42]</sup>.

O método de Soares e Rodriguez-Amaya<sup>[10]</sup> foi validado, com adaptações operacionais específicas, para extrair OTA de arroz, farinha de trigo e fubá<sup>[26]</sup>. Nestas matrizes a OTA foi detectada apenas quando acima de 6 ng g<sup>-1</sup> para os dois primeiros e 10 ng g<sup>-1</sup> para o último; com recuperações médias para três níveis de 78%, 83% e 77% e coeficientes de variação 19%, 16% e 23% respectivamente para amostras de arroz, farinha de trigo e fubá<sup>[26]</sup>.

Com esta performance o método foi aplicado ao monitoramento de alimentos a base de cereais disponíveis no comércio da região sul do Rio Grande do Sul. Foi verificado que 16% das amostras, estavam contaminadas com valores entre 26 e 35 ng g<sup>-1</sup><sup>[26]</sup>. Outros autores também empregaram CCD e detecção de OTA por fluorescência para monitorar a incidência em derivados de milho<sup>[43]</sup>.

Amostras de pizza semi-pronta, coletadas na mesma região não apresentaram contaminação detectável, dentro dos limites do nosso procedimento, porém na biomassa fúngica da micota isoladas das pizzas e cultivada por 21 dias houve produção e detectável de OTA<sup>[28]</sup>, evidenciando o risco

Em arroz destinado ao consumo humano OTA foi detectada nos tipos parboilizado (128 ng g<sup>-1</sup>) e polido (100 ng g<sup>-1</sup>)<sup>[27,44]</sup>, fato que reforçou o já demonstrado por Coelho et al.<sup>[27]</sup> que estudando a migração de micotoxinas durante o processo de parboilização verificou que a OTA era a que mais migrava para o endosperma amiláceo, na etapa de encharcamento do grão. O risco de migração dela para o interior do grão durante a parboilização foi reforçado no estudo de Dors et al.<sup>[44]</sup>.

O efeito do processo fermentativo e do tratamento térmico nos níveis de OTA em farelo de arroz artificialmente contaminado também foi avaliado empregando o método adaptado. Com os indicativos de mérito do procedimento foi possível detectar diferenças



significativas entre amostras tratadas e não tratadas com os efeitos em estudo<sup>[34,35]</sup>.

Visando minimizar a geração de resíduos o método QuEChERS foi adaptado para determinação de OTA empregando CCD e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Interessante observar que para a CCD ou em HPTLC e detecção por fotometria foram encontrados limites de quantificação de  $0,9 \text{ ug g}^{-1}$  e  $0,5 \text{ ng g}^{-1}$ ; recuperação 113 e 84% respectivamente para HPTLC e HPLC<sup>[45]</sup>, portanto aplicável ao monitoramento da observação da atual legislação brasileira para este contaminante.

### 2.3. Zearalenona

A zearalenona (ZON), cujo nome deriva de um fungo do complexo *Fusarium Giberella zeae*, o principal produtor, é uma micotoxina de efeito estrogênico, cuja estrutura é derivada do ácido resorcilico, que possui fluorescência fraca, sendo assim para detectá-la visualmente são necessários no mínimo 30 ng por mancha<sup>[9,10]</sup>. Ela não é considerada um composto de alta toxicidade, pois estudos demonstraram que doses de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  em camundongos e ratos não ocasiona letalidade. No entanto, pode atuar como um hormônio esteroide em doses superiores a  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  diariamente promovendo hiperestrogenismo em suínos<sup>[1,2,7,9]</sup>.

Em alguns países já havia legislação para limitar a presença de ZON em alimentos, principalmente naqueles destinados ao consumo animal<sup>[8,9]</sup>, porém no Brasil passou a fazer parte da legislação após a RDC n°7 da ANVISA<sup>[25]</sup>. Usando a fluorescência características estão disponíveis procedimentos envolvendo a determinação dela por CCD e detecção visual, que pode ser melhorada com uso de tricloreto de alumínio ou reações que promovam o enrijecimento da estrutura<sup>[9,10,15,16]</sup>.

O método de Soares e Rodriguez-Amaya<sup>[10]</sup> também foi o ponto de partida para validação e aplicação à determinação de ZON em amostras de arroz branco, farinha de trigo e fubá, com os seguintes indicativos de confiabilidade: limite de quantificação 45, 40 e 32

ng por ponto; coeficiente de variação 20, 21 e 18% e recuperação média (três níveis de contaminação) 75, 88 e 85% respectivamente para cada derivado cereal<sup>[26]</sup>.

Em levantamentos realizados em amostras de arroz, farinha de trigo e de milho disponíveis no comércio da região sul do em Rio Grande, RS, no período entre 1996 e 1997 foram detectadas 6% de amostras de farelo de trigo e farinha de trigo integral contaminadas em níveis entre 97 e  $105 \text{ ng g}^{-1}$ <sup>[26]</sup>. Nunes et al.<sup>[29]</sup> empregaram o mesmo procedimento para realizar levantamento desta micotoxina em amostras de arroz comercializado no Rio Grande do Sul encontrando-a em arroz branco, parboilizado e integral com valores elevados para as legislações existentes, entre 559 e  $1955 \text{ ng g}^{-1}$ .

### 2.4. Desoxivalenol e toxina T-2.

Estas micotoxinas fazem parte de um grupo químico sesquiterpenico denominado tricotecenos que são produzidas principalmente por fungos do complexo *Fusarium*. Variações na estrutura tricotecanica (dois hexaneis associados a um anel epóxido) são a base para classificação deles em 4 grupos A, B, C, D, que também diferem quanto a toxicidade e substrato preferencial<sup>[7,9,14,46]</sup>.

O deoxivalenol (DON), um tricoteceno do grupo B é o mais estudado em grãos cereais pois promove danos no sistema gastrointestinal e imunológico demonstrado em animais e humanos<sup>[2,7,9]</sup>. Seus limites aceitáveis em alimentos estão definidos por lei em muitos países, inclusive no Brasil aonde a implantação da legislação é progressiva, com os níveis aceitáveis diminuindo até  $500 \text{ ng g}^{-1}$  em 2017<sup>[8,25]</sup>.

A toxina T2 pertence ao grupo A é promotora de efeitos agudos que levam a morte por hemorragia, mas em função dos poucos dados sobre sua ocorrência nos alimentos faz parte da legislação de poucos países<sup>[1,2,7,9,14]</sup>.

Após a demonstração da toxicidade dos tricotecenos ao sistema imunológico e neurológico foram propostos vários métodos para determina-los

isolados ou em multimétodos, mas a falta de grupos cromóforos nas suas estruturas torna difícil a detecção pela absorvidade ou a fluorescência, salientando que a separação cromatográfica é indispensável<sup>[9,14]</sup>.

A visualização após separação por CCD é facilitada com o emprego de reagentes de derivação que aumentam a absorvidade dos tricotecenos, assim como para a determinação por cromatografia gasosa é necessário volatiliza-los<sup>[9,14,47-49]</sup>.

Partindo da extração proposta por Soares e Rodriguez-Amaya<sup>[10]</sup> e Badiale-Furlong e Soares<sup>[46]</sup> foram estudados reagentes clarificantes (celite, sulfato de amônio, carvão ativo), solventes para partição (clorofórmio, diclorometano separados e em mistura) e reagentes de derivação (tricloreto de alumínio, ácido sulfúrico e ácido cromotrópico) para determinação delas por CCD em malte cervejeiro<sup>[47]</sup>. O método também foi adotado para acompanhar o efeito da fermentação alcoólica nos níveis destas toxinas presentes em malte cervejeiro<sup>[50]</sup>.

Após a validação o procedimento foi aplicado para determinar as micotoxinas em amostras de arroz e farinha de trigo (dados não publicados). O limite de detecção foi 40 ng e 50 ng por mancha; recuperação de 77,9 e 80,5%; coeficiente de variação 17 e 11% respectivamente para DON e toxina T2. Num levantamento aonde foram coletadas 112 amostras de farinha de trigo e 72 duas amostras de arroz branco foram confirmadas 2 amostras de arroz e uma amostra de farinha de trigo contaminadas com DON abaixo dos limites mínimos da legislação brasileira atual para esta micotoxina<sup>[47]</sup>.

Considerando os limites da legislação brasileira para o DON<sup>[25,60]</sup> a detecção de DON empregando o método de camada delgada pode ser adaptada e validada para ser realizada em laboratórios com infraestrutura mais simples ou para a triagem pois com a disponibilidade de cromatoplas de alta performance e detecção fotométricos associadas a confirmação química os indicativos de mérito analítico podem ser otimizados. A aplicação em amostras de alimentos destinadas ao

consumo humano em especial, em trigo e arroz e seus derivados pode fornecer subsídios para providências e estratégias ao longo da cadeia produtiva destes cereais.

### 3. Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama aplicada a determinação de tricotecenos

A separação de misturas químicas em cromatografia gasosa (CG) requer que os componentes da mistura sejam voláteis em temperaturas que não ocasionem a sua decomposição, fato que limita a determinação a compostos naturalmente voláteis ou que possam ser derivatizados estequiometricamente. Os eluatos podem ser detectados por condutividade térmica, ionização de chama, captura eletrônica ou espectrometria de massas<sup>[51]</sup>. O primeiro tipo de detector não é indicado para micotoxinas pois é pouco sensível e o de captura eletrônica é mais recomendado para compostos derivados como halogênio<sup>[14,52]</sup>.

Os tricotecenos são os contaminantes fúngicos que melhor se adaptam a determinação empregando CG, acoplada a detectores de ionização de chama, captura eletrônica e espectrometria de massas, pois que estas micotoxinas possuem baixa absorvidade na região do ultravioleta-visível sendo melhor detectadas por outras propriedades<sup>[14-16]</sup>.

Partindo do método descrito por Badiale-Furlong e Soares<sup>[46]</sup> para determinação de sete tricotecenos empregando CG acoplada a detector de ionização de chama, foi adaptado e validado um procedimento para determinação de DON e toxina T2, obtendo-se recuperação média de 83 e 103%; limite de detecção 21 e 60 ng mL<sup>-1</sup> para DON e toxina T2. O procedimento foi aplicado para verificar a contaminação em 72 amostras de cerveja, comercializadas na região sul do Brasil, das quais 5,3 e 4,5% estavam contaminadas com DON e toxina T2 respectivamente<sup>[53]</sup>.

Em vista da instabilidade e do custo do reagente derivatizante empregado pelos autores<sup>[46]</sup> (heptafluorobutiril imidazol) para derivação foi testado



o anidrido trifluoroacético (TFAA) tendo por catalisador o bicarbonato de sódio cujas condições reacionais foram otimizadas empregando planejamento experimental, tendo como variáveis o tempo, a temperatura e proporções de TFAA adequados para total derivação do DON<sup>[54]</sup>. As melhores condições foram obtidas quando a 20 µg do tricoteceno eram adicionados 200 µL do reagente TFAA e 18 mg de bicarbonato de sódio reagindo por 6 minutos a 75°C. O limite de detecção aplicando as condições cromatográficas foi de 1,4 µg de DON<sup>[54]</sup>.

O método padronizado também foi empregado para determinação da distribuição de tricotecenos (DON e toxina T2) durante a elaboração de cerveja<sup>[55]</sup> e para avaliar o potencial do *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus oryzae* como agentes para descontaminação de farelo de arroz e de trigo<sup>[56,57]</sup> e para estudar a migração dos tricotecenos durante a parboilização de arroz<sup>[58]</sup>.

#### 4. As técnicas cromatográficas aplicadas a situação micotoxicológica de alimentos

Dors<sup>[59]</sup> apresentou informações sobre contaminação de arroz e seus derivados, determinados por cromatografia de camada delgada numa tabela (Tabela 2) que ilustra numericamente o risco da contaminação por micotoxina num alimento de rotina na dieta brasileira.

As informações e dados destacados neste texto, mesmo provenientes de um grupo que atua em uma região restrita também confirmam que o problema da ocorrência das micotoxinas é um fato nos alimentos destinados ao consumo humano. Outros grupos atuando no tema reforçam a existência do risco com estes contaminantes<sup>[9,10,19,43]</sup>.

Até 1996 uma instrução normativa do MARA<sup>[60]</sup>, nº183, tratava apenas de limitar o nível de 20 ng g<sup>-1</sup> para a somatória das 4 aflatoxinas, enquanto a legislação européia já estabelecia para alimentos em geral 4 ng g<sup>-1</sup><sup>[8]</sup>. Possivelmente os dados disponibilizados pelos grupos que dispõem esforços para estudar o problema, mesmo sob condições de infraestrutura nem sempre compatíveis com os avanços de instrumentação analítica, e considerando micotoxinas para as quais não havia restrição legal foram importantes e nortearam a revisão da legislação brasileira.

Foram estabelecidas a RDC nº 7<sup>[25]</sup> de 2011, RDC nº 59<sup>[60]</sup> e ainda a Instrução normativa nº18 do MAPA<sup>[61]</sup> que ampliam o número de micotoxinas e de alimentos com limites máximos permitidos para estes contaminantes. Foram incluídas além das AFAs, OTA, DON, fumonisinas, patulina e ZON em alimentos à base de cereais, frutas, destinados ao consumo infantil e de consumo frequente.

**Tabela 2.** Ocorrência de micotoxinas em arroz comercializados no sul do Brasil.

Produto (nº amostras)	Micotoxina	Contaminação	Autores
Arroz branco (11)	Nd		Coelho, 1998
Arroz integral (33)	AFA B <sub>1</sub> e OTA	6%	Coelho, 1998
Arroz parboilizado (12)	OTA	17%	Coelho, 1998
FAD (16)	AFA B <sub>1</sub> e OTA	19%	Furlong et al., 1999
FAD (8)	AFA B <sub>1</sub> e OTA	37%	Furlong et al., 1999
Arroz parboilizado (12)	OTA	8%	Furlong et al., 1999
Arroz branco (15)	Nd		Furlong et al., 1999
Farinha de arroz	Nd		Furlong (2001)
FAD (16)	ZEA e OTA	8%	Furlong (2002)
Arroz integral (16)	Nd		Nunes et al., 2003
Arroz parboilizado (16)	ZEA e OTA	18,5%	Nunes et al., 2003
Arroz branco (24)	ZEA e OTA	8,3%	Nunes et al., 2003

AFA: aflatoxina; OTA: ocratoxina A; ZEA: zearalenona; FAD: farelo de arroz desengordurado; nd: não detectado. Fonte: DORS<sup>[59]</sup>.

Para consolidar a eficácia da lei para diminuir a exposição aos contaminantes seria interessante que fossem realizados estudos para desenvolver métodos analíticos exequíveis em diferentes laboratórios do país, com a confiabilidade necessária para detectar estes contaminantes dentro dos limites estabelecidos.

Neste sentido todas as micotoxinas naturalmente fluorescentes, AFAs e OTA ou que podem sofrer derivação, ZON e DON, para melhorar esta propriedade podem ser determinadas após separação por CCD desde que empregando cuidados de validação e algumas sofisticções disponíveis como cromatofolhas de nanopartículas ou determinação eletrofotométrica da fluorescência.

## 5. Considerações Finais

Uma legislação para promover efetivamente benefícios para a população, em termos de segurança de alimentos pelo monitoramento da ocorrência de contaminantes é dependente da disponibilidade de métodos acessíveis e validados. Num país como o Brasil

com a desuniformidade de recursos laboratoriais, com a limitação de depender de importação de insumos e instrumentos cromatográficos, aspectos que podem ser agravados pela crise econômica, a continuidade do monitoramento seguira sendo um desafio.

Para que não haja retrocesso com os cuidados para prevenir danos a saúde da população os dados precisarão ser gerados de forma econômica para propiciar a continuidade do monitoramento. Mesmo que os informes nem sempre sejam adequadas a divulgação em periódicos de grande impacto, quer pela regionalidade ou por não adotarem técnicas cromatográficas de ponta; porém eles serão indispensáveis para efetivar o avanço das medidas de segurança, desde que validados conforme a situação específica. Eles subsidiarão a tomada de medidas estratégicas e preventivas ao longo da cadeia agroindustrial.

## Agradecimentos

CNPq, CAPES, FAPERGS pelo suporte financeiro. Aos discentes e parceiros pela dedicação ao tema.

## Referências Bibliográficas

- [1] HUSSEIN HS, BRASEL JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001; 167: 101-134.
- [2] HEIDTMANN-BEMVENUTI R, SCAGLIONI PT, LEMOS G, BADIALE-FURLONG E, SOUZA-SOARES LA. Biochemistry and Metabolismo of Mycotoxins. A review. *African Journal of Biochemistry Research* 2011; 5:861-869.
- [3] SWEENEY MJ, DOBSON AD. Mycotoxin production by *Aspegillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 43: 141-158.
- [4] BULLERMAN LB, BIANCHINI A. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 119: 140-146.
- [5] SCOTT PM. Effects of Food Processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection* 1984; 47(6): 489-499.
- [6] ROCHA MEB, FREIRE CO, MAIA FEF, GUEDES MIF, RONDINA D. Mycotoxins and their effects on human and animal health...*Food Control* 2014; 21: 988-991.
- [7] ZAIN ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 2011; 15: 129-144.
- [8] FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO, 2004) World wide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Roma. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499/y5499>, acesso: julho 2015
- [9] YOSHISAWA, T. Mycotoxin Analysis for Federative Republic of Brazil. Training Course, Japão, 2001, 283p.
- [10] SOARES LMV, RODRIGUEZ-AMAYA D. 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* 1989; 72: 22-26.
- [11] MOSS MO. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2002; 50: 137-142.
- [12] COLLINS CH. O aperfeiçoamento da cromatografia de camada delgada...*Scientia Chromatographica* 2010; 1: 5-9.
- [13] COLLINS CH. O desenvolvimento da cromatografia de camada delgada. *Scientia Chromatographica* 2010; 1: 5-12.
- [14] KOCH P. State of the art of trichothecenes analysis. *Toxicology Letters* 2004; 153: 109-112.
- [15] KRŠKA R, MOLINELLI A. Mycotoxin analysis: State of the art and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007; 387: 1, 145-148.
- [16] CIGIC IK, PROSEN H. An overview of conventional and emerging analytical methods for determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 2009; 10 (1): 62-115.
- [17] SALO JP, SALOMIES H. Teaching the basics of pharmaceutical analysis by thin-layer chromatography and high performance thin-layer chromatography to undergraduate students-Laboratory Pratical. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1999; 82(1): 38-47.
- [18] POHLAND AE; YIN L, DANTZMAN JG. Rapid chemical confirmatory method for aflatoxin B<sub>1</sub>. I. Development of the method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1970; 53 (1): 102-104.
- [19] HOELTZ M, WELKE JE, NOLL IB, DOTTORI HA. Photometric procedure for quantitative analysis of Aflatoxin B<sub>1</sub> in peanuts by thin layer chromatography using, charge coupled device detector. *Química Nova* 2010; 33(1): 43-47.
- [20] PONS Jr WA, CUCULLU AF, FRANZ Jr A. Rapid Quantitative TLC Method for Determining Aflatoxins in Cottonseed Products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1972; 55(4):768-774.
- [21] NESHEIM S, TRUCKSSES MW, PAGE S. Molar absorptivities of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in acetonitrile, methanol, and toluene-acetonitrile (9+1) (Modification of AOAC Official Method 971.22): Collaborative Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1999; 82(2): 251-258.
- [22] RODICKS JV, STOLOFF L. Determination of Concentration and Purity of Aflatoxin Standards. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1999; 82 (2): 251-258.
- [23] VONGBUDDHAPITAK A, TRUCKSESS MW, SUPRASER D, ATISSOOK K, HORWITZ W. Laboratory proficiency testing of aflatoxins in corn and peanuts – A cooperative project between Thailand and the United States. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1999; 82(2): 259-270.
- [24] WHITAKER TB, WU J, DOWELL FE, HAGLER Jr WM, GIESBRECHT F. Effects of Sample Size and Sample Acceptance Level on the Number of Aflatoxin-Contaminated Farmers' Stock Lots Accepted and Rejected at the Buying Point. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1994; 77(6): 1672-1670.

- [25] AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União – Seção 1, nº 37.
- [26] BADIALE-FURLONG E, SOARES LAS, VIEIRA AP, DADALT G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. Revista do Instituto Adolfo Lutz 1999; 58 (2): 105-111.
- [27] COELHO CSP, ALMEIDA TL, BADIALE-FURLONG E. Migração de micotoxinas durante a parboilização do arroz. Brazilian Journal of Food Technology 1999; 2 (1): 39-44.
- [28] PINHO BH, BADIALE-FURLONG E. The occurrence of molds, yeasts and mycotoxins in pre-cooked pizza dough sold in southern Rio Grande do Sul. Brazilian Journal of Microbiology 2000; 31: 99-102.
- [29] NUNES IL, MAGAGNIN G; BERTOLIN TE, BADIALE-FURLONG, E. Arroz comercializado na região sul do Brasil: Aspectos micotoxicológicos e microscópicos. Ciência e Tecnologia de Alimentos 2003; 23 (2): 190-194.
- [30] VIEIRA AP, MARIANO M.L, BADIALE-FURLONG E. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos 1999; 19: 256-263.
- [31] WERNIMONT GT. Use of Statistics to develop and evaluate analytical methods. Arlington: Association of Official Analytical Chemists 1985; 183p.
- [32] HORWITZ W, KAMPS LR, BOYER KW. Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 1980; 63:1344-1355.
- [33] HORWITZ W. International coordination and validation of analytical methods. Food Additives and Contaminants 1993; 10: 61-69.
- [34] CACCIAMANI JLM, PEREZ GL, GARDA J, BADIALE-FURLONG E. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A presentes em farelos e farinhas de cereais. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos 2007; 25: 157-164.
- [35] BADIALE-FURLONG E, CACCIAMANI JLM, BUFFON JG. Fermentação fúngica: Enriquecimento protéico e degradação de micotoxinas em farelo de cereal contaminado com aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A. Brazilian Journal of Food Technology 2008; 10 (4): 1-7.
- [36] OLIVEIRA MS, BADIALE-FURLONG E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. World Mycotoxin Journal 2008; 1 (2): 139-146.
- [37] SOUZA MM, PRIETTO L, RIBEIRO A.C, SOUZA TD, BADIALE-FURLONG E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* against *Aspergillus flavus*. Ciência e Agrotecnologia 2011; 35: 1050-1058.
- [38] HACKBART HLS. Biodegradação de Aflatoxinas. Tese do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande 2013; 169p.
- [39] PRIETTO, L. Operações de pós-colheita do arroz e seus impactos nos níveis de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande 2014; 85p.
- [40] TELLES, A.C. Feijões: características químicas e ocorrência de aflatoxinas. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande 2015; 68p.
- [41] MOSS MO. Mode of formation of ochratoxin A. Food Additives and Contaminants 1996; 13: 5-9.
- [42] SCOTT PM. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. Food Additives and Contaminants 1996; 13: 19-21.
- [43] NOLL IB, BADIALE-FURLONG E, TRINDADE E. Incidência de ocratoxina A em produtos derivados de milho comercializadas na cidade de Porto Alegre, RS. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos 2001; 9: 2-3.

- [44] DORS GC, PINTO RH, BADIALE-FURLONG E. Parboiled rice: occurrence of mycotoxins and chemical composition. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2009; 31: 171-174.
- [45] KUPSKI L, BADIALE-FURLONG E. Principal components analysis. An innovative to stablish interferences in ochratoxin A detection. *Food Chemistry* 2015; 177: 354-360.
- [46] BADIALE-FURLONG E, SOARES LM. Trichotecenes in wheat: a gas chromatographic method for quantification and confirmation of deoxinivalenol, nivalenol, diacetoxysciproenol, T2 and HT2 toxins, T2 tetraol and T2 triol. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1995; 78: 386-396.
- [47] BARAJ E, BADIALE-FURLONG E. Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T2. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 2003; 62, 18-26.
- [48] SABINO M, ICHIKAWA AH, INOMATA EI, LAMARDO LCA. Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 1989; 49(2): 155-159.
- [49] SCHAAFSMA AW, NICOL RW, SAVARD ME, SINHA RC, REID LM. Analysis of fusarium toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. *Mycopathology* 1998; 142: 107-113.
- [50] RHEINER CO, BADIALE-FURLONG E. Profile of the alcohols produced in fermentations with malt contaminated with trichotecenes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2003;..46: 12-18.
- [51] STASHENKO E, MARTINEZ JR. GC y GC-MS: Configuración del Equipo Versus Aplicaciones. *Scientia Chromatographica* 2010; 2(3): 33-59.
- [52] SOARES LMV. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 2001; 60 (1): 79-84
- [53] GARDA J, MACEDO R.J, BADIALE-FURLONGE. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2004; 24 (4): 657-663.
- [54] GARDA-BUFFON J, BADIALE-FURLONG E. Otimização de metodologia para derivação de deoxinivalenol através de planejamento experimental. *Química Nova* 2008; 31:270-274
- [55] GARDA J, MACEDO RM, FARIA R, BERND L, DORS GC, BADIALE-FURLONG,E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichotecenes. *Food Control* 2005; 16: 423-428.
- [56] GARDA-BUFFON J, BADIALE-FURLONG E. Kinetics of deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation.. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2010; 21:710-714.
- [57] GARDA-BUFFON J, KUPSKI L, BADIALE-FURLONG E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2011; 31(1): 198-203.
- [58] DORS GC, PINTO LAA, BADIALE-FURLONG E. Migration of micotoxins into rice starchy endosperm during the parboiling process. *Food Science and Technology International* 2009; 42: 433-437.
- [59] DORS, G.C. Uso de fungicida no cultivo de arroz irrigado e seus efeitos na composição físico química, bioquímica e micotoxicológica dos derivados do grão. Tese de doutorado do Programa de Pós graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, 2010, 166p.
- [60] AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC nº 59, de 31 de dezembro de 2013. Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União – Seção 1*
- [61] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 18, de 25 de junho de 2013. Escopo Mínimo de Contaminantes que deve ser monitorado por cultura agrícola. *Diário Oficial da União, 27/06/2013 – Seção 1.*