



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Antunes Vieira Pedro

OCRATOXINA A EM ARROZ: OCORRÊNCIA
E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA
POPULAÇÃO PORTUGUESA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar
orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena
e co-orientada pela Doutora Liliana João Gatões da Silva e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Antunes Vieira Pedro

**OCRATOXINA A EM ARROZ: OCORRÊNCIA E
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO
PORTUGUESA**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e co-orientada pela Doutora Liliana João Gatões da Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro 2021

Ao avô Jaime (*in memoriam*),
pelo amor, exemplo e valores
que sempre me transmitiu.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu profundo agradecimento e reconhecimento a todas as pessoas que de uma forma importante contribuíram para que este trabalho fosse realizado:

À Professora Doutora Angelina Pena por toda a disponibilidade e oportunidade para a realização desta dissertação.

À Doutora Liliana Silva por toda a orientação, ensinamentos, disponibilidade e dedicação.

À Escola Universitária Vasco da Gama pela colaboração na realização dos imunoensaios.

À Célia Laranjeiro pelo companheirismo, tempo e ajuda ao longo de todo o trabalho laboratorial.

À Inês Marques e à Inês Gonçalves, com quem partilhei o laboratório de Bromatologia, obrigada pelo companheirismo e ajuda.

À Patrícia Leal com quem tive o privilégio de partilhar esta caminhada, obrigada pela presença e amizade.

À Joana Azenha pela amizade e pelo incentivo ao longo deste e tantos outros percursos.

Aos meus pais e à minha irmã pelo amor incondicional, apoio, incentivo contante e por me tornarem na pessoa que sou hoje. Ao meu sobrinho Bernardo pelo amor e alegria que transmite.

Ao João pelo carinho, compreensão e motivação constante para que alcance os meus objetivos.

À minha família que sempre acompanhou o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos pela motivação, amizade e compreensão.

A todos, obrigada!

RESUMO

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos que ocorrem naturalmente em diferentes produtos agrícolas. A contaminação de alimentos por estes fungos ocorre em condições ambientais favoráveis, durante o crescimento das culturas, durante a colheita e transporte, assim como, e mais frequentemente, aquando do armazenamento.

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos filamentosos pertencentes aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Esta micotoxina apresenta propriedades carcinogénicas, nefrotóxicas, hepatotóxicas, teratogénicas, imunotóxicas e neurotóxicas para várias espécies animais. Foi classificada pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC) como pertencente ao grupo 2B, possivelmente carcinogénica para o Homem. É, de entre todas as ocratoxinas, a mais tóxica e a mais relevante no que respeita à saúde humana. A OTA ocorre em diversos alimentos, sendo mais prevalente em cereais e seus derivados.

Sendo o arroz um cereal essencial na dieta portuguesa e mundial, é importante o seu controlo no que diz respeito à presença de contaminantes, nomeadamente a OTA, a fim de proteger a saúde pública.

Os objetivos do presente estudo foram a determinação da ocorrência de OTA em arroz e avaliação da exposição da população portuguesa, decorrente do seu consumo. Foram analisadas 42 amostras de arroz, de diferentes variedades, através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) em formato competitivo. Das 42 amostras, 20 foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Coimbra e 22 foram cedidas por produtores portugueses. No que diz respeito às amostras adquiridas na superfície comercial, 7 foram produzidas na Europa, 4 na América e 9 na Ásia. Das amostras cedidas por produtores, 12 eram oriundas da região do Mondego, 8 do Tejo e 2 do Sado.

Os resultados mostraram que nenhuma amostra apresentava contaminação por OTA. Este resultado, demonstra que as medidas, que visam a manutenção dos valores de OTA em níveis aceitáveis, tomadas pela União Europeia (UE) e os Planos Nacionais e Programas Oficiais de Controlo executados pelas autoridades de segurança alimentar, estão a corresponder com os objetivos estabelecidos.

Palavras-chave: Micotoxinas, ocratoxina A, arroz, ocorrência, ELISA.

ABSTRACT

Mycotoxins are necessary metabolites for fungi that naturally occur in different agricultural products. Contamination of food by these fungi occurs under favorable environmental conditions during the growth of crops, harvest, as well as during transport and more often in storage.

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin specifically produced by some species of filamentous fungi belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. This mycotoxin has carcinogenic, nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic, immunotoxic and neurotoxic properties for various animal species. It was classified by International Agency for Research on Cancer (IARC) as belonging to group 2B, possibly carcinogenic to humans. It is, of all ochratoxins, the most toxic and the most relevant regarding human health. OTA occurs in various foods being more prevalent in cereals and derivatives.

As rice is an essential cereal in the Portuguese and world diet, its control on what concerns the presence of contaminants, namely OTA, is very important in order to protect public health.

The objectives of the present study were to determine the occurrence of OTA in rice and to assess the exposure of the Portuguese population, resulting from its consumption. Forty-two rice samples, of different varieties, were analyzed using the Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in a competitive format. Of the 42 samples, 20 were commercially acquired in the city of Coimbra and 22 were obtained from Portuguese producers. From those acquired in commercial surfaces, 7 were originated from Europe, 4 in America and 9 in Asia. From those obtained from producers, 12 were from the Mondego region, 8 from the Tejo and 2 from Sado.

The results indicated that no sample had contamination by OTA. This result demonstrates that the measures, which aim to maintain the OTA values at acceptable levels, by the European Union (EU) and the National Plans and Official Control Programs of the food safety authorities, are efficient, corresponding with the defined objectives.

Keywords: Mycotoxins, ochratoxin A, occurrence, ELISA.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da ocratoxina A, B e C (Adaptado de Schrenk <i>et al.</i> , 2020).....	5
Figura 2: Vias metabólicas da OTA em animais e humanos (EFSA, 2020).....	7
Figura 3: Distribuição energética do arroz comum cru (Fonte: INSA)	16
Figura 4: Distribuição energética do arroz integral cru (Fonte: INSA).....	16
Figura 5: Grãos de arroz (Fonte: Arroz Carolino- lezírias Ribatejana).....	19
Figura 6: Disponibilidades diárias per capita de cereais (BAP, 2016)	21
Figura 7: Curva padrão obtida no controlo de qualidade do teste (A) e no ensaio realizado (B)	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais fungos produtores de micotoxinas (Adaptado de Haschek e Voss, 2013).....	2
Tabela 2: Teores máximos de OTA nos géneros alimentícios, de acordo com o Regulamento (UE) N° 105/2010 da Comissão Europeia, 2010.	12
Tabela 3: Dados de estudos prévios de determinação de OTA em arroz.	22
Tabela 4: Microrganismos capazes de degradar OTA (Adaptado de Pereira, 2008).	26
Tabela 5: Métodos analíticos utilizados na determinação de OTA em arroz	31
Tabela 6: Caracterização das amostras incluídas no estudo.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrilo

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AFs - Aflatoxinas

ARN - Ácido ribonucleico

ASE - *Accelerated solvent extraction* (Extração Acelerada por solvente)

ATP - Adenosina Tri-Fosfato

a_w - *Water activity* (Atividade da água)

BEN - *Balkan endemic nephropathy* (Nefropatia endêmica dos Balcãs)

CE - Comissão Europeia

CIN - *Chronic interstitial nephritis* (Nefropatia intersticial crónica)

CV - Coeficiente de variação

DL50 - Dose letal 50

DON - Desoxinivalenol

EFSA - *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

ESI - *Electrospray ionization* (Ionização por eletrospray)

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)

FD - *Fluorescent Detection* (Deteção por fluorescência)

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IAC - *Immunoaffinity Column* (Coluna de imunoafinidade)

IARC - *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para a Investigação do Cancro)

IRRI - *International Rice Research Institute* (Instituto Internacional de Investigação de Arroz)

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

JECFA - *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (Comitê de especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS)

LC - *Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida)

LC- MS/MS - *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem)

LM - Limite máximo

LOD - *Limit of detection* (Limite de detecção)

LOQ - *Limit of quantification* (Limite de quantificação)

ml - Mililitros

ng - Nanograma

OGM - Organismo Geneticamente Modificado

OMS - Organização Mundial da Saúde

OTA - Ocratoxina A

OTB - Ocratoxina B

OTC - Ocratoxina C

PAT - Patulina

p.c. - Peso corporal

PTWI - *Provisional Tolerable Weekly Intake* (Ingestão semanal tolerável provisória)

RASFF - *Rapid Alert System for Food and Feed* (Sistema de alerta rápido para alimentos e rações)

TDI - *Tolerable daily intake* (Ingestão diária tolerável)

TWI - *Tolerable weekly intake* (Ingestão semanal tolerável)

UE - União Europeia

UV - Ultravioleta

µg - Micrograma

ZEN - Zearalenona

λ em. - Comprimento de onda de emissão

λ exc. - Comprimento de onda de excitação

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE.....	x
PARTE A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1. Micotoxinas.....	2
2. Ocratoxina A	4
2.1. Características físico-químicas	5
2.2. Toxicinética.....	6
2.2.1. Absorção e Distribuição	6
2.2.2. Metabolismo.....	7
2.2.3. Excreção.....	8
2.3. Efeitos fisiológicos e toxicidade	8
2.4. Vias de exposição	10
2.5. Limites e legislação.....	10
3. Arroz.....	14
3.1. História do arroz.....	15
3.2. Composição nutricional	16
3.3. Designações legais e comerciais	17
3.4. Arroz em Portugal.....	19
3.5. OTA no arroz	20
3.5.1. Ocorrência de OTA no arroz.....	24
3.5.2. Descontaminação.....	24
3.5.3. Métodos analíticos.....	26
PARTE B- EXPERIMENTAL.....	37
1. Objetivo.....	38
2. Materiais e métodos.....	38
2.1. Amostragem.....	38
2.2. Reagentes e soluções.....	41
2.3. Equipamentos	41

2.4. Procedimento experimental	42
3. Resultados e discussão	43
CONCLUSÕES.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47

PARTE A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. Micotoxinas

A palavra micotoxina tem origem nas palavras gregas "mykes" e "toxicum", que significam "fungo" e "toxina", respetivamente. As micotoxinas são assim metabolitos secundários tóxicos produzidos por diferentes tipos de fungos, que comprometem consideravelmente a segurança dos alimentos para consumo humano e de rações e, por isso, representam um problema para a saúde humana e animal (Haschek e Voss, 2013).

Apresentam baixo peso molecular (<700 Dalton (Da)) e a sua produção ocorre em condições ambientais favoráveis, nomeadamente no que diz respeito ao teor de humidade, atividade da água (a_w) e composição da matriz alimentar (Pleadin, Frece e Markov, 2019).

Atualmente, encontram-se identificadas mais de 300 micotoxinas sendo que, nem todas representam um risco para a saúde humana. De entre o elevado número de fungos que se conhecem, os géneros mais predominantes e os principais produtores de micotoxinas são o *Aspergillus spp.*, o *Fusarium spp.* e o *Penicillium spp.* (Escrivá, Font e Manyes, 2017).

Na Tabela I encontram-se apresentados os principais fungos produtores de micotoxinas, assim como as principais micotoxinas por eles produzidas.

Tabela I: Principais fungos produtores de micotoxinas (Adaptado de Haschek e Voss, 2013).

Espécies de fungos produtores	Micotoxinas
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2
<i>A flavous</i>	Aflatoxinas B1, B2
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T2 e HT2
<i>F. graminearum</i>	Deoxinivalenol, Zearalenona
<i>F. verticillioides, F. proliferatum</i>	Fumonisinias
<i>P. verrucosum, A. Ochraceus</i>	Ocratoxina A

As principais micotoxinas, regulamentadas pela União Europeia (UE), por apresentarem riscos sérios para a saúde humana, são as aflatoxinas (AFs) B1, B2, G1 e G2, a ocratoxina A (OTA), a patulina (PAT), o desoxinivalenol (DON), a zearalenona (ZEN), as fumonisinias, e as toxinas T2 e HT2 (Duarte, Lino e Pena, 2014).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estimou que cerca de um quarto das culturas de alimentos a nível mundial se encontrem contaminadas com micotoxinas, o que representa um perigo inevitável para a agricultura, visto que, atualmente,

não é possível evitar ou prever com eficácia a ocorrência de micotoxinas. Além da problemática ao nível da segurança alimentar, as micotoxinas apresentam consequências a nível socioeconómico, sendo responsáveis por perdas económicas, nomeadamente na produção de cereais, no seu processamento, na redução do valor nutricional dos alimentos e ainda nas perdas por patologias e/ou mortes de animais alimentados com rações contaminadas (FAO, 2002).

A exposição humana é negligenciada sobretudo em países em desenvolvimento, devido ao desconhecimento sobre esta problemática, ausência de regulamentação e à inclusão de alimentos contaminados na cadeia alimentar em períodos de escassez de alimentos devido a secas, guerras, crises políticas e económicas (Wagacha e Muthomi, 2008). Já nos países desenvolvidos, os estudos dedicados às micotoxinas são cada vez mais abundantes, sendo que, atualmente, é possível acompanhar semanalmente a notificação de ocorrências das micotoxinas a nível europeu através do Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF). As micotoxinas são consistentemente a categoria de perigo com o maior número de notificações (*The Rapid Alert System for Food and Feed - 2018 Annual Report*, 2019).

Tratando-se de contaminantes naturais, não é possível eliminar por completo a sua presença dos alimentos, o que torna imperativo o acompanhamento constante dos produtos destinados ao consumo humano ou animal, devendo a sua presença ser reduzida a níveis que não apresentem risco para os consumidores (Duarte, Lino e Pena, 2014).

A exposição crónica a baixas doses destas toxinas tem sido alvo de investigação dado o potencial carcinogénico destes compostos. Neste sentido, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou algumas micotoxinas quanto à evidência científica que suporta o seu potencial carcinogénico em humanos (Martins *et al.*, 2019).

2. Ocratoxina A

Do grupo das ocratoxinas fazem parte, pelo menos, sete metabolitos secundários estruturalmente relacionados, tendo sido já relatada a ocorrência natural da ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB) e ocratoxina C (OTC) em produtos de origem vegetal e animal. A OTA destaca-se pela sua maior toxicidade e ocorrência natural em determinados produtos (Haschek e Voss, 2013).

A OTA foi isolada e caracterizada do ponto de vista químico em 1965, na África do Sul. Farinha de milho foi intencionalmente inoculada com *Aspergillus ochraceus* tendo sido descoberta a OTA como um metabolito tóxico deste fungo. A OTA é uma das micotoxinas mais importantes e deletérias e, de entre todas as ocratoxinas, a mais tóxica e mais relevante (Malir et al., 2016).

A OTA é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos filamentosos, pertencentes ao género *Aspergillus*, em climas mais quentes e tropicais, e *Penicillium*, em climas mais temperados. De entre o género *Aspergillus*, diversas espécies são produtoras de OTA, nomeadamente o *A. ochraceus*, o *A. carbonarius* e o *A. Westerdijkiae*. Dentro do género *Penicillium*, apenas as espécies *P. verrucosum* e *P. nordicum* têm capacidade para sintetizar OTA (Khoury, El e Atoui, 2010; Onorio et al., 2011; Pattono, Gallo e Civera, 2011).

Tanto os fungos pertencentes ao género *Aspergillus* como ao género *Penicillium*, são considerados fungos de armazenamento, no entanto, podem desenvolver-se durante as várias fases das culturas agrícolas mediante condições favoráveis de temperatura e humidade (Rita, 2005).

Existem vários fatores que determinam a concentração de OTA ao longo da cadeia de produção e processamento. Durante a produção agrícola, são determinantes os fatores abióticos, a população de fungos existentes, a qualidade das condições da colheita e transporte, a interação com a microflora, o substrato, o tipo de prática agrícola e controlo de pragas e por último as condições climáticas. No armazenamento, são determinantes os fatores abióticos, como a temperatura e a humidade, a população de fungos presentes, a secagem insuficiente ou tardia, a duração e as condições de armazenamento e por fim a interação/ competição com a microflora. Na última etapa, o processamento, são determinantes fatores como a extensão e as condições em que o mesmo é feito (pH e temperatura), utilização de enzimas e leveduras, adição de alimentos contaminados, a higienização, moagem e mistura, confeção, e extrusão (Duarte, Lino e Pena, 2014).

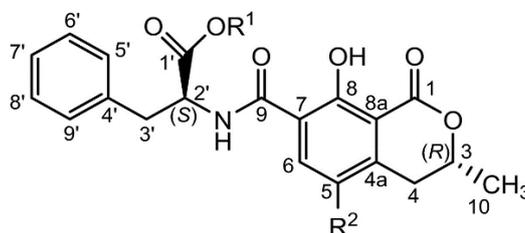
As condições climáticas em Portugal, são favoráveis para o desenvolvimento de fungos e por isso a uma maior produção de OTA, no entanto os estudos são ainda escassos no que diz respeito à exposição da população portuguesa a esta micotoxina (Duarte, Pena e Lino, 2010).

2.1. Características físico-químicas

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a fórmula química da OTA é $C_{20}H_{18}ClNO_6$, designando-se L-fenilalanina-N- [(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirran-7-il) carbonil] - (R)isocoumarina. O seu peso molecular é 403,8 g/mol (Anli e Alkis, 2010).

A OTA consiste na ligação de uma dihidroisocoumarina a uma L-β-fenilalanina através de uma ligação amina (Anli e Alkis, 2010). Tal como se observa na Figura 1, a OTA possui um átomo de cloro na porção da isocoumarina enquanto que na OTB este átomo de cloro está substituído por hidrogénio. Esta ligação poderá justificar as diferenças dos potenciais tóxicos assim como os modos de ação das ocratoxinas (Schrenk *et al.*, 2020).

Devido à sua porção isocoumarínica, a OTA exhibe uma forte fluorescência nativa após a absorção da luz ultravioleta (UV), que depende fortemente do pH. Assim, a molécula apresenta elevada fluorescência na cor verde quando sujeita a condições ácidas e na cor azul quando sujeita a condições básicas. Deste modo, possui absorção máxima a um comprimento de onda de 333 nm quando o pH se encontra em valores inferiores a 4,5 e, para valores de pH superiores, o comprimento de onda máximo é 380 nm. Acima de pH 9 o comprimento de onda máximo é 465 nm (Schrenk *et al.*, 2020).



Ochratoxin	Substituents	Molecular formula	Molar mass (g · mol ⁻¹)	CAS number
OTA	R ¹ = H; R ² = Cl	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	403.8	303-47-9
OTB	R ¹ = H; R ² = H	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆	369.4	4825-86-9
OTC	R ¹ = C ₂ H ₅ ; R ² = Cl	C ₂₂ H ₂₂ ClNO ₆	431.9	4865-85-4

Figura 1: Estrutura química da ocratoxina A, B e C (Adaptado de Schrenk *et al.*, 2020).

É um composto sólido, inodoro com estrutura cristalina que pode variar de incolor a branco. Tem um ponto de fusão de cerca de 90°C quando cristalizado a partir do benzeno e um ponto de fusão de cerca de 169°C quando cristalizado a partir do xileno (Khoury, El e Atoui, 2010).

Esta micotoxina é moderadamente solúvel em solventes orgânicos polares e pouco solúvel em água (cerca de 0,42 mg/L a 25°C) (Tao *et al.*, 2018).

A OTA é estável a moderado aquecimento, no entanto, são observadas perdas que variam até 90% a temperaturas superiores a 180°C. Apresenta ainda elevada estabilidade à acidez (Khoury, El e Atoui, 2010; Schrenk *et al.*, 2020).

2.2. Toxicinética

2.2.1. Absorção e distribuição

Após ingestão oral, a OTA é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal, sobretudo no intestino delgado, mais especificamente no jejuno, e posteriormente distribui-se no organismo pelo sangue (Daniela *et al.*, 2009).

De acordo com alguns estudos, é possível estimar a percentagem média de absorção em várias espécies sendo no porco de 66%, em ratos e coelhos é de 56% e no frango é de 40% (Kőszegi e Poór, 2016; Schrenk *et al.*, 2020).

A afinidade e extensão da ligação da OTA às proteínas plasmáticas influencia o tempo de semivida nas diferentes espécies. No Homem, 99,98% da OTA absorvida liga-se às proteínas plasmáticas, nomeadamente à albumina. O tempo de semivida pode atingir aproximadamente 840 horas no humano, 510 horas em macacos, entre 55 e 120 horas no rato, entre 72 e 120 horas no porco e 4,1 horas para galinhas (Daniela *et al.*, 2009).

Após se encontrar na corrente sanguínea, é distribuída pelos rins, encontrando-se em menores concentrações no fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e cérebro. Esta concentração é influenciada por vários fatores nomeadamente, a espécie animal, a dose administrada, a via de administração, o estado higieno-sanitário do animal e a composição da dieta (Daniela *et al.*, 2009; Schrenk *et al.*, 2020).

A acumulação de OTA no organismo é favorecida pela sua reabsorção intestinal, recirculação entero- hepática e pela sua reabsorção a nível do nefrónio (JECFA, 2007).

Atendendo às diferenças no grau de ligação às proteínas séricas, às variações nos mecanismos de transporte, à captação e depuração renal e à taxa de conjugação e extensão da recirculação entero-hepática, a sensibilidade à OTA pode variar intra e inter-espécies (Kószegi e Poór, 2016; Schrenk *et al.*, 2020).

Foi detetada OTA no soro fetal o que indica a existência de transferência placentária ativa. Um estudo realizado na população suíça e polaca, demonstrou concentrações de OTA na placenta e no soro fetal duas vezes superiores às detetadas no soro materno (Ringot *et al.*, 2006; Schrenk *et al.*, 2020).

2.2.2. Metabolismo

A principal via metabólica da OTA consiste na hidrólise da ligação entre a fenilalanina e o ácido dihidroisocumarínico, sendo formada a OT α , o principal metabolito da OTA. Nesta via estão envolvidas várias enzimas, nomeadamente a carboxipeptidase A. A OT α é em parte absorvida pelo intestino, no entanto não se acumula nos rins, sendo excretada pela urina. Outra das vias metabólicas da OTA consiste na oxidação pelo citocromo P450 resultando dois metabolitos: 4-hidroxi OTA e 10-hidroxi OTA (Schrenk *et al.*, 2020).

Nos ruminantes observa-se uma redução na exposição à OTA uma vez que esta é rapidamente hidrolisada a OT α pela população microbiana do rúmen destes animais. A sua capacidade de inativarem a OTA com segurança chega a 12000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alimento, uma concentração que é substancialmente maior do que a normalmente relatada em alimentos naturalmente contaminados (Boudra *et al.*, 2013).

Na Figura 2, estão representadas as vias metabólicas da OTA estabelecidas em animais e no Homem.

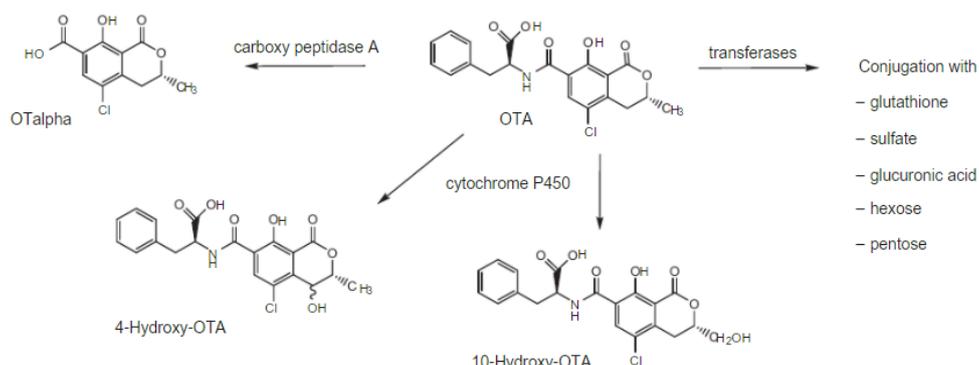


Figura 2: Vias metabólicas da OTA em animais e humanos (EFSA, 2020).

2.2.3. Excreção

Dada a elevada afinidade da OTA com as proteínas plasmáticas, sobretudo com a albumina, esta é excretada com dificuldade através da urina. A afinidade para a albumina foi confirmada no seguimento de um estudo em que se verificou que ratos com deficiência em albumina foram capazes de eliminar mais rapidamente a OTA em comparação com ratos normais. A via urinária parece ser a predominante nos humanos e primatas não humanos. O rim é o principal órgão-alvo da toxicidade da OTA pelo que, a excreção renal apresenta grande relevância. Outra das vias de excreção é a biliar sendo esta a via mais comum nos animais com tempos de semivida mais baixos, como é o caso dos ratos (Pereira, 2008; Schrenk *et al.*, 2020).

Há ainda estudos que demonstram, que a excreção pelo leite dos mamíferos parece ser relativamente eficaz em ratos, coelhos e humanos, no entanto, esta via tem efeitos perigosos para os bebés (Ringot *et al.*, 2006).

Ambas as vias de excreção são lentas, devido à elevada ligação da OTA às proteínas plasmáticas e à baixa taxa de metabolismo. Desta forma, a OTA é considerado um composto tóxico de fácil absorção mas de eliminação lenta (EFSA, 2020; Pereira, 2008; Schrenk *et al.*, 2020).

Devido à eliminação e excreção lentas e à baixa taxa de metabolismo, a OTA tem potencial para se bioacumular no organismo (Schrenk *et al.*, 2020).

2.3. Efeitos fisiológicos e toxicidade

A OTA é considerada a ocratoxina mais tóxica. No entanto, alguns autores defendem que a OTC é igualmente tóxica dado que, após a sua ingestão, é convertida em OTA (Pereira, 2008).

Os efeitos e doenças que a OTA provoca, variam de acordo com os teores da micotoxina a que um indivíduo está exposto, a duração da exposição, o estado de saúde do indivíduo, a idade, o sexo, a dieta/hábitos alimentares, os fatores ambientais e ainda de acordo com as interações com outras micotoxinas (aditivas, sinérgicas ou antagonistas) devido à sua co-ocorrência num mesmo alimento. Assim, a exposição pode resultar em toxicidade aguda, isto é, exposição a elevadas concentrações de OTA num curto espaço de tempo, que pode levar à morte do indivíduo. Caso a exposição seja continuada mas a níveis de concentração reduzidos, pode resultar em toxicidade crónica (Duarte *et al.*, 2012; Escrivá, Font e Manyes, 2017).

Estudos de toxicidade aguda realizados em animais têm relatado valores de DL50 diferentes mediante a espécie. Os valores de DL50 em ratos recém-nascidos, cães, porcos e galinhas

foram de 3,9, 0,2, 1 e 3,3 mg/kg p.c., respetivamente (O' Brien e Dietrich, 2005; Schrenk et al., 2020).

Os principais efeitos tóxicos da OTA advêm do facto de esta ser considerada uma micotoxina inibidora da síntese proteica, sendo capaz de inibir a síntese de Ácido desoxirribonucleico (ADN) e Ácido ribonucleico (ARN). Estudos indicam ainda o aumento da peroxidação lipídica, alterações no metabolismo dos hidratos de carbono, do cálcio, assim como nas funções mitocondriais (Běláková et al., 2011; Daniela et al., 2009).

A elevada preocupação com a OTA relaciona-se, sobretudo, com os seus efeitos toxicológicos, especialmente a nível nefrotóxico. Estudos epidemiológicos referem a OTA como agente causal da Nefropatia Endémica dos Balcãs (BEN), uma doença fatal que está associada a tumores do trato urinário, no entanto esta associação ainda não está totalmente esclarecida. Nos países Escandinavos esta micotoxina foi também associada à síndrome de nefrotoxicidade em suínos e, nos países do norte de África, à nefropatia intersticial crónica (CIN) em humanos, no entanto o seu envolvimento ainda não está totalmente esclarecido. A OTA revelou-se nefrotóxica para todos os animais testados à exceção dos ruminantes adultos (Pena et al., 2005; Pereira, 2008; Schrenk et al., 2020).

Foram observadas alterações imunológicas com exposição a baixas concentrações de OTA. Esta micotoxina apresenta atividade imunossupressora em várias espécies, nomeadamente em ratos expostos a concentrações de OTA na ordem dos 5 ng por kg p.c.. *In vitro*, a OTA parece inibir a resposta e proliferação dos linfócitos B e T e afetar a ativação dos linfócitos T. Os processos de resposta imunológica estão relacionados com a defesa perante agentes microbianos e com a propagação de células tumorais o que faz com que seja um efeito com grande relevância (Duarte, Lino e Pena, 2010; Nogueira S, 2006).

Foram descritos ainda outros efeitos tóxicos como os carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, neurotóxicos e hepatotóxicos. Com base em diversos estudos com elevada evidência científica relativamente a carcinogenicidade da OTA, esta foi classificada no Grupo 2B, possivelmente carcinogénica para humanos, em 1993, pela IARC. Mais recentemente, têm surgido novos dados relativos à genotoxicidade da OTA sendo que, caso a ocorrência dos mecanismos associados se confirmem também em humanos, poderá ser feita uma reclassificação para o Grupo 2A, provavelmente carcinogénica para humanos, ou mesmo para o Grupo 1, carcinogénica para humanos (Malir et al., 2016; Pereira, 2008).

Num estudo com ratos machos, a OTA provou ser capaz de provocar hemorragias em quase todos os órgãos vitais, necroses no fígado e em tecidos linfáticos (Pereira, 2008; Schrenk et al., 2020).

2.4. Vias de exposição

A exposição humana às micotoxinas decorre, principalmente, do consumo direto ou indireto de alimentos contaminados ou da exposição respiratória através da inalação de poeiras contaminadas por fungos (Waseem et al., 2014).

Existem cada vez mais registos da exposição por inalação, relacionada com o desenvolvimento de micotoxicoses, no entanto, representa uma via de exposição muito menos significativa. Esta via de exposição terá significado apenas num contexto ocupacional como é o caso dos manipuladores de rações animais e trabalhadores do setor da agricultura (Duarte, Lino e Pena, 2010, 2014).

A principal via de exposição à OTA verifica-se pelo consumo de alimentos contaminados, através do trato gastrointestinal. Esta contribuição varia de acordo com os hábitos alimentares, a origem e o processamento do produto (Duarte, Lino e Pena, 2010, 2014).

A ingestão de OTA ocorre não só pelo consumo de alimentos de origem vegetal contaminados nomeadamente, cereais, café, cacau, frutos secos, mas também pela ingestão de produtos de origem animal como sejam leite, ovos, carne. Como anteriormente referido, a acumulação de OTA nos tecidos animais é propiciada pelo seu longo tempo de semivida, em particular em animais não ruminantes. Ao contrário dos animais monogástricos, os ruminantes são mais tolerantes à exposição à OTA, uma vez que as suas enzimas protozoárias ruminais degradam a OTA em OT α e outros metabolitos menos tóxicos. (Schrenk et al., 2020).

Bebés e crianças, são considerados grupos vulneráveis, quando comparados com adultos, no que diz respeito à ingestão de micotoxinas e efeitos toxicológicos que estas produzem. Esta vulnerabilidade deve-se a uma dieta rica em cereais, peso corporal inferior, taxa metabólica mais elevada e à capacidade reduzida de desintoxicação (Ryu et al., 2019).

2.5. Limites e legislação

O consumo de alimentos contaminados com OTA representa um problema de saúde pública tornando-se necessário manter os teores em níveis aceitáveis do ponto de vista toxicológico. A regulamentação é muito importante não apenas para a proteção do consumidor mas

também para contribuir para uma economia sustentável e para que haja uma prática justa no comércio de alimentos intra e inter-países (Duarte, Lino e Pena, 2010).

A legislação na área alimentar além de garantir a disponibilização de alimentos seguros para o consumidor, impede ainda a realização de práticas fraudulentas (Duarte, Lino e Pena, 2010).

A criação de regulamentos e o estabelecimento de limites legais depende de diversos fatores, nomeadamente: dados toxicológicos existentes, dados relativos à ocorrência de micotoxinas em diferentes matrizes, métodos analíticos e legislação existente. Os limites estabelecidos poderão ser de carácter obrigatório ou de recomendação, podendo variar entre países dado que os níveis de contaminação e os hábitos alimentares são muito diferentes. Países com elevada prevalência de micotoxinas pretendem limites mais altos para que consigam continuar a ser competitivos no comércio mundial, enquanto que países com baixa prevalência de micotoxinas pretendem limites baixos para garantir a continuidade de produtos de elevada qualidade (Duarte, Lino e Pena, 2010).

O Regulamento (CEE) n° 315/93 definiu que os alimentos que contêm um contaminante em quantidade inaceitável para a saúde pública não devem ser colocados no mercado, que os níveis de contaminantes devem ser mantidos tão baixos quanto razoavelmente possível e que, se necessário, a Comissão Europeia (CE) pode estabelecer níveis máximos para contaminantes específicos (*Regulamento (CEE) N° 315/93 do Conselho, 1993*).

A Legislação da UE protege os consumidores através do estabelecimento de níveis máximos de micotoxinas em alimentos e rações assim como colaborando nas boas práticas recomendadas de agricultura, armazenamento e processamento. Assim, a UE com o intuito de proteger a saúde pública e de harmonizar os diferentes limites legais estabelecidos pelos seus países membros, estabeleceu teores oficiais máximos de alguns contaminantes através do Regulamento (CE) n° 1881/2006, baseados no parecer científico atualizado da EFSA (2006) e nas informações sobre incidência de alimentos recolhidos no último relatório (*Regulamento (CE) n° 1881/2006, 2006*). Em 2010 os limites máximos foram alterados pelo Regulamento (CE) n° 105/2010, propositadamente para especiarias e alçaçuz (*Regulamento (UE) N° 105/2010 da Comissão Europeia, 2010*).

Na Tabela 2 estão apresentados os teores máximos de OTA nos diversos géneros alimentícios.

Tabela 2: Teores máximos de OTA nos géneros alimentícios, de acordo com o Regulamento (UE) N° 105/2010 da Comissão Europeia, 2010.

Géneros Alimentícios	Teores máximos (µg/kg)
Cereais não transformados.	5,0
Todos os produtos derivados de cereais não transformados, incluindo produtos à base de cereais transformados e cereais destinados ao consumo humano directo, com excepção dos géneros alimentícios referidos nos pontos 2.2.9 e 2.2.10.	3,0
Passas de uvas (uvas de Corinto, uvas e sultanas).	10,0
Café torrado, moído ou em grão, com excepção do café solúvel.	5,0
Café solúvel (café instantâneo).	10,0
Vinho (incluindo vinho espumante e excluindo vinho licoroso e vinho com teor alcoométrico não inferior a 15 % vol.) e vinho de frutos (11).	2,0 (12)
Vinho aromatizado, bebidas aromatizadas à base de vinho e cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas (13).	2,0 (12)
Sumo de uva, concentrado de uva reconstituído, néctar de uva, mosto de uva e concentrado de mosto reconstituído, destinados ao consumo humano directo (14).	2,0 (12)
Alimentos à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens (3) (7).	0,50
Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos (9) (10) especificamente destinados a lactentes.	0,50
Especiarias <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentos, pimento em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce) <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gingibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma) Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas.	30 µg/kg de 1.7.2010 a 30.6.2012 15 µg/kg a partir de 1.7.2012.
Alçaçuz (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> e outras espécies). Raiz de alçaçuz, ingrediente para infusão de ervas aromáticas Extracto de alçaçuz (42), para utilização em alimentos, sobretudo em bebidas e produtos de confeitaria.	20 µg/kg 80 µg/kg»

«(42) O teor máximo aplica-se ao extracto puro e não diluído, produzido de forma a que 1 kg de extracto seja obtido a partir de 3 a 4 kg de raiz de alçaçuz.»

O valor mais baixo definido verifica-se para alimentos para bebés e crianças sendo justificado pela potencial nocividade da exposição à OTA deste grupo populacional (Duarte, Lino e Pena, 2010).

A maioria dos estados membros da UE apenas seguem os regulamentos da UE no entanto, em alguns casos, os próprios países estabelecem limites mais rígidos ou para matrizes não especificadas (Duarte, Lino e Pena, 2010).

O cumprimento desta legislação obriga os agentes económicos a controlar a presença de certas micotoxinas em alguns alimentos e impede a comercialização dos produtos contaminados com valores acima dos regulamentados. Assim, os produtos alimentares exportados sofrem controlos prévios à exportação por forma a verificar se satisfazem os requisitos da UE.

Estão ainda fixados valores de Ingestão Tolerável para a OTA em que não há diferenciação entre grupos de risco (por exemplo para crianças versus adultos).

A *Health Canada*, definiu como adequado o valor de 3 ng/kg p.c. para a ingestão diária tolerável (TDI), o que corresponde a uma ingestão semanal tolerável (TWI) de 21 ng/kg p.c. (Schrenk et al., 2020).

The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), em 2008, reiterou o valor anteriormente apresentado, de 100 ng/kg p.c. para a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI). As estimativas de exposição dietética à OTA utilizando sobretudo dados de ocorrência europeus, variaram de 8 a 17 ng/kg p.c. / semana, valores bastante inferiores ao PTWI estabelecido (JECFA, 2008; Schrenk et al., 2020).

Em 2006, a EFSA definiu como adequado o valor de 120 ng/kg p.c. para a TWI, no entanto, na sua recente avaliação de risco a esta micotoxina, este valor já não é considerado válido (EFSA, 2006; Schrenk et al., 2020).

Relativamente a alimentos para consumo animal, ainda não foram estabelecidos limites máximos de OTA na UE. Na UE, uma das medidas de redução de contaminação de rações por micotoxinas baseia-se na utilização de aditivos alimentares. Esses aditivos estão incluídos no Regulamento (CE) n° 1831/2003. Estão incluídas neste regulamento, todas as substâncias capazes de suprimir ou reduzir a absorção de micotoxinas, promover a excreção das micotoxinas ou alterar o seu modo de ação, sempre com o objetivo de garantir a proteção da saúde animal e pública (*Regulamento (CE) N° 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003*, 2003).

3. Arroz

Segundo o Instituto Internacional de Investigação de Arroz (IRRI), este cereal é o alimento base da dieta de metade da população mundial, sendo que, aproximadamente 90% do consumo e produção, ocorre no continente asiático. Atendendo à sua versatilidade, é um alimento com grande potencial para combater a fome no mundo (GRiSP, 2013).

O arroz é a terceira maior cultura cerealífera do mundo, apenas ultrapassada pelas de milho e trigo, possuindo uma elevada importância do ponto de vista social, económico e cultural para muitas pessoas, em muitos países. O arroz é consumido quase exclusivamente por humanos (IRRI, 2017; Khush, 1997). Na Europa o consumo de arroz é superior ao produzido, o que faz deste continente o terceiro importador mundial (IRRI, 2017; Khush, 1997).

A planta do arroz completa o seu ciclo vegetativo entre três e seis meses, sendo que o local da plantação deverá ter um solo ligeiramente argiloso e ácido, fonte de água limpa, luz solar em abundância e temperaturas a rondar os 21°C (Yoshida, 1981). O arroz é uma planta subaquática da família *Gramineae*, do género *Oryza*, que compreende 23 espécies. Destas, apenas *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* Steud. são cultiváveis (Khush, 1997).

Existem mais de 40.000 variedades diferentes de *Oryza sativa*, podendo esta espécie ser dividida em três subespécies principais: índica, japónica e javanica (IRRI, 2007).

Japónica é um grupo de variedades de arroz do norte e leste da China que pode ser encontrado nas zonas mais frias das regiões subtropicais e nas zonas temperadas. É uma planta relativamente curta, com folhas estreitas, verde-escuras e perfilhos de altura média. Os grãos da japónica são curtos e redondos, não se partem facilmente e têm entre 0 e 20% de teor de amilose (IRRI, 2007).

Javanica é cultivada apenas em terraços de arroz de alta altitude nas montanhas na Indonésia. As plantas são altas, com folhas largas, rígidas e verdes claras. Os grãos são longos, largos e grossos, não se quebram facilmente e têm entre 0 e 25% de teor de amilose (IRRI, 2007).

Índica é o principal tipo de arroz cultivado nos trópicos e subtropicais, incluindo Filipinas, Índia, Paquistão, Java, Sri Lanka, Indonésia, centro e sul da China e em alguns países africanos. As plantas deste tipo de arroz são altas, com folhas verdes claras, largas a estreitas. Os grãos são longos a curtos, delgados, um pouco achatados, tendem a quebrar-se mais facilmente e têm alto teor de amilose, entre 23 e 31% (IRRI, 2007).

Em Portugal, cerca de 80% do arroz cultivado, pertence à subespécie japónica (tipo carolino), e os restantes 20% à subespécie índica (tipo agulha) (GPP, 2016).

O arroz africano ou *Oryza glaberrima* apresenta desvantagens em relação ao arroz asiático, nomeadamente, grãos quebradiços e a baixa qualidade de moagem. Ainda assim, o arroz africano apresenta maior tolerância a variações na profundidade da água, toxicidade do ferro, solos inférteis, condições climatéricas severas e negligência humana. Também apresenta maior resistência a várias pragas e doenças, como nematoides, mosquitos, vírus e às plantas parasitas do género *Striga* (Khush, 1997).

3.1. História do arroz

Ainda que não existam datas nem locais precisos relativamente à origem do arroz, as evidências arqueológicas demonstram que os rios *Yangtze* médio e *Huai* superior, localizados na China, foram os primeiros locais de cultivo de *Oryza sativa*, há pelo menos 8000 anos (Ricepedia, 2020).

A planta espalhou-se pela China, Coreia, Filipinas, Japão e Indonésia e mais tarde, os árabes levaram-na para o Egito, Marrocos e Espanha, a partir de onde chegou a todos os cantos da Europa. Atualmente, é cultivada em todos os continentes, exceto na Antártida. Os portugueses e holandeses levaram o arroz para as suas colónias em África e de lá foi para a América. O arroz é considerado um presente do Velho Mundo para o Novo Mundo (novarroz, 2020; Ricepedia, 2020; Vaughan, Lu e Tomooka, 2008).

Em Portugal, foi no reinado de D. Dinis (1279 a 1325) que surgiram, as primeiras referências sobre cultura de arroz, que na época se destinavam apenas à Nobreza. No final do século XIX, as culturas de arroz, eram limitadas às terras dos vales de alguns dos principais rios. Com a preparação de terrenos e gestão da água, houve mais tarde uma expansão da Cultura, e no início dos anos 20, o arroz passou a ter um papel muito importante na alimentação dos portugueses (novarroz, 2020).

O arroz africano, surgiu no delta interior do rio Níger Superior, onde hoje é o Mali. Atualmente é cultivado na África Ocidental (Khush, 1997; Ricepedia, 2020).

3.2. Composição nutricional

O arroz é na sua maioria constituído por amido, sendo este hidrato de carbono (HC) a grande fonte de energia. Ainda que em quantidades menores, o arroz contém também proteínas, lípidos, fibras, vitaminas e minerais (Walter, Marchezan e Avila, 2008). A Figura 3 apresenta a distribuição energética do arroz comum cru.

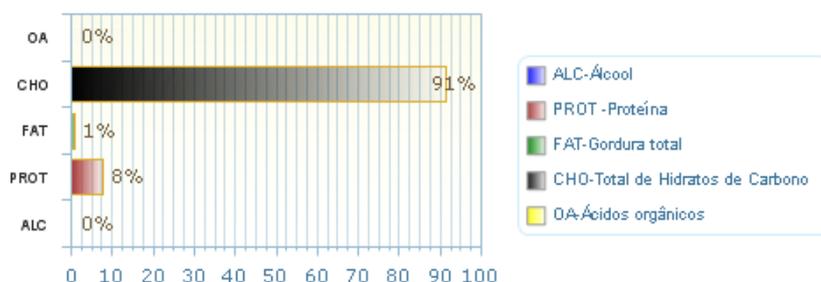


Figura 3: Distribuição energética do arroz comum cru (Fonte: INSA).

A composição nutricional do grão é influenciada por vários fatores tais como: condições ambientais, processamento a que é submetido, armazenamento e variedade do arroz. No processo de branqueamento do grão há perda de lípidos, proteína, fibra e vitaminas como tiamina (B1) e α -tocoferol o que faz com que a composição nutricional do arroz branqueado seja bastante diferente da composição nutricional do arroz integral (Walter, Marchezan e Avila, 2008).

Na Figura 4 é apresentada a distribuição energética do arroz integral cru.

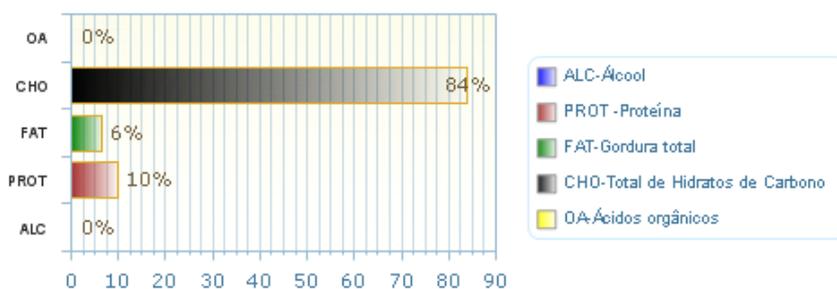


Figura 4: Distribuição energética do arroz integral cru (Fonte: INSA).

Assim, devido à importância do arroz na dieta de grande parte da população, a sua qualidade nutricional afeta diretamente a saúde humana (Walter, Marchezan e Avila, 2008).

Grãos com menor índice glicêmico poderão ser indicados para prevenir e/ou controlar a diabetes *mellitus*, assim como grãos com elevado teor em determinados minerais poderão ser indicados para indivíduos com défices nutricionais (Mahan, Stump e Raymond, 2012).

A variedade de arroz mais consumido é o branqueado que apresenta uma redução significativa dos níveis de micronutrientes, nomeadamente vitaminas e sais minerais. Este é sem dúvida um problema nutricional e de saúde pública em países em desenvolvimento, sobretudo para aqueles cuja alimentação está muito baseada no arroz (>400 g/per capita/dia). Para melhorar a qualidade nutricional do arroz, surgiram programas de melhoramento, com o objetivo de o biofortificar com 4 micronutrientes: vitamina A, iodo, zinco e ferro. Como o arroz não tem naturalmente vitamina A, a IRRI e os seus parceiros, desenvolveram um programa de melhoramento destinado a produzir variedades geneticamente modificadas. Através deste programa, a via biossintética dos carotenos foi transferida do milho para o arroz, obtendo-se assim o *Golden Rice* um organismo geneticamente modificado (OGM), com 20 µg/g de betacaroteno. O *Golden Rice* foi obtido em 2011, porém, ainda não foi comercializado devido a normas de biossegurança, devido ao nível de aceitação dos consumidores e também à sua disponibilidade para pagar um preço extra por um OGM. Assim sendo, o mecanismo de biofortificação mais indicado é o do melhoramento convencional e, por essa via, já se obtiveram variedades com elevados teores em ferro e zinco. O folato é outro micronutriente alvo para incrementar, sobretudo na China, onde já se obteve arroz OGM com 17 µg/g face aos valores normais de 0,08 µg/g (Brites e Lourenço, 2014; IRRI, 2019).

3.3. Designações legais e comerciais

Em Portugal, o arroz da espécie *Oryza sativa* L. é comercializado de acordo com o definido no Decreto-Lei nº157/2017, onde estão definidas as suas características, fixados os tipos e classes comerciais e estabelecidas as normas de comercialização, acondicionamento e rotulagem. O arroz selvagem não é abrangido por este decreto-lei dado que é um cereal aquático da espécie *Zizania aquatica* L. e não da espécie *Oryza sativa* L. (Decreto-Lei nº 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, 2017).

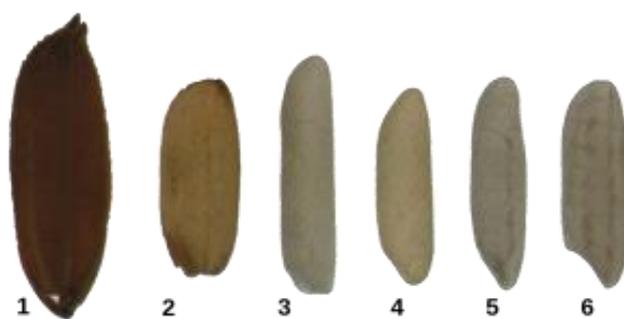
O arroz pode ser classificado quanto ao seu estado físico, dimensão dos grãos e tratamento a que são sujeitos. Quanto ao estado físico, divide-se nas seguintes categorias: arroz em casca, arroz descascado, arroz semi-branqueado e arroz branqueado. Relativamente à dimensão dos grãos, é possível distinguir-se arroz de grãos redondos (comprimento ≤5,2 mm), grãos médios (comprimento entre 5,2 mm e 6 mm) e grãos longos (comprimento >6 mm). No que diz respeito ao tratamento, o arroz pode apresentar-se como vaporizado (arroz que após imersão em água, vaporização e secagem é submetido a laboração industrial, para ser preparado para consumo, e cujo amido se encontra totalmente gelatinizado), pré cozido (sofre um tratamento físico de forma a reduzir o tempo e cozedura), arroz glaciado (arroz branqueado envolvido

numa película de glucose e talco que conferem uma melhor aparência), arroz matizado (envolvido por uma camada de óleo comestível) e arroz tufado (arroz submetido a alta pressão e calor) (*Decreto-Lei nº 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, 2017*).

No mercado existem designações comerciais mais reconhecidas pelos consumidores tais como: arroz agulha, arroz carolino, arroz médio, arroz redondo, risotto, arroz basmati, arroz jasmim, arroz glutinoso, arroz integral, arroz vaporizado e arroz selvagem.

O arroz agulha é caracterizado por grãos compridos e estreitos, com tendência a reter pouca água, resultando num arroz cozido com textura mais firme e aspeto solto. O arroz carolino que apresenta grãos longos e arredondados, absorve facilmente a água e conseqüentemente os temperos, pelo que resulta num arroz cozido com textura cremosa e menos firme. O arroz médio, semelhante ao arroz carolino, tem aspeto cristalino e cor homogênea. O arroz redondo após cozinhado apresenta um aspeto macio e gomoso. O risotto é caracterizado por grãos médios que absorvem bem a água, formando uma massa cremosa; este tipo de arroz é muito utilizado na cozinha italiana. O arroz basmati é aromático, de grão longo e estreito, possui um grão de elevada qualidade, e geralmente é usado em pratos indianos. O arroz jasmim um arroz aromático, semelhante ao basmati, apresenta uma textura mais gomosa, sendo muito utilizado na cultura chinesa. O arroz glutinoso, uma variedade de arroz de grão curto, original da Ásia, apresenta-se pegajoso após a cozedura. O arroz integral não é submetido a qualquer processo de branqueamento. O arroz vaporizado é todo o tipo de arroz submetido a um tratamento hidrotérmico, o que leva a que o arroz adquira uma coloração ligeiramente dourada, passando os nutrientes do pericarpo para a cariopse. O arroz selvagem, que provém de uma semente de uma erva aquática selvagem da América do Norte, apresenta grãos longos, de cor preta a castanha, com leve sabor a avelã. Este arroz é rico em vitaminas do complexo B (novarroz, 2020).

Na Figura 5 estão representados alguns dos grãos de arroz descritos anteriormente.



1. em casca ou paddy; 2. em película ou integral; 3. branqueado ou Suriname;
4. vaporizado, estufado ou parboiled; 5. agulha; 6. carolino

Figura 5: Grãos de arroz (Fonte: Arroz Carolino- lezírias Ribatejana).

3.4. Arroz em Portugal

Atualmente, a nível nacional, as regiões orizícolas situam-se na bacia do Mondego (Figueira da Foz, Montemor-o-Velho e Soure), nas bacias da Beira Baixa, na bacia do Sado (Alcácer do Sal, Santiago do Cacém e Grândola), na bacia dos afluentes do Tejo (Vila Franca de Xira, Azambuja, Benavente, Coruche e Salvaterra de Magos) e nas represas do Sul. Dado que a temperatura, a água e a luz solar são parâmetros cruciais para o cultivo de arroz, as condições observadas em Portugal são favoráveis a este tipo de agricultura. As temperaturas mais frias que se observam nas regiões mais a norte impedem o desenvolvimento desta cultura. Em 2018, em Portugal, a produção fixou-se nas 161 mil toneladas, 10,6% inferior à de 2017 (Instituto Nacional de Estatística, 2019; novarroz, 2020).

A plantação de arroz em Portugal é feita nos meses de abril e maio e a colheita realiza-se entre setembro e outubro (GRiSP, 2013).

O arroz é o segundo cereal mais importante em termos das disponibilidades para consumo, representando, em média, 17,2% das quantidades totais de cereais disponíveis (Figura 6). Em 2016, as disponibilidades diárias *per capita* de arroz branqueado foram de 58,3 g/hab/dia, equivalente a 21,3 kg/hab/ano (INE, 2017).

Disponibilidades diárias per capita de cereais - 2016

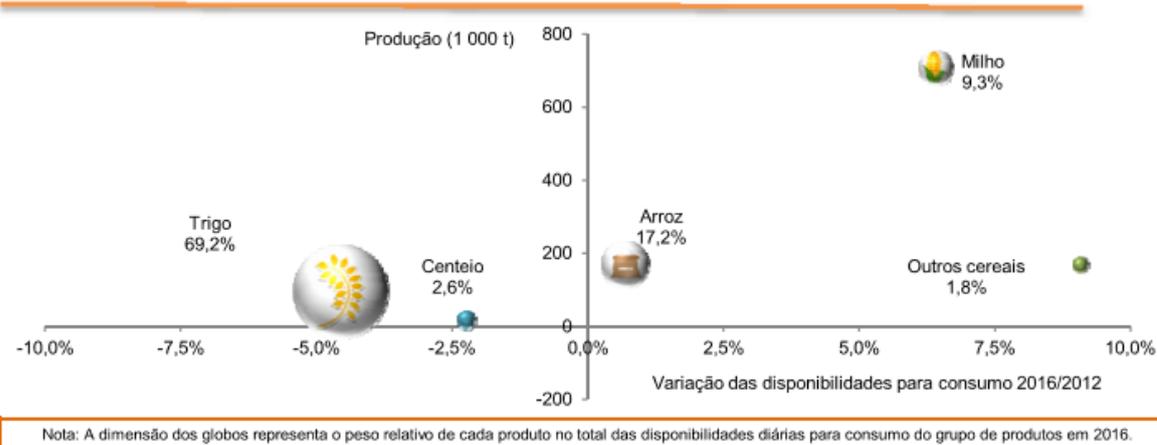


Figura 6: Disponibilidades diárias per capita de cereais (BAP, 2016).

O consumo em Portugal é de cerca de 16 kg por habitante, por ano, de arroz branqueado e semi-branqueado. Em Portugal, o tipo de arroz mais disseminado é o de grão longo que é subdividido em duas denominações: o estreito – agulha (Índica) e o oblongo – carolino (Japónica), sendo que o arroz carolino é a variedade mais produzida. No que diz respeito ao consumo, é o arroz agulha o mais consumido entre os portugueses (INE, 2020).

3.5. OTA no arroz

Os alimentos derivados de cereais, nomeadamente o arroz, são os mais contaminados por OTA. Os fungos podem contaminar o arroz no campo e continuar a sua atividade na pós-colheita, contribuindo significativamente para as perdas de produtividade. Verificam-se ainda situações de co-ocorrência de micotoxinas, o que poderá aumentar a toxicidade do alimento contaminado (Gonçalves *et al.*, 2019).

Uma das espécies de *Aspergillus* que crescem no arroz é o *Aspergillus ochraceus*, que produz OTA na pós-colheita, nomeadamente em determinadas condições de armazenamento. Os estudos realizados têm demonstrado que a produção de OTA máxima por *A. Ochraceus* ocorre em ambientes com 0,98 a w_w , num intervalo de temperatura entre 24°C a 31°C (Ali *et al.*, 2013).

O *Aspergillus westerdijkiae*, é outra importante espécie produtora de OTA, no entanto, nunca foi relatada em arroz. Acredita-se que se deva ao facto de apenas em 2004, *A. Westerdijkiae* ter sido separada de *A. Ochraceus* e ambas as espécies serem morfológicamente semelhantes. A produção máxima de OTA por *A. Westerdijkiae* ocorre em ambientes com 0,96 a w_w e temperatura de 24°C (Gil-Serna *et al.*, 2015).

O *Penicillium verrucosum* está também associado à produção de OTA em arroz. Os estudos realizados têm demonstrado um desenvolvimento ótimo em ambientes com a w entre 0,97 e 0,99 e temperatura de 20°C (Gonçalves *et al.*, 2019).

Dada a elevada capacidade de produção que os fungos ocratoxigénicos apresentam, é fundamental a utilização de ensaios sensíveis para a sua deteção e o desenvolvimento de estratégias de controlo e prevenção (Gil-Serna *et al.*, 2015).

Como foi anteriormente referido, o regulamento da CE introduziu um limite de 5 µg/kg para a OTA permitida em cereais crus, incluindo arroz (Regulamento (CE) n° 1881/2006, 2006).

Portugal apresenta condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de OTA. Por outro lado, a dieta adotada pela população portuguesa, a dieta mediterrânica, apresenta um elevado consumo de cereais, nomeadamente arroz. Uma vez que os cereais são considerados os principais contribuintes para a exposição OTA na Europa, a exposição à OTA deve ser alvo de mais investigação e vigilância (Duarte, Pena e Lino, 2010).

3.5.1. Ocorrência de OTA em arroz

Há registos de ocorrência de OTA em cereais e seus derivados, vinho, cerveja, café e outros produtos vegetais. Foi também detetada em produtos de origem animal, nomeadamente carne e leite (Duarte, Pena e Lino, 2010). No entanto, os cereais, onde se inclui o arroz, são o grupo de alimentos mais recorrentemente contaminados com OTA. De acordo com o portal RASFF, no período de janeiro de 2016 a junho de 2019, 25 do total de 87 notificações de OTA foram sobre produtos à base de cereais (RASFF, 2019).

Assim, na Tabela 3 estão apresentados alguns dos estudos realizados a nível mundial, de ocorrência de OTA em arroz.

Tabela 3: Dados de estudos prévios de determinação de OTA em arroz.

País	Tipo de Amostra	N° amostras	Frequência (%)	Teores (µg/kg)			Bibliografia
				Min.	Máx.	Média	
Marrocos	Arroz	20	90,0	0,02±0,01	32,4±2,10	4,15±1,45	(Zinedine et al., 2007)
Portugal	Arroz	42	14,2	0,09	3,52	---	(Pena et al., 2005)
Turquia	Arroz	100	38,0	0,042	3,02	0,83	(Buyukunal et al., 2009)
Coreia do Sul	Arroz	88	9,0	2,1	6,0	3,9	(Park et al., 2005)
Vietnam	Arroz	100	35,0	0,08	2,78	0,75	(NGUYEN et al., 2007)
Costa do Marfim	Arroz	10	100,0	9,0	92,0	---	(Sangare-Tigori et al., 2006)
Tunísia	Arroz	16	25,0	0,8	2,3	1,4	(Ghali et al., 2008)
Espanha	Arroz	64	7,8	4,3	27,3	0,74	(González et al., 2006)
China	Arroz	370	4,9	0,3	3,2	0,85	(Lai et al., 2015)
Paquistão	Arroz branqueado	34	29,4	---	24,9	8,5±0,6	
	Arroz integral	28	46,4	---	25,4	7,84±0,9	(Iqbal et al., 2016)
Irão	Arroz	308	9,4	0,84	11,37	3,6±2,66	(Rahimi, 2016)
Chile	Arroz	31	42	0	12,5	---	(Veja et al., 2009)
Canadá	Arroz	100	43	ND	0,49	0,11	(Bansal et al., 2011)
Canadá	Arroz	99	1,01	ND	0,49	0,49	(Bansal et al., 2011)
Espanha e Portugal	Arroz produção biológica	9	44,4	2,10	7,60	2,57±3,43	(Juan et al., 2008)
	Arroz produção convencional	4	0	NQ	NQ	NQ	
Tunísia	Arroz	96	28	10	150	44	(Zaied et al., 2009)
Brasil	Arroz	165	28	N.D.	30,24	1,78	(Almeida et al., 2012)
Malásia	Arroz	20	0	NQ	NQ	NQ	(Arne Dübecke, 2014)
Singapura	Arroz	190	0,5 (1 amostra de arroz partido)	46,5	46,5	46,5	(Lim et al., 2015)

ND - Níveis abaixo dos limites mínimos de deteção

NQ - Níveis abaixo dos limites de quantificação

Em todos os estudos apresentados na Tabela 3, verifica-se a incidência de OTA nas amostras de arroz, à exceção das amostras de arroz de produção convencional estudadas em Portugal e Espanha no ano de 2008.

De entre todos os estudos, o valor de contaminação por OTA mais elevado foi encontrado na Costa de Marfim, no ano de 2006. Este estudo, preliminar, tinha como objetivo a deteção de OTA em cereais. À exceção de quatro amostras de amendoim, todas as amostras apresentaram contaminação por OTA, variando de 3 a 1738 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A concentração de OTA no arroz variou entre 9 e 92 $\mu\text{g}/\text{kg}$, valores muito acima do legalmente estabelecido na UE (Sangare-Tigori *et al.*, 2006).

É possível verificar que os valores mais elevados de contaminação por OTA foram encontrados nos países em desenvolvimento. Este facto pode ser justificado pelo desconhecimento sobre a existência de micotoxinas, ausência de regulamentação, inclusão de alimentos contaminados na cadeia alimentar e poucas práticas preventivas, motivos estes que ainda se observam nos Países em Desenvolvimento (Wagacha e Muthomi, 2008).

Em 2005, em Portugal, foi conduzido um estudo com o objetivo de determinar a presença de OTA em 42 amostras de arroz adquiridas no mercado retalhista Português. Este estudo concluiu que nenhuma das amostras apresentava valores de OTA acima do legalmente permitido. No entanto, 14% das amostras apresentavam OTA em quantidades detetáveis sendo que, os teores de contaminação variaram entre 0,09 e 3,52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Pena *et al.*, 2005).

Em 2007, no Canadá, foi realizado um estudo para determinação de aflatoxinas, OTA e fumonisinas em arroz. Esta avaliação foi realizada em 2 períodos. Em 2007, 4 amostras de arroz apresentaram concentrações de OTA superiores ao LOQ (0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sendo que três eram dos Estados Unidos (arroz calrose, integral e sushi) e um da Índia (arroz basmati integral). Na segunda pesquisa, em 2008, apenas uma em 99 amostras estava positiva. Tratava-se de arroz glutinoso preto da Tailândia, que continha 0,49 ng/g de OTA. Ainda que a contaminação por OTA tenha variado nos dois momentos de avaliação, os valores encontram-se consideravelmente abaixo do valor regulamentado (Bansal *et al.*, 2011).

No ano de 2008, foi realizado um estudo com o objetivo de conhecer a ocorrência de OTA em cereais e produtos cerealíferos biológicos e não biológicos de Espanha e Portugal. O arroz não biológico não apresentava contaminação por OTA, no entanto, amostras de arroz biológico apresentavam um teor superior ao legalmente permitido na UE. Esta ocorrência

pode ser justificada pelas práticas seguidas na agricultura biológica, isto é o uso limitado de fertilizantes não sintéticos, pesticidas e sem uso de OGM. Este conjunto de fatores poderá explicar a provável proliferação de fungos e produção de micotoxinas (Juan *et al.*, 2008).

A grande maioria dos estudos apresentados, que foram conduzidos em países desenvolvidos, apresentam valores de contaminação por OTA inferiores ao valor máximo estabelecido na UE o que é justificado pelo número abundante de estudos e controlo eficaz.

Esta diferença de resultados entre países desenvolvidos e em desenvolvimento pode ainda ser justificada pelas diferenças existentes no que respeita às regiões, condições geográficas, e efeitos climáticos.

3.5.2. Descontaminação

A nível mundial a perda de rendimento nas culturas de arroz, devido a diferentes tipos de pragas, foi de aproximadamente 37%. As perdas pós-colheita em países em desenvolvimento representaram 15% a 16% da produção de arroz e esta percentagem aumenta para 40% a 50% em países com condições climáticas adversas. A maioria dessas perdas resulta de secagem inadequada e instalações de armazenamento inadequadas (Gonçalves *et al.*, 2019).

Os fungos podem contaminar os grãos de arroz no campo e continuar a sua atividade durante o armazenamento caso as condições ambientais permaneçam adequadas. A contaminação por micotoxinas depende de diferentes fatores, nomeadamente: as espécies de fungos, as suas interações com outros microrganismos e a área de produção. Todos estes fatores associam-se ainda às condições climáticas e práticas agrícolas e pós-colheita (Gonçalves *et al.*, 2019).

As estratégias mais importantes para reduzir os níveis de OTA são as preventivas, isto é: cumprimento de boas práticas agrícolas, cultivo de variedades resistentes a fungos, aplicação correta de fungicidas e o armazenamento adequado (embalamento, controle de temperatura, eficiência de ventilação e humidade adequada do ar). No entanto, apesar de vários anos de pesquisa e o cumprimento de boas práticas durante a produção, armazenamento e distribuição dos alimentos, as micotoxinas continuam a ser contaminantes presentes numa grande variedade de alimentos para consumo humano e rações para consumo animal (Abrunhosa, Paterson e Venâncio, 2010; Duarte *et al.*, 2012).

A elevada toxicidade da OTA levou a uma crescente pesquisa no que diz respeito a métodos capazes de descontaminar os alimentos da OTA no entanto, esta é bastante difícil de eliminar

devido à sua grande resistência e estabilidade a processos que recorram, por exemplo, a elevadas temperaturas (Silva, 2013).

Os métodos de descontaminação têm como objetivo remover, destruir ou modificar as micotoxinas, não dando origem a compostos tóxicos, não alterando significativamente a composição nutricional dos alimentos e deverão ser economicamente viáveis (Pereira, 2008).

Têm sido estudados métodos físicos, químicos e biológicos para a descontaminação de produtos para a alimentação humana e animal (Bullerman e Bianchini, 2007).

3.5.2.1. Métodos físicos

A porção externa dos grãos afetados apresenta maior contaminação de micotoxinas pelo que o descasque do grão e remoção do farelo produzido apresenta eficácia que irá depender do grau de penetração dos fungos (Dors, Antônio de Almeida Pinto e Badiale-Furlong, 2009; Pereira, 2008).

Grãos partidos e resíduos de cereais apresentam geralmente níveis superiores de micotoxinas em comparação com grãos intactos. Assim, a crivagem ou triagem dos resíduos após a sua separação permite a redução dos níveis de contaminação (Pereira, 2008).

As micotoxinas podem ainda ser destruídas pelas temperaturas alcançadas durante o processamento dos alimentos. A OTA é estável a moderado aquecimento, no entanto, são observadas perdas que variam até 90% a temperaturas superiores a 180°C (Pereira, 2008; Schrenk *et al.*, 2020).

3.5.2.2. Métodos químicos e métodos biológicos

Os métodos químicos, constituem os tratamentos com ozono, amônia, cloro, bissulfito de sódio, hidróxido de sódio e de cálcio, entre outros. Estes métodos, não são aceites dado que recorrem a substâncias nocivas e têm impacto negativo no valor nutricional dos alimentos (Bullerman e Bianchini, 2007).

No que diz respeito aos métodos biológicos, existem diversas bactérias, fungos filamentosos e leveduras com capacidade para degradar a OTA (Pereira, 2008). Na Tabela 4 estão apresentados alguns desses microrganismos.

Tabela 4: Microrganismos capazes de degradar OTA (Adaptado de Pereira, 2008).

Microrganismos	Efeito
Bactérias	
<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i>	Degradaram a totalidade de OTA presente em meios de cultura com 50,100 ou 500 µg/kg
Fungos Filamentosos	
<i>Rhizopus homothallicus</i> , <i>R.oryzae</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>Rhizopus sp.</i>	Degradaram mais de 95% da OTA presente num meio de cultura com 7,5 µg/kg, após 16 dias a 25°C
Leveduras	
<i>Trichosporon sp.</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> , <i>Cryptococcus sp.</i>	Degradou 80 a 100% da OTA presente num meio de cultura com 0,2 µg/L após 2,5 a 5 horas de incubação a 35°C.

A OTA, pode ainda ser hidrolisada enzimaticamente pela carboxipeptidase A do pâncreas bovino e por uma lípase obtida a partir de *Aspergillus niger* (Pereira, 2008).

É essencial continuar a investigação no que diz respeito às estratégias para redução de OTA durante o processamento dado o risco reconhecido que esta representa para a saúde humana.

3.5.3. Métodos analíticos

A análise de micotoxinas apresenta várias dificuldades nomeadamente no que diz respeito à análise de várias micotoxinas regulamentadas em simultâneo, pois apresentam uma grande diversidade de estruturas químicas. Além disso, as micotoxinas, geralmente, estão presentes em baixas concentrações. Assim, são necessários métodos analíticos precisos, rápidos, altamente sensíveis e com elevada reprodutibilidade para controlar os níveis de OTA nos alimentos e desta forma fazer cumprir os limites legais, avaliar a exposição humana e ainda para a investigação (Duarte, Lino e Pena, 2014; Pereira, 2008).

A metodologia analítica para análise de micotoxinas compreende três etapas fundamentais: extração da totalidade ou parte de amostra, purificação do extrato obtido e quantificação e confirmação da micotoxina (Singh *et al.*,2020).

A correta amostragem tem um papel preponderante na garantia da validade do método pois esta representa uma fonte de erros. Para a OTA, está estabelecido, no Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006 os métodos de amostragem e de análise

para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. Antes de ser extraída, a amostra necessita de ser preparada sobretudo quando se trata de uma amostra sólida. Nesta situação, é necessário proceder à trituração para reduzir o tamanho das partículas obtidas e homogeneizar (*Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão Europeia, 2006*).

Na Tabela 5 estão descritos diversos métodos analíticos usados na determinação de OTA em arroz, usados por vários autores.

Na etapa de purificação, a maioria dos investigadores recorre a colunas de imunoafinidade (IAC). As IAC são colunas que contêm anticorpos específicos para determinadas micotoxinas e permitem extrações e purificações rigorosas (Almeida *et al.*, 2012; Bansal *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2016; Pena *et al.*, 2005; Zaied *et al.*, 2009).

Relativamente à etapa de deteção e quantificação, a maioria dos investigadores recorre a métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fluorescência (HPLC-FD) (Almeida *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2005; Sangare-Tigori *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2009; Zaied *et al.*, 2009), cromatografia líquida com deteção por fluorescência (LC- FD) (González *et al.*, 2006; Juan *et al.*, 2008; Zinedine *et al.*, 2007), à cromatografia líquida de ultra eficiência com deteção por fluorescência (UPLC- FD) (Bansal *et al.*, 2011) e à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC- MS/MS) (Arne Dübecke, 2014; Lim *et al.*, 2015). Outros investigadores, recorreram ao método imunoenzimático ELISA. Este método baseia-se na reação antígeno- anticorpo e apresenta vantagens nomeadamente, o facto de ser um teste rápido e que necessita de um volume reduzido de amostras (Buyukunal, Kahraman e Ciftcioglu, 2009; Ghali *et al.*, 2008; Rahimi, 2016).

Para determinação por LC-FD, metodologia selecionada por grande parte dos autores, no que respeita à fase móvel, os solventes mais utilizados são o acetonitrilo, a água e o ácido acético, em diferentes proporções (Iqbal *et al.*, 2016; Pena *et al.*, 2005; Zinedine *et al.*, 2007). Outros investigadores utilizaram diferentes solventes nomeadamente, mistura de metanol/ácido fosfórico (González *et al.*, 2006; Juan *et al.*, 2008), acetonitrilo/metanol/ácido fosfórico (Lai *et al.*, 2015; Vega *et al.*, 2009), ácido fosfórico/acetonitrilo/isopropanol (NGUYEN *et al.*, 2007), metanol/ acetonitrilo/acetato de sódio/ácido acético (Zaied *et al.*, 2009), acetonitrilo/ácido acético/acetato de sódio (Sangare-Tigori *et al.*, 2006) e metanol/acetonitrilo/água/ácido acético (Almeida *et al.*, 2012). A grande maioria dos autores utiliza colunas C18 (Almeida *et al.*, 2012; Arne Dübecke, 2014; Bansal *et al.*, 2011; González *et al.*, 2006; Iqbal *et al.*, 2016; Juan *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2005; Sangare-Tigori *et al.*, 2006; Vega

et al., 2009; Zaied *et al.*, 2009; Zinedine *et al.*, 2007). Relativamente aos comprimentos de onda de excitação (λ exc.) usados, variaram entre 330 e 335 nm e os comprimentos de onda de emissão (λ em.) variaram entre 460 e 476 nm (Almeida *et al.*, 2012; Bansal *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2005; Zaied *et al.*, 2009).

Tabela 5: Métodos analíticos utilizados na determinação de OTA em arroz.

Amostra	Extração/ Purificação	Deteção e quantificação	Fase móvel	% Recuperação	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Bibliografia
Arroz	<ul style="list-style-type: none"> - Extração com 1,5 g da fase sólida C8 (50 mm); - Colocação numa coluna cromatográfica; - Eluição da OTA com 20 ml ácido metanoico (99: 1, v / v); - Evaporação para 3ml com azoto a 45°C; - Filtração com filtro de membrana de 0,45 µ m; - Centrifugação a 5000 rpm durante 10 min; - Filtração e evaporação à secura com azoto a 55°C. 	<p>LC-FD</p> <ul style="list-style-type: none"> - λ exc. – 333 - λ em. – 464 - Coluna C18 (150x4,6 mm i.d,5 µm) 	<p>Acetonitrilo/ água/ ácido acético (49,5: 49,5: 1 v/v/v)</p>	83	-	0,021	(Zinedine et al., 2007)
Arroz	<ul style="list-style-type: none"> - Extração com 38 ml PBS/Metanol com recurso a <i>Ultra Turrax</i> (higienizado posteriormente com 2 ml PBS/metanol); - Centrifugação a 3400 g durante 15 minutos a 4°C; - Diluição do sobrenadante com 30 ml PBS; - Colocação de extrato na Coluna IAC; - Eluição da OTA com 3 ml metanol; 	<p>LC- FD</p> <ul style="list-style-type: none"> - λ exc. – 333 - λ em. – 460 - Coluna C18 (300x4 mm i.d,5 µm) - Coluna C18 (250x4,6 mm i.d,5 µm) 	<p>Acetonitrilo/ água/ ácido acético (49,5: 49,5: 1 v/v/v)</p>	92	-	0,05	(Pena et al., 2005)

	- Evaporação à secura com azoto a 40°C.								
Arroz	- Extração com recurso a Diclorometano com NaHCO ₃ .	ELISA - 450nm	-	85	0,025	-			(Buyukunal et al, 2009)
Arroz	- Extração com clorofórmio após adição de 0,1 M de ácido fosfórico; - Fracionado em solução aquosa de bicarbonato de sódio a 3%; - Higienização num cartucho Sep-Pak C18.	LC- FD	-	-		-			(Park et al, 2005)
Arroz	- Extração com 100 ml de acetonitrilo - solução aquosa de cloreto de potássio a 4%; - Agitação orbital por 20 min e filtração através de um papel Whatman sob vácuo; - Adição de 100 ml de n-hexano e agitado 10 min; - Evaporação até quase secura sob vácuo; - Filtração através de um filtro de 0,45 µm; - Evaporação até à secura sob azoto.	LC- FD - λ exc. – 335 - λ em. – 465 - Coluna C18 (250x4.6 mm i.d,3 µm)	Ácido fosfórico/ Acetonitrilo/ propan-2-ol (650/400/50 v/v/v)	84,1	0,08	0,25			(NGUYEN et al, 2007)
Arroz	- Extração com 50 ml de MgCl ₂ (0,4 M) e 30 ml de Ácido clorídrico (2N) e 50 ml de metil benzeno; - Centrifugação a 3000 g durante 5 minutos;	LC- FD - λ exc. – 330 - λ em. – 470							

	- Evaporação da fase orgânica à secura sob vácuo; - Colocação de ml de clorofórmio no cartucho Sep-Pak; - Evaporação do eluato à secura e dissolvido com 1 ml de fase móvel.	- Coluna (250x 4,6mm 10µm) - Coluna C18 (30 x 4,6mm, 10µm)	48% de acetonitrilo e 52% de acetato de sódio-ácido acético (19:1 v/v) 4mM	98 a 105	0,01	0,05	(Sangare-Tigori et al., 2006)
Arroz	- Extração com recurso a Diclorometano com NaHCO ₃ .	ELISA -450nm	-	78±3,4	0,625	-	(Ghali et al., 2008)
Arroz	- Extração com recurso a um sistema automatizado de ASE; - Extração de OTA com 15 mL de metanol e o extrato foi concentrado até um volume de 5 mL; - Evaporação do eluato a 55°C com um fluxo suave de azoto; - Reconstituição com metanol até um volume final de 0,5 mL.	LC- FD - λ exc. – 334 - λ em. – 464 - C18 (15x 4,6 mm i.d. 5 µm)	Metanol// Ácido Fórmico 0.1M (70:30 v/v)	>90	0,01	0,03	(González et al., 2006)
Arroz	- Extração com 80 ml de uma mistura de MeCN/H ₂ O/CH ₃ COOH ((79/20/1 (v/v/v)); - Filtração, sendo que 1 mL de filtrado foi misturado com 200 mL de CHCl ₃ e posteriormente injetado num tubo de centrifuga de vidro de 15 mL contendo 5 mL NaCl a 2% em água (pH 3,0);	LC- FD λ exc. – 333 λ em. – 460	Acetonitrilo Metanol 1% Ácido Fosfórico	85,2 a 112	0,08	0,3	(Lai et al., 2015)

	<p>Evaporação à secura da fase de CHCl₃.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adição de 100ml de acetoneitrilo/água (90:10%v/v); - Filtração, sendo que 5ml do filtrado foi misturado com 50ml de PBS; - Filtração através de microfibras de vidro; - Adição de 1ml de ácido acético; - Colocação na coluna IAC (OchraTest); - Eluição com 1,5ml de metanol; - Evaporação a secura a 40°C. 	<p>LC- FD</p> <ul style="list-style-type: none"> - λ exc. – 333 - λ em. – 460 - Coluna C18 (250x4.6 mm i.d,5 μm) 	<p>Acetonitrilo/ água/ ácido acético (47: 51: 2 v/v/v)</p>	<p>85 a 91</p>	<p>0,06</p>	<p>0,18</p>	<p>(Iqbal et al., 2016)</p>
<p>Arroz</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Adição de 10 ml de ácido fosfórico (0,5 M) e 20 ml de diclorometano metanol; - Agitação durante 10 min; - Centrifugação a 2000 g durante 5 min; - Centrifugação da camada superior (ácido fosfórico) a 2.000 g por 5 min; - Filtração da camada inferior (diclorometano) através de um papel de filtro de microfibras; - Evaporação de 20 ml do filtrado até à secura sob azoto a 50°C; 	<p>ELISA -450 nm</p>	<p>-</p>	<p>85,3 a 86,7</p>	<p>0,625</p>	<p>-</p>	<p>(Rahimi, 2016)</p>

	<ul style="list-style-type: none"> - Dissolução do resíduo em 1,5 ml de tampão de extração e 2 ml de n-hexano; - Centrifugação da mistura a 2000 g durante 5 min. 								
Arroz	<ul style="list-style-type: none"> - Extração com 200 ml de bicarbonato de sódio; - Agitação durante 30 min; - Filtração através de papel de filtro; - Adição de 10ml de PBS a 1 e 10ml de filtrado; - Colocação numa coluna Sep-Pak; - Eluição com 3 ml de metanol; - Evaporação até secar sob azoto a 40°C. 	<p>LC- FD</p> <ul style="list-style-type: none"> - λ exc. – 333 - λ em. – 470 - Coluna C18 (150x3,9 mm i.d,5 μm) 	<p>Acetonitrilo/ Metanol e Ácido Fosfórico 0,15 mol / L (1 + 1 + 1 v / v / v)</p>	104,6± 1,0	0,6	2,1			(Vega et al., 2009)
Arroz	<ul style="list-style-type: none"> - Adição 1,5 g da fase sólida (C8) durante 5 min com recurso a um pilão; - Introdução numa coluna de vidro e posteriormente tapado com lã de vidro; - Eluição da OTA com 20 ml de ácido formico- metanol (99:1, v/v) com recurso a vácuo; - Concentração do eluato para 3 ml com um fluxo suave de azoto a 45°C; - Filtração através de um filtro de 0,45 μm ; 	<p>LC- FD</p> <ul style="list-style-type: none"> - λ exc. – 333 - λ em. – 460 - Coluna C18 (150x4,6 mm i.d.5 μm) 	<p>Metanol / Ácido Fórmico 0,1 M (70:30 v/v)</p>	69 a 89	0,05	0,19			(Juan et al., 2008)

	<p>- Eluição da OTA com 4 ml de metanol.</p> <p>- Extração com 100 ml de acetonitrilo-água (6 + 4, v / v);</p> <p>- Filtração através de papel de filtro Whatman;</p> <p>- Diluição de 4 e 5 ml com 55 ml de PBS;</p> <p>- Filtração novamente através de um filtro de microfibras de vidro Whatman 934-AH sob vácuo;</p> <p>- Aplicação em IAC (VICAM OchraTest™) de 48 ml do filtrado;</p> <p>- Eluição de OTA com 4 x 1 ml de metanol;</p> <p>- Evaporação e o resíduo foi redissolvido em 500 ml de metanol-água-ácido acético (30 + 70 + 1, v / v / v).</p>	<p>UPLC- FD</p> <p>- λ exc. – 330</p> <p>- λ em. – 470</p> <p>- Coluna C18 (1.7 μm, 2.1x50 mm)</p>	<p>Fase A: água/ ácido fórmico (99 : 1 v/v)</p> <p>Fase B: Acetonitrilo/ ácido fórmico (99 : 1 v/v)</p>	<p>86 a 89</p>	<p>0,05</p>	<p>0,2</p>	<p>(Bansal et al., 2011)</p>
Arroz	<p>- Extração da amostra com 10 mL de ACN / água (80:20, v / v) adicionado com 0,1% de ácido fórmico;</p> <p>- Agitação durante 60 min e centrifugação durante 10 min;</p> <p>- Diluição de 500 μL do extrato sobrenadante com igual quantidade de água ultrapura;</p> <p>- Filtração através de um náilon de 0,45 μm.</p>	<p>LC-MS/MS</p> <p>-Coluna C18 (2.1x50 mm, 1,8 μ m)</p> <p>- 404.2 [M+H]⁺</p> <p>- Ionização por eletrospray (ESI)</p>	<p>Fase A: 0,5 mM de acetato de amônio, 0,1% de ácido fórmico em água</p> <p>Fase B: 0,5 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico em metanol</p>	<p>99,28</p>	<p>0,5</p>	<p>2</p>	<p>(Arne Dübecke, 2014)</p>

<p>- Adição de 4 mL de solvente de extração à amostra e posterior agitação durante 30 Minutos;</p> <p>- Centrifugação a 8.000 rpm (3226 g) durante 6 min;</p> <p>- Diluição de 1: 1 usando fase móvel B;</p> <p>- Adição de padrões isotópicos individuais ao sobrenadante diluído e agitados vigorosamente;</p> <p>- Purificação das amostras utilizando um filtro de membrana de 0,2 μ m.</p>	<p>LC -MS/MS</p> <p>- Coluna C18 (2,6 μ m, 100\times3,0 mm)</p> <p>- 404,0 [OTA+H]⁺</p> <p>- ESI</p>	<p>Fase A: 99% de metanol, 1mM acetato de amônio e 0,1% de ácido acético</p> <p>Fase B: 1% de metanol (em água), 1mM acetato de amônio e 0,1% de ácido acético</p>	<p>90- 108 (arroz branqueado e integral)</p> <p>70-77 (arroz vermelho)</p>	<p>0,2 (arroz branqueado e integral)</p> <p>2,4 (arroz vermelho)</p>	<p>0,4 (arroz branqueado e integral)</p> <p>4,1 (arroz vermelho)</p>	<p>(Lim et al., 2015)</p>
--	---	--	--	--	--	---------------------------

PARTE B- EXPERIMENTAL

1. Objetivo

O estudo decorreu no Laboratório de Bromatologia, Hidrologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Escola Universitária Vasco da Gama tendo como principal objetivo a pesquisa da micotoxina, OTA em diferentes amostras de arroz.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem

Foram analisadas 42 amostras de conveniência de arroz. Destas, 20 foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Coimbra, e 22 foram cedidas por produtores. A colheita das amostras foi realizada no período que decorreu entre setembro de 2019 e julho de 2020, em Portugal continental, abrangendo, no entanto, diferentes regiões de produção e vários países.

Das 20 amostras adquiridas em estabelecimentos comerciais, 16 eram de arroz branqueado e 4 de arroz integral. No que diz respeito ao tipo, 5 são agulha, 4 basmati, 2 thai, 2 thai jasmine, 1 sushi, 1 negro, 1 selvagem, 1 aromático Punjab, 1 carolino e 2 extra longo. Das amostras adquiridas na superfície comercial, 7 foram produzidas na Europa, 4 na América e 9 na Ásia.

Das 22 amostras cedidas por produtores, 11 eram de arroz branqueado e 11 de arroz integral. Relativamente à região de produção, 12 eram oriundas da região do Mondego, 8 do Tejo e 2 do Sado.

Após colheita das amostras, as mesmas foram devidamente caracterizadas de acordo com o tipo de arroz, a marca/variedade e o País/ região de produção. A Tabela 6 sumaria a caracterização das amostras incluídas no presente estudo.

As amostras conservaram-se à temperatura ambiente, protegidas da luz, até ao momento da sua análise.

Tabela 6: Caracterização das amostras incluídas no estudo.

Tipo de arroz		Marca / Variedade	Branqueado	Nacional	País / Região de produção
1	Extra Longo Branqueado Thai Jasmine	Auchan	S	N	Tailândia
2	Extra Longo Integral Vaporizado Negro Variedade nerone	Caçarola	N	N	China
3	Extra Longo Branqueado Agulha	Caçarola	S	S	Portugal / Oliveira de Azeméis
4	Extra Longo Selvagem	Caçarola	S	N	Canadá
5	Extra Médio Branqueado Sushi	Caçarola	S	S	Portugal
6	Extra Longo Branqueado Thai Perfumado	Caçarola	S	N	Tailândia
7	Extra Longo Basmati	Caçarola	S	N	Índia / Himalaias
8	Extra Longo Carolino	Ceifeira	S	S	Portugal
9	Extra Longo Branqueado - Aromático de Punjab	Continente seleção	S	N	Índia / Punjab
10	Extra Longo Branqueado Thai Jasmine	Continente	S	N	Tailândia
11	Extra longo Basmati Integral	Continente	N	S	Portugal
12	Extra Longo Perfumado Branqueado Thai	Dia (Mini-preço)	S	N	Tailândia
13	Extra Longo Integral	Golden Sun- LIDL	N	S	Portugal
14	Extra Longo Agulha Branqueado	Golden Sun- LIDL	S	S	Portugal
15	Extra Longo Agulha Branqueado	Golden Sun- LIDL	S	N	Suriname
16	Extra Longo Agulha Basmati	Pingo Doce	S	N	Paquistão & Índia
17	Extra Longo Agulha Branqueado	Pingo Doce	S	N	Uruguai
18	Extra Longo Basmati	PorSi	S	N	Índia
19	Extra Longo Integral	Saludões	N	S	Portugal / Coruche
20	Extra Longo Agulha Branqueado	Up	S	N	Guiana

Amostras de supermercado

21	Longo (265S)	Albatroz	S	S	Portugal / Tejo
22	Integral Longo (265SI)	Albatroz	N	S	Portugal / Tejo
23	Longo (138S)	RG20I	S	S	Portugal / Tejo
24	Integral Longo (138SI)	RG20I	N	S	Portugal / Tejo
25	Longo (290S)	Teti	S	S	Portugal / Tejo
26	Integral Longo (290SI)	Teti	N	S	Portugal / Tejo
27	Longo (291S)	Teti	S	S	Portugal / Tejo
28	Integral Longo (291SI)	Teti	N	S	Portugal / Tejo
29	Longo (217ES)	Luna	S	S	Portugal / Sado
30	Integral Longo (217ESI)	Luna	N	S	Portugal / Sado
31	Longo (223S)	Nemesi	S	S	Portugal / Mondego
32	Integral Longo (223SI)	Nemesi	N	S	Portugal / Mondego
33	Longo (25S)	Ceres	S	S	Portugal / Mondego
34	Integral Longo (25SI)	Ceres	N	S	Portugal / Mondego
35	Agulha (176S)	Maçarico	S	S	Portugal / Mondego
36	Integral Agulha (176SI)	Maçarico	N	S	Portugal / Mondego
37	Longo (19S)	Teti	S	S	Portugal / Mondego
38	Longo (19SI)	Teti	N	S	Portugal / Mondego
39	Longo (206ES)	Carogan	S	S	Portugal / Mondego
40	Integral Longo (206ESI)	Carogan	N	S	Portugal / Mondego
41	Longo (5S)	Luna	S	S	Portugal / Mondego
42	Integral Longo (5SI)	Luna	N	S	Portugal / Mondego

S - Sim

N - Não

2.2. Reagentes e soluções

A análise quantitativa de OTA nas amostras de arroz foi realizada através de um método imunoenzimático ELISA em formato competitivo, tendo-se usado um teste *kit* RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15, R1312 (R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha). A preparação das amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita no manual do teste.

No *kit* encontravam-se disponibilizados os seguintes reagentes e soluções que se utilizaram:

- Placa de microtitulação de 96 poços;
- Reagente de extração (ECO *extractor*) concentrado que foi posteriormente diluído com água destilada 1:10;
- Padrão 1 - 0 μ g/L;
- Padrão 2 - 0.03 μ g/L;
- Padrão 3 - 0.1 μ g/L;
- Padrão 4 - 0.3 μ g/L;
- Padrão 5 - 1 μ g/L;
- Padrão 6 - 3 μ g/L;
- PBS tween para lavagem (*wash buffer*). O sal tampão foi posteriormente dissolvido num litro de água destilada;
- Conjugado;
- Substrato;
- Solução Stop.

2.3. Equipamentos

No decorrer da análise utilizaram-se os seguintes equipamentos:

- Espectrofotómetro de placa de microtitulação (450 nm);
- Centrifugadora Sigma3-16K;
- Agitador horizontal Edmund Buhler 7400 Tubingen;
- Moinho de café Kunft;
- Balança Mettler toledo;
- Vórtex z x3 Advanced vortex mixer.

2.4. Procedimento experimental

2.4.1. Extração arroz

Todos os reagentes e amostras foram trazidos à temperatura ambiente (20-25°C) e todo o material de laboratório foi higienizado e desinfetado, por forma a minimizar a contaminação das amostras.

As amostras foram trituradas e de seguida pesados 10 g de cada amostra num tubo de vidro de centrifuga, devidamente tarado e identificado. Adicionou-se 50 ml de reagente de extração (*ECO extractor*) diluído. De seguida agitou-se no vortéx, durante 10 segundos. Posteriormente, as amostras foram colocadas num agitador horizontal, a 420 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, foram colocadas a centrifugar durante 5 minutos, a 3500 g, à temperatura ambiente. Finalmente, transferiu-se 1 ml do sobrenadante de cada extrato para um vial ao qual se adicionou 1 ml da solução tampão de lavagem (*wash buffer*).

2.4.2. Quantificação pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Foram registadas todas as posições das soluções padrão e dos extratos das amostras na placa de microtitulação.

Adicionou-se, em duplicado, 50 µL das soluções padrão (0; 0,03; 0,1; 0,3; 1 e 3 µg/L) e dos extratos das diferentes amostras aos poços respetivos. De seguida, adicionou-se 50 µL do conjugado e a microplaca foi então cuidadosamente agitada e incubada, durante 30 minutos, sem presença de luz (utilização de papel de alumínio), à temperatura ambiente (entre 20 e 25°C).

Após o término do período de incubação, os poços foram esvaziados por inversão, por três vezes, batendo vigorosamente o suporte da microplaca contra papel absorvente para garantir a remoção completa de todo o líquido. Prosseguiu-se com o procedimento de lavagem dos poços com a solução tampão de lavagem, em 3 ciclos, sendo sempre descartado o líquido na totalidade.

Em seguida, adicionou-se 100 µl de substrato cromogéneo a cada poço e agitou-se cuidadosamente a microplaca ficando a incubar durante 15 minutos, sem presença de luz (utilização de papel de alumínio), à temperatura ambiente (entre 20 e 25°C).

Finalmente, adicionou-se 100 μ l da solução STOP de modo a interromper a reação do substrato com a enzima e procedeu-se, de imediato à medição da absorvância a um comprimento de onda de emissão (λ em.) de 450 nm.

Para avaliação dos resultados de absorvâncias obtidas no imunoensaio enzimático foi utilizado o software RIDASOFT.Win.net. O cálculo realizado em determinações duplas através de uma função *spline* cúbica.

3. Resultados e discussão

Este ensaio imunoenzimático ELISA permite uma elevada especificidade e um reduzido tempo de análise. O princípio do teste baseia-se na reação antigénio-anticorpo. Os poços da placa de microtitulação são revestidos com anticorpos específicos para a OTA. Após a adição dos padrões de OTA, dos extratos das amostras e do conjugado enzimático, a OTA livre e conjugada com a enzima competem então pela ligação ao anticorpo (imunoensaio enzimático competitivo). Qualquer conjugado de enzima não ligado é então removido na etapa de lavagem. Após adição do substrato/cromogéneo aos poços e incubação, o conjugado enzimático ligado converte o cromogéneo numa solução azul. A adição da solução STOP leva a uma mudança de cor para amarelo. A medição da absorvância é feita fotometricamente a 450 nm, sendo inversamente proporcional à concentração de OTA no padrão ou nos extratos das amostras.

A metodologia utilizada já se encontrava previamente validada pela marca que disponibiliza o *kit* ELISA. O limite de deteção (LOD) descrito no manual do teste *kit* é de 0,8 μ g/kg para arroz. A percentagem de recuperação indicada em amostras fortificadas variou entre 75-130%.

Os LODs descritos na literatura, em estudos com recurso ao método ELISA, variam entre 0,025 e 0,625 μ g/kg. Nos estudos apresentados, que recorreram a métodos cromatográficos, os valores de LOD variam entre 0,01 e 2,4 μ g/kg. O LOD descrito no manual, 0,8 μ g/kg, é considerado satisfatório tendo em conta a matriz em análise, dado que é da mesma ordem de grandeza dos valores encontrados em outros estudos (Buyukunal, Kahraman e Ciftcioglu, 2009; Ghali *et al.*, 2008; González *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2015; Rahimi, 2016; Sangare-Tigori *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2009).

Relativamente à curva de padrão obtida (Figura 7), no ensaio realizado (B), a média do coeficiente de variação (CV) foi de 2,5%, sendo o valor mais elevado de 6%. No controlo de qualidade do teste (A) foi descrito um CV médio de 1.5%.

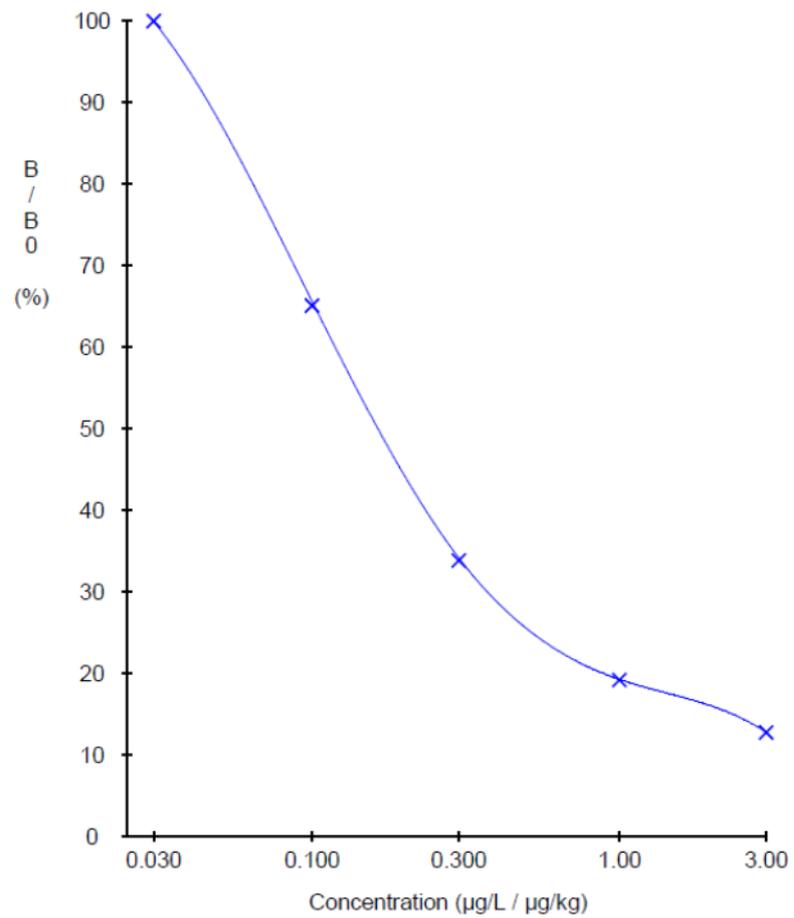
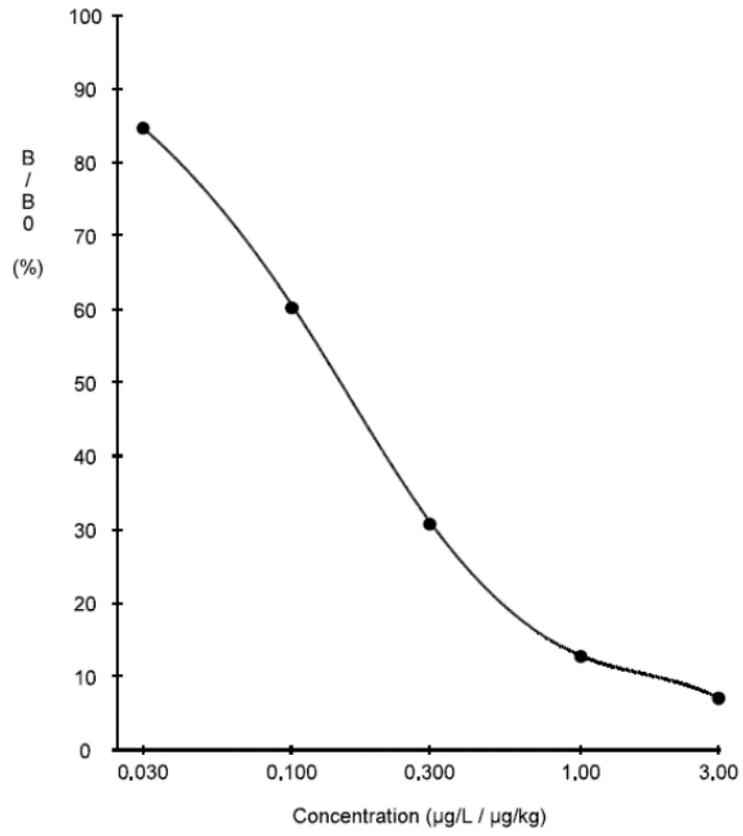


Figura 7: Curva padrão obtida no controlo de qualidade do teste (A) e no ensaio realizado (B).

Para avaliação dos resultados de absorvâncias obtidas no imunoensaio enzimático foi utilizado o software RIDASOFT.Win.net. O cálculo realizado em determinações duplas através de uma função *spline* cúbica.

No presente estudo, das 42 amostras analisadas, nenhuma apresentava contaminação por OTA.

A contaminação por micotoxinas no arroz é geralmente menor do que no trigo ou milho (Tanaka *et al.*, 2007). Comparando com estudos anteriores (Tabela 3), a incidência reportada nos mesmos foi maior. No entanto, num estudo anteriormente realizado em Portugal, em que foram analisadas 42 amostras de arroz português de diferentes origens, nenhuma das amostras analisadas apresentou contaminação por resíduos de OTA acima do limite legal e apenas 14% das amostras continham resíduos em níveis detetáveis (Pena *et al.*, 2005).

As micotoxinas estão sujeitas a regulamentação em muitos países, para limitar sua presença em alimentos, nomeadamente no arroz. Os resultados atuais podem justificar-se pela aplicação de boas práticas agrícolas e de produção, armazenamento e distribuição do arroz (Ferre, 2016).

CONCLUSÕES

Nenhuma das amostras de arroz analisadas apresentam contaminação por OTA. Assim, os resultados mostram que os níveis de OTA no arroz estão abaixo dos limites regulamentares e os produtos de arroz são seguros.

As micotoxinas estão sujeitas a regulamentação em muitos países, para limitar sua presença em alimentos, nomeadamente no arroz. Os resultados atuais podem justificar-se pela aplicação de boas práticas agrícolas e de produção, armazenamento e distribuição do arroz.

No entanto, sendo o arroz um dos alimentos base da alimentação mundial e atendendo aos resultados obtidos noutros estudos, é necessário continuar a monitorizar a exposição da população à OTA por forma a proteger a saúde pública. Além disso, deve-se investigar também a contaminação com outras toxinas de *Penicillium*, como por exemplo a citrinina, não apenas por isolados de *P. citrinum*, mas também por isolados de *P. verrucosum*. Deve notar-se que a citrinina e OTA atuam de forma sinérgica e a co-ocorrência de ambas foi relacionada com a nefropatia endémica dos Balcãs.

BIBLIOGRAFIA

ABRUNHOSA, Luís; PATERSON, Robert; VENÂNCIO, Armando - Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins*. . ISSN 2072-6651. 2:5 (2010) 1078–1099. doi: 10.3390/toxins2051078

ALI, R. *et al.* - Effect of temperature on ochratoxin A production in common cereals by *Aspergillus* species. *Journal of Animal and Plant Sciences*. . ISSN 10187081. 23:5 (2013) 1316–1320.

ALMEIDA, M. I. *et al.* - Co-occurrence of aflatoxins B 1 , B 2 , G 1 and G 2 , ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*. . ISSN 1944-0049. 29:4 (2012) 694–703. doi: 10.1080/19440049.2011.651750

ANLI, Ertan; ALKIS, İ. Mert - Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. . ISSN 00469750. 116:1 (2010) 23–32. doi: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00394.x

ARNE DÜBECKE, Mehdi Sameni - Simultaneous Multi- Residue Determination of Mycotoxins in Foods Using LC-MS/MS. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*. . ISSN 21610525. 05:02 (2014). doi: 10.4172/2161-0525.1000259

BANSAL, J. *et al.* - Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Additives & Contaminants: Part A*. . ISSN 1944-0049. 28:6 (2011) 767–774. doi: 10.1080/19440049.2011.559279

BOUDRA, H. *et al.* - Short communication: Toxicokinetics of ochratoxin A in dairy ewes and carryover to milk following a single or long-term ingestion of contaminated feed. *Journal of Dairy Science*. . ISSN 00220302. 96:10 (2013) 6690–6696. doi: 10.3168/jds.2013-6707

BRITES, Carla; LOURENÇO, Diana - Arroz, um alimento saudável. Benefícios, riscos e mecanismos de promoção nutricional. *Vida Rural*. 2014) 40–42.

BULLERMAN, Lloyd B.; BIANCHINI, Andreia - Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*. . ISSN 01681605. 119:1–2 (2007) 140–146. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035

BUYUKUNAL, Serkan; KAHRAMAN, Tolga; CIFTCIOGLU, Gurhan - Occurrence of AF, AFBI, OTA in Rice Commercialized in Eastern Turkey. *Polish J. of Environ. Stud.* 19:2009) 907–912.

DANIELA, Eliza *et al.* - Ochratoxin: nature, origin, metabolism and toxic effects in pigs. *Archiva Zootechnica*. (2009).

Decreto-Lei n.º 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural. 1.ª série — N.º 248 (17- Disponível em <https://dre.pt/application/conteudo/114420282>

DORS, Giniani Carla; ANTÔNIO DE ALMEIDA PINTO, Luiz; BADIALE-FURLONG, Eliana - Migration of mycotoxins into rice starchy endosperm during the parboiling process. *LWT - Food Science and Technology*. . ISSN 00236438. 42:1 (2009) 433–437. doi: 10.1016/j.lwt.2008.03.012

DUARTE, S. C. *et al.* - Determinants of ochratoxin A exposure—A one year follow-up study of urine levels. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. . ISSN 14384639. 215:3 (2012) 360–367. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.12.001

DUARTE, S. C.; LINO, C. M.; PENA, A. - Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status. *Food Additives & Contaminants: Part A*. . ISSN 1944-0049. 27:10 (2010) 1440–1450. doi: 10.1080/19440049.2010.497166

DUARTE, Sofia C.; PENA, Angelina; LINO, Celeste M. - Ochratoxin A in Portugal: A Review to Assess Human Exposure. *Toxins*. . ISSN 2072-6651. 2:6 (2010) 1225–1249. doi: 10.3390/toxins2061225

DUARTE, Sofia; LINO, Celeste; PENA, Angelina - Mycotoxins and their implications in food safety. ISBN 978-1-909453-22-7

EFSA - Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*. . ISSN 18314732. 4:6 (2006) 365. doi: 10.2903/j.efsa.2006.365

EFSA - Mycotoxins, atual. 2020. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins>

ESCRIVÁ, Laura; FONT, Guillermina;; MANYES, Lara. - Studies on the Presence of Mycotoxins in Biological Samples: An Overview. *Toxins*. . ISSN 2072-6651. 9:8 (2017) 251. doi: 10.3390/toxins9080251

FAO - Food and Agriculture Organization. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. Disponível em www.fao.org/3/a-y1390e.pdf

FERRE, F. Sempere - Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. *Food Control*. . ISSN 09567135. 62:(2016) 291–298. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.051

GHALI, R. *et al.* - Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control*. . ISSN 09567135. 19:9 (2008) 921–924. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.09.003

GIL-SERNA, Jessica *et al.* - *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food Microbiology*. . ISSN 07400020. 46:(2015) 168–175. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.013

GONÇALVES, A. *et al.* - Pre- and Postharvest Strategies to Minimize Mycotoxin Contamination in the Rice Food Chain. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. . ISSN 15414337. 18:2 (2019) 441–454. doi: 10.1111/1541-4337.12420

GONZÁLEZ, L. *et al.* - Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology*. . ISSN 01681605. 107:2 (2006) 223–227. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.001

GPP - Disponível em: <https://www.gpp.pt/images/gam/1/fi/ArrozFI.pdf>

GRISP - Rice almanac, 4th edition. Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute. ISBN 978-971-22-0300-8.

HASCHEK, Wanda M.; VOSS, Kenneth A. - Mycotoxins. Em Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. [S.l.] : Elsevier, 2013 Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012415759000039X>>. p. 1187–1258.

INE - Balança alimentar portuguesa: 2012-2016. Em Lisboa : Disponível em : <https://www.ine.pt/xurl/pub/289818234>>. ISBN 978-989-25-0389-9

INE - Portal do Instituto Nacional de Estatística, atual. 2020. [Consult. 17 mar. 2020]. Disponível em : https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000186&contexto=bd&selTab=tab2&fbclid=IwAR3XXSj3aNRegAJn2cEeYQdLQJUqgUmqRDjR0P4KqaNblkpQaB5-mZ6kEY

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA - Estatísticas Agrícolas - 2018. (2019).

IQBAL, Shahzad Zafar *et al.* - The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; and evaluation of dietary intake. *Food Chemistry*. . ISSN 03088146. 210:(2016) 135–140. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.104

IRRI - International Rice Research Institute, atual. 2007. Disponível em :http://www.knowledgebank.irri.org/ericeproduction/0.5_Rice_races.htm

IRRI - Strategic Plan 2017-2025. (2017).

IRRI - International Rice Research Institute, atual. 2019. Disponível em: <https://www.irri.org/golden-rice>

JECFA - Evaluation of certain food additives and contaminants : sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43870/9789241209472_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

JECFA - Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Em WHO Food Additives

JUAN, C. *et al.* - Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. Food Chemistry. . ISSN 03088146. 107:1 (2008) 525–530. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.019

KHOURY, André EL; ATOUI, Ali - Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. Toxins. . ISSN 2072-6651. 2:4 (2010) 461–493. doi: 10.3390/toxins2040461

KHUSH, G. S. - Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. Plant molecular biology. . ISSN 0167-4412. 35:1–2 (1997) 25–34.

KŐSZEGI, Tamás; POÓR, Miklós - Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. Toxins. . ISSN 2072-6651. 8:4 (2016) 111. doi: 10.3390/toxins8040111

LAI, Xianwen *et al.* - Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. Food Control. . ISSN 09567135. 50:2015) 401–404. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.029

LIM, Chee Wei *et al.* - Multi-Mycotoxin Screening Reveals Separate Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Asian Rice. Journal of Agricultural and Food Chemistry. . ISSN 0021-8561. 63:12 (2015) 3104–3113. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00471

MAHAN, K.; STUMP, S.; RAYMOND, J. - Krause - Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. ISBN 978-1-4377-2233-8.

MALIR, Frantisek *et al.* - Ochratoxin A: 50 Years of Research. Toxins. . ISSN 2072-6651. 8:7 (2016). doi: 10.3390/toxins8070191

- MARTINS, C. *et al.* - Exposure assessment of Portuguese population to multiple mycotoxins: The human biomonitoring approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. . ISSN 14384639. 222:6 (2019) 913–925. doi: 10.1016/j.ijheh.2019.06.010
- NGUYEN, M. *et al.* - Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*. . ISSN 03088146. 105:1 (2007) 42–47. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.040
- NOGUEIRA S, Oliveira MBPP - PREVALÊNCIA DE OCRATOXINA A EM ALIMENTOS E CONSEQUENTES PROBLEMAS DE SEGURANÇA ALIMENTAR. 12:2006) 69–75.
- NOVARROZ - novarroz, atual. 2020. Disponível em: <http://www.novarroz.pt/pt/mundo-do-arroz/arroz-em-portugal/3-historia-do-arroz-em-portugal>
- NOVARROZ - NOVARROZ - PRODUTOS ALIMENTARES, S.A., atual. 2020. [Consult. 14 abr. 2020]. Disponível em :<http://www.novarroz.pt/pt/variedades-de-arroz>
- O'BRIEN, Evelyn; DIETRICH, Daniel R. - Ochratoxin A: The Continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology*. . ISSN 1040-8444. 35:1 (2005) 33–60. doi: 10.1080/10408440590905948
- ONORIO, O. *et al.* - Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*. . ISSN 09567135. 22:8 (2011) 1184–1188. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.01.014
- PARK, Je Won *et al.* - Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*. . ISSN 01681605. 103:3 (2005) 305–314. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.001
- PATTONO, D.; GALLO, P. F.; CIVERA, T. - Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry*. . ISSN 03088146. 127:1 (2011) 374–377. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.051
- PENA, A. *et al.* - Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. . ISSN 1618-2642. 382:5 (2005) 1288–1293. doi: 10.1007/s00216-005-3254-9
- PEREIRA, L. - Estratégias para o controlo de Ocratoxina A em alimentos. [S.l.] : Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho, 2008 Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/7746/1/Tese de doutoramento.pdf>

PLEADIN, Jelka; FRECE, Jadranka; MARKOV, Ksenija - Mycotoxins in food and feed. Em *Advances in Food and Nutrition Research* Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452619300221>. p. 297–345.

RAHIMI, E. - The occurrence of ochratoxin A in rice in six provinces of Iran. *Toxicology and Industrial Health*. . ISSN 0748-2337. 32:7 (2016) 1324–1327. doi: 10.1177/0748233714560078

RASFF - RASFF, atual. 2019. [Consult. 1 set. 2020]. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>

Regulamento (CE) n.º 401/2006 da Comissão Europeia - (2006).

Regulamento (CE) N.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003.

Regulamento (CE) n.º 1881/2006. (06- Disponível em : <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF>

Regulamento (CEE) N.º 315/93 do Conselho. (93- Disponível em :<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31993R0315&from=PT>

Regulamento (UE) N.º 105/2010 da Comissão Europeia. (10- Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:035:0007:0008:PT:PDF>

Ricepedia -, atual. 2020. [Consult. 15 ago. 2020]. Disponível em :<http://ricepedia.org/culture/history-of-rice-cultivation>

RINGOT, Diana *et al.* - Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*. . ISSN 00092797. 159:1 (2006) 18–46. doi: 10.1016/j.cbi.2005.10.106

RITA, Serra - MICOFLORA DAS UVAS PORTUGUESAS E SEU POTENCIAL PARA A CONTAMINAÇÃO DAS UVAS COM MICOTOXINAS, COM DESTAQUE PARA A OCHRATOXINA A. [S.l.] : Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, 2005 Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2579/9/09-capitulo1.pdf>

RYU, Dojin *et al.* - Reduction of ochratoxin A in oats and rice by twin-screw extrusion processing with baking soda. *Food Control*. . ISSN 09567135. 105:2019) 21–28. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.05.014

SANGARE-TIGORI, B. *et al.* - Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002. *Human & Experimental Toxicology*. . ISSN 0960-3271. 25:4 (2006) 211–216. doi: 10.1191/0960327106ht605oa

SCHRENK, Dieter *et al.* - Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal*. . ISSN 18314732. 18:5 (2020). doi: 10.2903/j.efsa.2020.6113

SILVA, Daiani Maria Da - Fungos filamentosos e micotoxinas em uvas, sucos, mostos e vinhos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). (2013).

TANAKA, Kenji *et al.* - Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology*. . ISSN 01681605. 119:1–2 (2007) 59–66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.002.

TAO, Yanfei *et al.* - Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*. . ISSN 02786915. 112:2018) 320–331. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.002.

The Rapid Alert System for Food and Feed - 2018 Annual Report - (2019).

VAUGHAN, Duncan A.; LU, Bao-Rong; TOMOOKA, Norihiko - The evolving story of rice evolution. *Plant Science*. . ISSN 01689452. 174:4 (2008) 394–408. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.01.016

VEGA, Mario *et al.* - Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market. *Food Control*. . ISSN 09567135. 20:7 (2009) 631–634. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.09.014

WAGACHA, J. M.; MUTHOMI, J. W. - Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*. . ISSN 01681605. 124:1 (2008) 1–12. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008

WALTER, Melissa; MARCHEZAN, Enio; AVILA, Luis Antonio De - Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural*. . ISSN 0103-8478. 38:4 (2008) 1184–1192. doi: 10.1590/S0103-84782008000400049.

WASEEM, A. *et al.* - Human Exposure to Mycotoxins: A Retrospective Review of Leading Toxins and Metabolites in Human Biological Matrices. *J. Chem. Soc. Pakistan*. 36:2014) 1196–1214.

YOSHIDA, S. - Fundamentals of rice crop science

ZAIED, Chiraz *et al.* - Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food Control*. . ISSN 09567135. 20:3 (2009) 218–222. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.05.002

ZINEDINE, A. *et al.* - Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Additives and Contaminants*. . ISSN 0265-203X. 24:3 (2007) 285–291. doi: 10.1080/02652030600967230