

Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz

Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice

Eliane M. R. S. SIMIONATO¹
Renato M. ASTRAY²
Célia M. de SYLOS^{2*}

RIALA6/949

SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; SYLOS, C. M. de - Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 62(2): 123 - 130, 2003.

RESUMO. Conhecer as micotoxinas que possam ser encontradas no arroz, alimento básico da população brasileira, é importante para a saúde pública. Aflatoxinas e ocratoxina A foram determinadas pelo método de Soares e Rodriguez-Amaya acrescido de partição para ciclohexano. Os testes de recuperação foram realizados em arroz polido e em arroz integral, artificialmente contaminados com aflatoxina B₁ (AFB₁), com ocratoxina A (OTA) e, com AFB₁ e OTA juntas. Recuperações entre 93 e 104% e entre 87 a 103% foram obtidas para AFB₁ em arroz polido e em arroz integral, respectivamente. Para a OTA, as recuperações estavam entre 80 e 105% para o arroz polido e entre 83 e 94% para o arroz integral. Os limites de quantificação conseguidos para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ foram de 1, 1, 3 e 1 µg/kg para o arroz polido, e de 3, 1, 4 e 3 µg/kg para arroz integral, respectivamente. Para a OTA foi de 4 µg/kg em arroz polido e de 10 µg/kg em arroz integral. Foram analisadas 68 amostras de arroz e não foi encontrada OTA em nenhuma delas. AFB₁ foi detectada em duas amostras de arroz polido tipo 1 (2,9%), com teores de 9 e 6 µg/kg. Uma das amostras apresentou traços de aflatoxina B₂.

PALAVRAS-CHAVE. aflatoxinas, ocratoxina A, arroz, cromatografia em camada delgada, micotoxinas

Endereço para correspondência:

¹Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde - Universidade do Sagrado Coração - CEP 17044-160 - Bauru - SP, Brasil.

²Departamento de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Caixa Postal 502 - CEP 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil. syloscm@fcar.unesp.br

INTRODUÇÃO

Certos fungos, freqüentemente encontrados em grãos, têm a capacidade de produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários capazes de causar alterações tóxicas, mutagênicas, teratogênicas ou carcinogênicas em animais e humanos.

Com vistas ao conhecimento de micotoxinas em alimentos, estudos visando aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são sem dúvida urgentes e necessários.

Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas, metabólitos secundários dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência, possuindo inclusive propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. As principais aflatoxinas são B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁) e M₂ (AFM₂)¹⁶.

A toxicidade é maior para aflatoxina B₁, seguida pelas AFG₁, AFB₂ e AFG₂. A ação tóxica verificada em animais é chamada de carcinoma hepatocelular, a qual é considerada como uma falha do fígado, com destruição das células parenquimatosas e proliferação dos canais biliares. Em humanos a ação tóxica é crônica, e tem sido correlacionada à incidência de câncer de fígado em regiões com alta contaminação por aflatoxinas⁹. Segundo IARC¹⁴, a aflatoxina B₁ é considerada carcinogênica para o homem.

Muitos alimentos têm apresentado contaminação por aflatoxinas, principalmente amendoim e derivados, milho, arroz, feijão, cevada, nozes e especiarias^{2,7,8,9,13,22,25,27,28,30}.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, através da Portaria nº 183 de 21/03/1996, e o Ministério da Saúde, através da Resolução RDC nº 274 da ANVISA de 15/10/2002, estabelecem, em alimentos para consumo humano, o limite de 20 µg/kg para a somatória das aflatoxinas B₁ + B₂ + G₁ + G₂.¹²

A ocratoxina A (OTA), micotoxina produzida por *Aspergillus ochraceus* e por *Penicillium verrucosum*, é classificada pelo IARC como um agente possivelmente cancerígeno para o homem¹⁶. Tem sido correlacionada com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (doença caracterizada por progressiva redução das funções renais)¹¹, devido ao teor elevado da toxina encontrado no sangue das pessoas que apresentam a doença e nos alimentos consumidos naquela região.

OTA tem sido detectada em vários alimentos, dentre eles alguns que fazem parte do consumo alimentar diário do brasileiro, como arroz, feijão, café, milho e trigo^{13,28,29,32,33}.

O arroz (*Oryza sativa* L.), juntamente com o milho, é o segundo cereal mais produzido no mundo, estando atrás apenas do trigo. O Brasil é um dos poucos países não asiáticos no qual o arroz é cultivado e utilizado como gênero básico de consumo alimentar, ocupando o décimo lugar em consumo mundial de arroz²⁶.

Embora a presença de fungos produtores de micotoxinas em arroz tenha sido verificada por diversos pesquisadores^{6,21,31},

levantamentos realizados mostraram a baixa ocorrência de micotoxinas.

A ocorrência de micotoxinas em arroz vem sendo relatada pelos pesquisadores de vários países^{1,7,8,10,19,20,22,23,29,30}. No Brasil, os relatos sobre ocorrência de aflatoxinas e OTA em arroz são poucos e os níveis e a incidência são baixos^{2,13,28}.

O objetivo deste trabalho foi adaptar a metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya²⁸ para a determinação de aflatoxinas e ocratoxina A, simultaneamente, em arroz polido e arroz integral e verificar a ocorrência destas micotoxinas em amostras comerciais de arroz da região de Araraquara.

MATERIAL e MÉTODO

Material

As amostras de arroz foram obtidas em supermercados, mercados e armazéns do município de Araraquara, Estado de São Paulo. Foram coletadas cerca de 200g de arroz provenientes de unidades comerciais de 5 ou 2 kg, estas foram homogeneizadas, moídas em liquidificador e passadas por uma peneira de 20 mesh. As amostras moídas foram armazenadas para posterior contaminação com soluções padrão das micotoxinas.

Foram analisadas 60 amostras de arroz polido (31 do tipo 1, 16 de tipo 2, 11 do tipo 1 parboilizado, uma de tipo 2 parboilizado e uma de cateto) e 8 amostras de arroz integral (uma do tipo 1, uma de tipo 2, cinco de parboilizado e uma de cateto).

As análises para determinação de aflatoxinas e ocratoxina A foram realizadas em duplicata.

Método

Inicialmente, o método a ser utilizado²⁸ foi avaliado quanto à limpeza do extrato, taxas de recuperação para as micotoxinas e estabelecido os limites de detecção e de quantificação para amostras de arroz polido e de arroz integral.

O método por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de Soares e Rodriguez-Amaya²⁸ consiste na extração das toxinas com metanol-KCl 4% (9:1), remoção de interferentes com solução de sulfato de amônio 30% e partição para clorofórmio. As micotoxinas foram quantificadas por comparação visual da intensidade da fluorescência das amostras com padrões sob iluminação UV a 365 nm.

A avaliação e o estudo da recuperação do método foram realizados com amostras de arroz do tipo 1 e de integral. Elas foram contaminadas artificialmente com AFB₁, com OTA, com AFB₁ + OTA e com AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂. Cada ensaio foi realizado em dois ou três níveis de contaminação com seis repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Adequação da metodologia

O uso da solução de sulfato de amônio 30% para limpeza das amostras foi mais efetivo que a solução de sulfato de cobre

a 10%, embora este último seja proposto por Soares e Rodriguez-Amaya²⁸ para amostras de arroz.

Para separação das micotoxinas em camada delgada de sílica gel foi avaliado três misturas de solventes: tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (6:4:0,5); benzeno-metanol-ácido acético (18:1:1) e tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1), sendo esta última àquela que conseguiu separar a OTA e as quatro aflatoxinas simultaneamente. Entretanto, foi verificado à presença de interferentes próximos a mancha do padrão de OTA, dificultando sua visualização e quantificação. Para as aflatoxinas tal problema não ocorreu.

Utilizando o método de Soares e Rodriguez-Amaya²⁸ o limite de quantificação conseguido para ocratoxina A, para os dois tipos de arroz, foi de 13µg/kg, valor maior que o citado pelos autores.

Soares e Rodriguez-Amaya²⁸ obtiveram para ocratoxina A, em amostras de milho, farinha de mandioca, arroz e feijão, um limite de detecção de 5 µg/kg e um limite de quantificação de 10 µg/kg. Os autores definem limite de quantificação como sendo a menor concentração que pode ser confirmada e quantificada com reprodutibilidade e limite de detecção como o menor teor de um composto que pode ser detectada, mas não quantificada.

A legislação brasileira não estabelece limites máximos permitidos para OTA em alimentos, entretanto, os limites estabelecidos por outros países como França, EUA e Dinamarca para cereais estão na faixa de 5 µg/kg¹², valor menor que o limite por nós conseguido. Com o objetivo de eliminar os interferentes que eluíam junto com a OTA, e baixar o limite de quantificação, foram testados alguns procedimentos em amostras artificialmente contaminadas com OTA e AFB₁.

A inclusão da etapa de desengorduramento antes da partição para clorofórmio foi testada com hexano e ciclohexano. O uso do ciclohexano (100ml) foi melhor, proporcionou um extrato mais limpo sem “strecking” para amostras de arroz polido. Já para o arroz integral ainda se observava o “strecking” nas placas, embora de menor intensidade.

Uma vez que colunas de extração em fase sólida têm sido utilizadas por alguns pesquisadores para a limpeza dos extratos na análise de micotoxinas^{4,5,17,18}, testou-se a limpeza em coluna de sílica para amostras de arroz polido e integral. As etapas de extração, limpeza com solução de sulfato de amônia e partição para clorofórmio foram mantidas. O extrato de clorofórmio seco

foi redissolvido com duas alíquotas de 0,5 mL de tolueno e transferido quantitativamente para o cartucho de sílica (WATERS), previamente condicionado com 10 mL de tolueno. Após lavagem da amostra com 10 mL de tolueno, a ocratoxina A foi eluída com 10 mL de tolueno-ácido acético (9:1). Os extratos obtidos das amostras de arroz integral apresentavam-se com menos interferentes quando aplicados na CCD, entretanto, não foi possível eluir da coluna a AFB₁. Como nosso objetivo era utilizar um método com extração simultânea de aflatoxinas e OTA em arroz, tal procedimento foi descartado.

Outra tentativa foi melhorar a separação das micotoxinas dos interferentes na própria camada delgada de sílica gel. Após a aplicação do extrato, a placa era desenvolvida com outros solventes antes da separação das micotoxinas. Foram testados os procedimentos descritos por Di Paolo e Tosi⁵ e por Dawlatana et al⁴. As misturas avaliadas foram éter etílico-éter de petróleo (3:1) e éter etílico-metanol (98:2), antes do desenvolvimento com a fase móvel tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1).

Após a aplicação das amostras e padrões (a 4 cm da base), a placa foi colocada de cabeça para baixo e desenvolvida com éter etílico-éter de petróleo (3:1). As micotoxinas permaneciam no ponto de aplicação enquanto os interferentes corriam com a fase móvel. Em seguida era cortado cerca de 3 cm da ponta superior da placa de alumínio (onde estavam os interferentes), e esta era invertida e desenvolvida com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1) para a separação das micotoxinas. O mesmo procedimento foi realizado substituindo a mistura etílica por éter etílico-metanol (98:2). A mistura éter etílico-éter de petróleo (3:1) foi mais eficiente na limpeza das amostras do que éter etílico-metanol (98:2) na remoção de interferentes, permitindo uma boa visualização das manchas após a separação das micotoxinas na placa.

Para cada procedimento de limpeza testado foi determinado o limite de quantificação para OTA. Pelos resultados apresentados (Tabela 1) verificamos que a inclusão da etapa de desengorduramento com ciclohexano foi efetiva em amostras de arroz polido, diminuindo o limite de quantificação para 4 µg/kg. Já para o arroz integral, o uso de coluna de sílica para limpeza conseguiu baixar o valor para 7 µg/kg, entretanto este procedimento não permite quantificar as aflatoxinas simultaneamente. Com os demais procedimentos o resultado foi de 10 µg/kg.

Tabela 1. Limites de quantificação obtidos para ocratoxina A com os diferentes procedimentos de limpeza.

Procedimentos	Arroz polido (µg/kg)	Arroz integral (µg/kg)
Método SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA ²⁸	13	13
Método ²⁸ + desengorduramento com hexano	10	10
Método ²⁸ + desengorduramento com ciclohexano	4	10
Método ²⁸ + limpeza em coluna sílica	7	7
Método ²⁸ + limpeza em CCD de sílica	8	10

Tabela 2. Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) obtido pelo método proposto, em µg/kg, para as aflatoxinas e ocratoxina A.

	Arroz polido		Arroz integral	
	LD	LQ	LD	LQ
Aflatoxina B ₁	-*	1	2	3
Aflatoxina B ₂	-*	1	-*	1
Aflatoxina G ₁	2	3	4	4
Aflatoxina G ₂	-*	1	2	3
Ocratoxina A	3	4	9	10

* não foi determinado o limite de detecção.

Portanto a metodologia empregada foi extração das micotoxinas com metanol: KCl 4% (9:1, v/v), limpeza com sulfato de amônia 40%, desengorduramento com ciclohexano, partição para clorofórmio. A fase móvel usada para CCD de sílica foi tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1).

Amostras de arroz polido e de arroz integral foram contaminadas com teores decrescentes de cada aflatoxina, iniciando-se com 5 µg/kg, e analisadas pelo método estabelecido. Foi considerado como limite de quantificação, a menor concentração que pudesse ser quantificada com segurança, e como limite de detecção, a concentração que indicasse que havia a presença da toxina, embora não fosse possível quantificá-la.

Os limites de quantificação encontrados para aflatoxinas em arroz polido foram 1 µg/kg para AFB₁, AFB₂ e AFG₂ e 3 µg/kg para AFG₁ e, em arroz integral, 1 µg/kg para AFB₂, 3 µg/kg para AFB₁ e AFG₂ e 4 µg/kg para AFG₁ (Tabela 2).

Recuperação do método proposto

A determinação das taxas de recuperação da metodologia proposta foi realizada com amostras de arroz

polido foram artificialmente contaminadas com AFB₁ (3, 10, 20 e 30 µg/kg), com OTA (7, 15, 20 e 30 µg/kg), com AFB₁ + OTA (30 + 30, 15 + 30, 30 + 15 µg/kg) e com as quatro aflatoxinas (10, 20 e 30 µg/kg da cada uma). As amostras de arroz integral foram artificialmente contaminadas com AFB₁ (6, 10, 20 e 30 µg/kg), com OTA (13, 15, 20 e 30 µg/kg), com AFB₁ + OTA (30 + 30, 15 + 30, 30 + 15 µg/kg) e com as quatro aflatoxinas (10, 20 e 30 µg/kg da cada uma).

Para AFB₁ foram obtidos taxas médias de recuperação de 93 a 104% e de 87 a 103% para arroz polido e integral, respectivamente. Em relação a OTA, os valores encontrados foram de 80 a 105% para arroz polido e de 83 a 94% para arroz integral (Tabela 3).

Segundo Rodriguez-Amaya²⁴, deve ser reconhecido que o analito adicionado a um substrato não se comporta da mesma maneira que o endógeno. Recuperações de 70 a 120% são aceitas em análises de traços (µg/kg), como é o caso da determinação de micotoxinas. Portanto, os valores obtidos das recuperações podem ser considerados bons, com coeficientes de variação dentro do esperado, tanto para aflatoxina B₁ e como para ocratoxina A (Tabela 3).

Tabela 3. Taxas de recuperação de aflatoxina B₁ e ocratoxina A em arroz.

Produto	Aflatoxina B ₁			Ocratoxina A		
	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)*	CV (%)	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)*	CV (%)
Arroz polido	3	93,3	0	7	79,8	1,5
Arroz polido	10	103,0	0	15	95,2	18
Arroz polido	20	104,1	13	20	87,4	12
Arroz polido	30	100,9	0,2	30	104,6	8
Arroz integral	6	86,7	0	13	83,1	3,3
Arroz integral	10	102,9	0	15	91,0	0
Arroz integral	20	98,3	11	20	93,6	4
Arroz integral	30	101,4	5	30	90,2	10

* valor médio de 6 determinações

Tabela 4. Taxas de recuperação de aflatoxina B₁ e ocratoxina A em arroz contaminado simultaneamente com as duas micotoxinas.

Produto	Aflatoxina B ₁			Ocratoxina A		
	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)
Arroz polido	30	114,3	0	30	89,2	29,2
Arroz polido	15	116,7	22,2	30	106,0	11,7
Arroz polido	30	102,9	18,6	15	90,9	0
Arroz integral	30	81,4	0	30	75,8	15,7
Arroz integral	15	96,1	3	30	108,2	0
Arroz integral	30	114,0	0	15	101,0	15,5

* valor médio de 6 determinações

A seguir estão apresentadas as taxas de recuperação obtidas para ocratoxina A e para aflatoxina B₁ juntas na mesma amostra (Tabelas 4).

Embora as taxas de recuperação sejam satisfatórias, um elevado coeficiente de variação foi obtido para a aflatoxina B₁ na presença da ocratoxina A, tanto para arroz polido quanto para o integral, em todos os níveis de contaminação estudados.

No caso da recuperação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ juntas, tanto para o arroz polido quanto para o integral, as

porcentagens de recuperação foram menores do que aquelas obtidas para a aflatoxina B₁ sozinha (Tabela 3), principalmente no nível de contaminação de 10 µg/kg. Para o arroz polido, estas taxas de recuperação podem ser também consideradas satisfatórias, sendo a menor de 74,9% (para AFG₁ a 10 µg/kg), mas os coeficientes de variação foram bastante elevados, chegando a 50,0% (AFB₂ 10 µg/kg) (Tabela 5). Os dados obtidos para amostras de arroz integral mostraram taxas de recuperação de 61,1% para B₂ (10 µg/kg) e coeficiente de variação de 22,5% (Tabela 5).

Tabela 5. Taxas de recuperação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em arroz.

Aflatoxinas	Arroz Polido			Arroz Integral		
	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)	Quantidade adicionada (µg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)
AFB ₁	10	90,3	23,9	10	76,1	17,6
AFB ₂	10	84,5	50,0	10	61,1	10,7
AFG ₁	10	74,9	29,4	10	72,6	22,5
AFG ₂	10	83,8	28,8	10	72,7	16,7
AFB ₁	20	108,1	20,0	20	88,0	3,8
AFB ₂	20	85,3	11,5	20	86,8	16,6
AFG ₁	20	92,9	10,0	20	89,6	0
AFG ₂	20	86,7	0	20	91,6	11,8
AFB ₁	30	93,9	8,7	30	98,6	7,7
AFB ₂	30	87,5	5,1	30	97,8	8,9
AFG ₁	30	84,4	16,0	30	101,2	4,6
AFG ₂	30	90,8	16,0	30	97,1	0,3

* valor médio de 6 determinações

Ocorrência de Aflatoxinas e Ocratoxina A

Cada uma das 68 amostras de arroz foi analisada em duplicata segundo a metodologia estabelecida. Do total de amostras 70,6% eram de amostras arroz polido, 17,6% de arroz parboilizado e 11,8% de arroz integral. Duas amostras (2,9% do total) apresentaram contaminação por aflatoxinas. Uma apresentou 9 µg/kg de aflatoxina B₁ e traços de aflatoxina B₂ e a outra apresentou 6 µg/kg de aflatoxina B₁. As amostras contaminadas eram de arroz polido, tipo 1, longo fino. Não foi verificada a presença de ocratoxina A em nenhuma das amostras analisadas.

Outros trabalhos também mostraram a pouca ocorrência e os baixos níveis de contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A em amostras de arroz^{17,28}. O mesmo vem sendo constatado por pesquisadores brasileiros^{3,12,15,26}.

CONCLUSÕES

A metodologia empregada foi considerada adequada, tendo apresentado boa recuperação e limites de detecção satisfatórios para amostras artificialmente contaminadas com as micotoxinas, isoladamente. A adição da etapa de desengorduramento com ciclohexano foi necessária para diminuição do limite de quantificação da ocratoxina A.

A ocorrência de aflatoxinas foi muito pequena nas amostras de arroz analisadas. De um total de 68 amostras apenas duas continham aflatoxinas B₁ (6 e 9 µg/kg) e traços de aflatoxina B₂. Não foi verificada a ocorrência de ocratoxina A em nenhuma das amostras analisadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PADC/FCF – UNESP, pelo apoio financeiro, e a FAPESP, pela bolsa de Iniciação Científica do segundo autor.

SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; SYLOS, C. M. de - Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 123 - 130, 2003.

ABSTRACT. Rice is a basic food for Brazilian people and thus, it is very important to have information about the occurrence of mycotoxins in this cereal. Aflatoxins and ochratoxin A were determined at the method of Soares and Rodriguez-Amaya (1989) added of cyclohexane partition in the cleaning of the extract. The recovery tests were carried out in samples of polished rice and brown rice artificially contaminated with aflatoxin B₁ (AFB₁), with ochratoxin A (OTA) and with AFB₁ together. Recovery obtained for AFB₁, varied from 94 to 104% for polished rice and 87 to 103% for brown rice. For OTA the recovery found were between 80 and 105% for polished rice and 83 to 94% for brown rice. The quantification limits were also evaluated and for the aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ were 1, 1, 3 and 1 µg/kg for the polished rice and 3, 1, 4 and 3 µg/kg for brown rice, respectively. The quantification limit of the method for OTA was 4 µg/kg for polished rice and 10 µg/kg for brown rice. Sixty-eight rice samples were analyzed. OTA was not found in any of the analyzed samples. AFB₁ was detected in two polished rice samples: type 1 with 9 and 6 µg/kg and aflatoxin B₂ traces was found in one sample.

KEY-WORDS. aflatoxins, ochratoxin A, rice, thin layer chromatography, mycotoxins.

REFERÊNCIAS

1. Abd Alla, E.S.A.M. Zearalenona: incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. **Nahrung**, 41(6): 362-5, 1997.
2. Caldas, E.D., et al. Contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A nos alimentos consumidos no distrito federal. **Rev. Saúde Distrito Federal**, 9(2): 44-7, 1998.
3. Coelho, C.S.P. **Migração de micotoxinas durante o processo de parboilização do arroz**. Rio Grande, 1998. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade do Rio Grande].
4. Dawlatana M., et al. Normal phase HPTLC method for the quantitative determination of ochratoxin A in rice. **Chromatographia**, 42(1/2): 25-8, 1996.
5. Di Paolo, O.; Tosi, E.A. Contaminación de harina de maíz con ocratoxina A, aflatoxinas y zearalenona. **Alimentaria**, 291: 67-9, 1998.
6. Desjardins, A. E., Plattner, R.D., Nelson, P.E. Production of fumonisin B₁ and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63(5): 1838-42, 1997.
7. Dhavan, A.S., Choudary, M.R. Incidence of aflatoxins in animal feedstuffs: a decade's scenario in India. **J. AOAC Int.**, 78(3): 693-8, 1995.
8. El-Gohary, A.H. Aflatoxin in some foodstuffs with reference to public health hazard in Egypt. **Indian J. Animal Sci.**, 66(5): 468-73, 1996.
9. Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Rev. Food Sc. Nutrition**, 30(3): 403-39, 1991.
10. El-Maghraby, O.M.O. Mycotoxins and mycoflora of rice in Egypt with special reference to trichothecenes production and control. **J. Natural Toxins**, 5 (1): 49-59, 1996.
11. Fink-Gremmels, J., Jahn, A., Blom, M.J. Toxicity and metabolism of ochratoxin A. **Nat. Toxins**, 3: 214-20, 1995.
12. Fonseca, H. Micotoxinas - Legislação. [<http://www.micotoxinas.com.br>]. 30 maio 2003.
13. Furlong, E.B., et al. Aflatoxinas, ocratoxina a e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(2): 105-11, 1999.
14. IARC. Overall Evaluation of Carcinogenicity to Humans. **International Agency for Research on Cancer**. [<http://www.iarc.fr>]. 02 junho 2003.
15. Lima, C.A.P.; et al. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, 20(1): 37-9, 2000.
16. Marth, E.H. Mycotoxins: production and control. **Food Laboratory News**, 8(3): 35-51, 1992.
17. Milanez, T.V.; Sabino, M. Ocratoxina A em feijão comercializado no estado de São Paulo e sua estabilidade ao cozimento. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 49(1): 131-5, 1989.
18. Milanez, T.V., Sabino, M., Lamardo, L.C.A. Comparison of two methods for the determination of ochratoxin A in green coffee beans. **Rev. Microbiol.**, 26(2): 79-82, 1995.
19. Patel, S., et al. Survey of ethnic foods for mycotoxins. **Food Addit. Contam.**, 13(7): 833-41, 1996.
20. Patel, S., et al. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Addit. Contam.**, 14(3): 217-22, 1997.
21. Pitt, J.I., et al. The normal mycoflora of commodities from Thailand. **Food Microbiol.**, 23: 35-53, 1994.
22. Purwoko, H.M., Hald, B., Wolstrup, J. Aflatoxin content and number of fungi in poultry feedstuffs from Indonesia. **Letters**

- Appl. Microbiol.**, 16(2): 212-5, 1991.
23. Resnik, S., Costarrica, M.L., Pacin, A. Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. **Food Control**, 6(1): 19-28, 1995.
24. Rodriguez-Amaya, D.B. Metodologia - Validação de metodologia analítica. In: SCUSSEL, V.M. **Atualidade em micotoxinas e armazenagem de grãos**. 1ª.ed., Florianópolis: 2000. p.42-7.
25. Sabino, M., et al. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Rev. Microbiol.**, 30(1): 85-8, 1999.
26. SINDARROZ. O arroz. [<http://www.sindarroz-sc.com.br>]. 02 junho 2003.
27. Soares, L.M., Rodriguez-Amaya, D.B. Screening and quantification of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 68(6): 1128-30, 1985.
28. Soares, L.M., Rodriguez-Amaya, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 72(1): 1-5, 1989.
29. Studer-Rohr, I., et al. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chem. Toxicol.**, 33(5): 341-55, 1995.
30. Tabata, S., et al. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokio: 1986-1990. **J. AOAC. Int.**, 76(1): 32-5, 1993.
31. Tonon, S.A., et al. Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern Paraguay. **Int. J. Food Microbiol.**, 37(2/3): 231-5, 1997.
32. Trucksess, M.W., et al. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee - 1997. **JAOAC Int.**, 82(1): 85-9, 1999.
33. Van Egmond, H.P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Addit. Contam.**, 13(S): 11-3, 1996.

Recebido em 21/03/2003 ; Aprovado em 07/08/2003