



FURG

Dissertação de Mestrado

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO E ESTUDO DE OCORRÊNCIA DE
PATULINA EM FRUTAS DE CLIMA TEMPERADO**

Muriele Mateus do Pinho

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2014

VALIDAÇÃO DE MÉTODO E ESTUDO DE OCORRÊNCIA DE PATULINA EM FRUTAS DE CLIMA TEMPERADO

por

MURIELE MATEUS DO PINHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me proporcionar a satisfação de realizar meus sonhos e me dar força pra chegar ao final dessa etapa.

A minha orientadora, professora Dr. Eliana Badiale Furlong, por todo seu empenho, dedicação, pela sua generosidade em compartilhar seus conhecimentos, sua paciência em todos os momentos e principalmente pelo seu apoio. Bem mais que pela orientação, te agradeço pela confiança depositada em mim.

Aos meus pais, José Paulo e Fátima por todo o apoio, carinho, amor e investimentos depositados em mim. Agradeço por aceitarem as minhas escolhas e acreditarem no meu potencial. Esta conquista é de vocês é pra vocês. Obrigado as minhas irmãs Michele e Marcelle e meu irmão Pablo, pelo apoio e confiança. A toda a minha família pelo incentivo e carinho. Amo vocês!

Ao meu namorado Rafael, pelo apoio, dedicação e gestos de carinho.

A Renata, Adriana e a Luciana pela ajuda e amizade, a Elisa minha amiga e companheira de seminários, trabalhos e viagens. Se não fosse a ajuda dela teria sido muito mais difícil a minha caminhada, muito obrigado amiga pela sua força e dedicação.

As minhas amigas Carla e Bruna por fazerem parte da minha vida. Não tenho muitos amigos, mas os que tenho são mais que especiais, amo vocês!

Aos colegas do Laboratório, pela recepção e convívio, especialmente a Taiana pelas inúmeras vezes que me ajudou. A Jesus pelas suas palavras de motivação e apoio e a Anelise pela sua companhia agradável e suas risadas contagiantes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBÓLOS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1. Micotoxinas.....	5
3.2. Patulina.....	8
3.3. Preparo de amostra para determinação de patulina.....	11
3.3.1. Amostras sólidas.....	12
3.3.1.1. MSPD.....	12
3.3.1.2. QuEChERS.....	13
3.3.2. Amostras Líquidas.....	15
3.3.2.1. LLE.....	15
3.3.2.2. SPE.....	15
3.3.2.3. Métodos analíticos para determinação de micotoxinas.....	17
3.5. Frutas.....	18
3.5.1. Pêssego.....	19
3.5.1.2. Maçã.....	22
3.6. Caracterização físico-química.....	24

3.6.1. Umidade.....	24
3.6.2. Cinzas.....	25
3.6.3. Acidez total titulável e pH.....	25
3.6.4. Compostos fenólicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Material.....	27
4.1.1. Amostras.....	27
4.1.2. Solução padrão.....	27
4.1.3. Instrumentação.....	28
4.1.4. Solventes e reagentes.....	29
4.2. Estabelecimento das condições cromatográficas.....	30
4.2.1. Definição da fase móvel para eluição da PAT em HPLC-UV.....	30
4.2.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	31
4.2.3. Curva analítica e linearidade.....	31
4.2.4. Precisão do instrumento.....	31
4.3. Estabelecimento das condições de extração.....	32
4.3.1. Preparo de amostra para estudo da extração.....	32
4.3.2. Estudo das técnicas de extração.....	32
4.4. Validação do método oficial adaptado.....	35
4.5. Caracterização físico - química da maçã.....	36
4.5.1. Preparo de amostra para caracterização físico - química.....	36
4.5.2. Umidade.....	36
4.5.3. Cinzas.....	37
4.5.4. Acidez total titulável e pH.....	37
4.5.5. Determinação dos compostos fenólicos.....	38
4.6. Ocorrência de PAT em maçã e pêssego.....	38

4.7. Estimativa da distribuição de patulina em maçã e pêssego.....	39
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	40
5.1. Estabelecimento das condições cromatográficas.....	40
5.1.1. Definição da fase móvel para eluição da PAT em HPLC - UV.....	40
5.1.2. Limite de detecção e quantificação, curva analítica, linearidade e precisão.....	41
5.2. Estabelecimento das condições de extração.....	42
5.2.1. Estudo da recuperação do método MSPD, QuEChERS e A.O.A.C.....	42
5.3. Validação do método A.O.A.C adaptado.....	44
5.4. Caracterização físico – química da maçã.....	46
5.4.1. Umidade.....	46
5.4.2. Cinzas.....	47
5.4.3. Acidez total titulável e pH.....	47
5.4.4. Determinação dos compostos fenólicos.....	48
5.5. Ocorrência de PAT em maçãs e pêssegos.....	50
5.6. Estimativa da distribuição de PAT no suco e na polpa de frutas.....	52
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da micotoxina patulina.....	9
Figura 2. Passos típicos da extração por MSPD.....	13
Figura 3. Representação esquemática dos dispositivos empregados na SPE	16
Figura 4. Estrutura do pêsego.....	19
Figura 5. Estrutura da maçã.....	22
Figura 6. Cromatogramas da micotoxina patulina em HPLC-UV, utilizando quatro diferentes testes da fase movél.....	38
Figura 7. Curva analítica do padrão de PAT.....	41
Figura 8. Cromatograma da amostra de maçã contaminada com PAT.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais micotoxinas, espécies fúngicas, seus substratos preferenciais e seus efeitos tóxicos em humanos e animais.....	6
Tabela 2. Ocorrência de patulina em frutas, extração adotada, limite de quantificação e recuperação.....	10
Tabela 3. Modificações do método QuEChERS	14
Tabela 4. Composição do pêssego por 100 g de porção comestível.....	20
Tabela 5. Composição da maçã por 100 g de porção comestível.....	23
Tabela 6. Combinações de solventes para eluição em modo isocrático.....	28
Tabela 7. Variáveis estudadas para adaptação do método oficial a extração de PAT em maçãs.....	34
Tabela 8. Indicativos quantitativos para determinação da PAT.....	42
Tabela 9. R(%) e CV% dos métodos de extração MSPD, QuEChERS e A.O.A.C.....	43
Tabela 10. Valores de recuperação para PAT em amostras de maçã.....	45
Tabela 11. Indicativos de eficiência para as curvas analíticas na matriz e padrão.....	46
Tabela 12. Faixa de variação da composição das maçãs entre Julho e setembro.....	49
Tabela 13. Quantificação da PAT em amostras naturalmente contaminadas.....	50
Tabela 14. Distribuição da patulina na fração aquosa e resíduo sólido nas maçãs e nos pêssegos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN - Acetonitrila

A.O.A.C - Association of Official Analytical Chemistry

a_w - Atividade de água

CFL - Conteúdo fenólicos livres

CV (%) - Coeficiente de variação

DAD - Detector de arranjo de diodos

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO - do inglês “ Food and Agriculture Organization of the United Nations ”

FDA - Food and Drug Administration

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês Gas Chromatography

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês High - Performance Liquid Chromatography

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LLE - Extração Líquido - Líquido, do inglês Liquid- Liquid Extration

LODi - Limite de detecção do instrumento

LOQi - Limite de quantificação do instrumento

LOQm - Limite de quantificação do método

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MBTH - 3 - metil- 2- benzotiazolinona hidrazona

MSPD - Dispersão em Fase Sólida, do inglês “Matrix Solid Phase Dispersion”

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAT- Patulina

PSA - Ácido propil sulfônico

QuEChERS - do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

% R - Porcentagem de Recuperação

RSDpi - Precisão intermediária

RSDr - Repetibilidade

RSD - Erro Padrão relativo percentual

SEAB- Secretária de Estado da Agricultura e do Abastecimento

SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SECEX- Secretária de Comércio Exterior

SPE - Extração Líquido - Sólido, do inglês Solid Phase Extraction

TLC- Cromatografia em Camada Delgada, do inglês Thin Layer Chromatography

UV - Ultravioleta

RESUMO

Validação de Método e Estudo de Ocorrência de Patulina em Frutas de Clima Temperado

Muriele Mateus do Pinho

Prof. Dr. Eliana Badiale Furlong

As frutas frescas são susceptíveis a danos físicos, químicos e biológicos motivando a regulamentações comerciais rígidas quanto aos aspectos sanitários e fitossanitários da produção, o que acaba limitando a participação do Brasil no mercado internacional. O ataque de agentes patogênicos, com destaque para os fungos toxigênicos que além da degradação do tecido vegetal, podem produzir substâncias tóxicas, as micotoxinas. As micotoxinas são produzidas após a contaminação do material pelo fungo sob situações de estresse, decorrentes de condições ambientais, da composição e mecanismos de defesa do vegetal e de danos físicos da fruta. Os fungos do gênero *Penicillium*, da espécie *P. expansum*, cujo alvo preferencial são frutas ricas em açúcares redutores como a maçã e outras de clima temperado, são produtores de patulina, que afeta principalmente o fígado e o sistema urinário de humanos e animais. Neste trabalho foram avaliados métodos de extração e detecção de patulina em maçãs e pêssegos produzidos no Sul do Brasil. A composição química das frutas também foi determinada, visando relacioná-la com os níveis de contaminação. Foram estudados os métodos MSPD, QuEChERS e da A.O.A.C, que foi escolhido após modificações. Foram avaliados os indicativos de mérito como o LOQm ($0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) e a recuperação (87%). O método validado foi aplicado a levantamento de ocorrência da PAT em amostras de maçã e pêssego, dos quais foram determinados a composição centesimal e o teor de compostos fenólicos livres. Nas amostras analisadas de maçã (Gala, Golden delicious, Argentina e Fuji) os maiores teores foram encontrados nas amostras de variedade Golden ($173 \mu\text{g kg}^{-1}$), seguido pela Argentina (59 e $75 \mu\text{g kg}^{-1}$). Os pêssegos analisados (Molar e Amarelo) não apresentaram contaminação por PAT. Quanto a composição química não houve diferença marcante entre os componentes maiores das variedades analisadas. As maçãs Gala foram as mais ricas em compostos fenólicos livres. Avaliando a distribuição da patulina na polpa e no suco das maçãs e pêssegos contaminados artificialmente ficou demonstrado que na fração aquosa os teores de patulina foram menores que no resíduo sólido, enquanto o inverso foi verificado em pêssegos.

Palavras - chave: patulina; maçã; pêssego; A.O.A.C; HPLC-UV

ABSTRACT

Methods validation and occurrence study of Patulin in tempered weather Fruit.

Muriele Mateus do Pinho

Prof. Dr. Eliana Badiale Furlong

Fresh fruit are susceptible to physical, chemical and biological damages, thus, the need for strict sanitary and phytosanitary commercial laws arises. This limits Brazilian participation in foreign markets. Fruit products contamination with pathogens, specially with toxigenic fungi, may lead to not only the degradation of the vegetal tissue, but also to the production of toxic compounds, in the highlighted case, mycotoxins. Mycotoxins are produced after contamination by the fungi and under stressful conditions. Adverse condition may develop from unfavorable environmental conditions, defense mechanisms from the fruit organism and the compounds generated from it and from physical damage. Fungi from the gender *Penicillium* and species *P. expansum* are patulin producers. Their preferable target are reducing sugars rich fruits, such as apples and other tempered climate fruits. The patulin toxin affects the human and animal liver and urinary tract. In this work, patulin extraction and detection methods were evaluated for apples and peaches produced in southern Brazil. The fruits chemical composition was determinate in order to correlate it with contamination levels. The methods MSPD, QuEChERS and AOAC were studied and the last chosen after modifications. The merits figures evaluated were the LOQm ($0, 5 \mu\text{g kg}^{-1}$) and recuperation percent (87%). The AOAC methods adapted and validated was applied to a survey PAT occurrence in apple and peach samples, where the centesimal composition and the free phenolic compounds were determined. In the analysed apple samples (Gala, Golden delicious, Argentina and Fuji) the highest toxin levels were found in the Golden delicious variety ($173 \mu\text{g kg}^{-1}$). The analyzed peache samples (Molar and Amarelo) were not contaminated with patulin. Regarding the chemical composition, there were outstanding differences among the analyzed samples. Gala variety apples are richer in free phenolic compounds. The patulin distribution in pulp and juice from apples artificially contaminated demonstrated higher concentrations in the solid residue than in the aqueous portion. However, in the artificially contaminated peaches, the concentration behavior was the opposite.

Key words: patulin; apple; peach; A.O.A.C; HPLC-UV

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira é uma das bases da economia, devido a produção de cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e seus derivados para consumo interno e para a exportação. A grande extensão territorial, diversidade climática e a riqueza no solo, propiciam condições para diferentes cultivos, de frutas tropicais, subtropicais (Sudeste, Norte e Nordeste) e temperadas (Região Sul e Sudeste) (IBRAF, 2011).

O Brasil, depois da China e da Índia, é o terceiro maior produtor de frutas do mundo atingindo valores anuais de 41 milhões de toneladas, portanto uma atividade agrícola importante para o país (SEAB, 2010). No entanto, a porcentagem da produção nacional se destina ao consumo interno, pois o país ocupa 15ª posição no ranking dos maiores exportadores. Manga, maçã, uva, mamão, banana e limão se destacaram como os frutos mais exportados, com destaque para o crescimento do consumo das frutas tropicais e subtropicais no mercado internacional (FRESH PLAZA, 2009).

As frutas frescas são suscetíveis a danos físicos, químicos e biológicos o que leva a regulamentações comerciais rígidas quanto aos aspectos sanitários e fitossanitários da produção, o que também acaba limitando a participação do Brasil no mercado internacional, especialmente pela falta de condições adequadas para armazenamento e distribuição (MAPA, 2008).

Entre os danos que podem afetar o valor comercial e nutricional das frutas esta o ataque de agentes patogênicos que causam a deterioração e resultam em danos a aparência da fruta fresca. Os fungos estão entre os patógenos que atacam as frutas e se forem toxigênicos podem produzir compostos tóxicos denominados micotoxinas. Estas se ingeridas podem causar danos crônicos e agudos a saúde de humanos ou animais (WOROBO *et al.*, 2005).

Os efeitos agudos das micotoxinas são caracterizados por vômitos, diarreia, hemorragias e distúrbios gastrointestinais comuns a muitos contaminantes (HUSSEIN e BRASSEL, 2001). Os sintomas crônicos se caracterizam por danos ao sistema

nervoso, imunológico, renal até efeito carcinogênico, que dificilmente podem ser associados a um composto específico de forma clara (RICHARD, 2007).

Os fungos produtores de micotoxinas são encontrados nas mais diversas regiões do país e podem se desenvolver nos mais diversificados substratos sob condições de umidade, temperatura e pH próprios de cada espécie. Estas condições ótimas para o desenvolvimento fúngico podem ocorrer no campo, durante ou após a colheita, no armazenamento, especialmente se estas operações propiciarem danos físicos nos tecidos vegetais tornando-os mais vulneráveis ao patógeno (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Durante o armazenamento, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais prováveis de se instalarem nas frutas, enquanto que os do gênero *Fusarium* podem infectar as plantas no campo, pois são fitopatógenos (SWEENEY e DOBSON, 1998). Cerca de trezentas estruturas químicas tóxicas produzidas por fungos já foram isoladas e identificadas. As mais conhecidas, devido ao seu comprovado poder toxigênico e sua larga distribuição em diversos tipos de substratos são classificadas nas famílias químicas das aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, ergot, tricotecenos, zearalenona, citrinina e patulina, dentre outras. (PITTET, 1998; BENNETT et al, 2003; PATERSON et al., 2004; BLANC et al., 2005).

Cabe salientar que as espécies fúngicas possuem substratos preferenciais para se desenvolverem assim o gênero *Penicillium* tem as frutas como alvo e neste estão espécies toxigênicas produtoras de ocratoxina A e patulina. A primeira frequentemente encontrada em uvas e a outra em maçãs (SWEENEY e DOBSON, 1998). A patulina vem sendo empregada como indicador de qualidade nos produtos e derivados de maçã, pois a presença delas sugere que previamente os frutos foram contaminados com fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* ou *Byssochamys spp* (CELLI, 2009).

A espécie fúngica produtora de patulina é denominada *Penicillium expansum*, cujo substrato preferencial são as maçãs que também proporcionam as melhores condições para a manifestação do potencial toxigênico do fungo. Além da maçã, o *P.expansum* é encontrado em cerejas, pêssegos, uvas e pêras (JIMINEZ et al., 1991; PRIETA et al., 1994; LEGGOTT e SHEPHARD, 2001; DEMIRCI et al., 2003; RITIENI,

2003), mas ainda assim são poucas as informações sobre a ocorrência de patulina nestas frutas. Uma das possibilidades para esta susceptibilidade das maçãs a produção da micotoxina pelo fungo pode estar relacionada a própria composição química que promove condições de estresse ao micro-organismo e consequente manifestação do seu potencial toxigênico (JELINEK e HARSINGTON, 1989; MOAKE *et al.*, 2005).

Estudos são realizados em diversos países com a intenção de desenvolver métodos validados e eficazes na detecção e quantificação da micotoxina patulina. Uma técnica muito utilizada na determinação de patulina é a cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC - do inglês High Performance Liquid Chromatography*), com detecção por ultravioleta (UV) ou fotodiodos (DAD - do inglês *diode array detector*), além da cromatografia gasosa (GC - do inglês *Gas Chromatography*) a eletroforese capilar (CE - do inglês *Capilar Eletroforese*) e da cromatografia em camada delgada (TLC - do inglês *Thin Layer Chromatography*) (GOKMEN, 1999 e GOKMEN, 2005).

No Brasil apesar da expansão do cultivo de maçãs e de outras frutas de clima temperado e tropical são poucos os dados sobre a situação micotoxicológica delas, apesar deste ser um aspecto importante para a segurança de consumo interno e competitividade internacional. Dentre as causas para esta escassez de informações está à inexistência de legislação para esta micotoxina antes de 2012, além da própria dificuldade da determinação analítica, característica das propriedades químicas dela e das matrizes ricas em compostos interferentes.

Sendo assim, este estudo propôs a validação de um método analítico confiável para propiciar a verificação da incidência da micotoxina patulina em frutas sazonais produzidas na região sul do Brasil, tendo em vista contribuir para a estimativa do risco de ocorrência dela em frutas disponíveis para consumo *in natura*, associando a composição físico-química das frutas, visando associá-la a contaminação micotoxicológica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Adaptar e validar método para determinar a ocorrência de patulina em variedades de maçãs e pêssegos produzidos no Sul do Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Comparar técnicas para extração de patulina de maçãs (*Malus domestica*);
- ✓ Validar método para determinar a patulina e aplicá-lo a verificação de ocorrência em maçãs e pêssegos (*Prunus persica*) *in natura*;
- ✓ Avaliar a composição química de quatro variedades de maçã;
- ✓ Verificar a distribuição da patulina durante as operações de obtenção de suco e polpa de maçãs e pêssegos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Micotoxinas

As toxinas produzidas por fungos toxigênicos ganharam importância como contaminantes da alimentação humana e animal desde o acontecimento ocorrido na Inglaterra, no início da década de 60, quando mais de 100 mil perus morreram após ingerirem torta de amendoim. Este surto recebeu o nome de Doença “X” dos Perus, sendo mais tarde verificado que a causa era a presença de aflatoxina em um de seus ingredientes da ração, a torta de amendoim proveniente do Brasil (ASPLIN e CARNAGHAN, 1961). Diante desse fato, o interesse sobre as micotoxinas se tornou mais evidente no meio acadêmico e comercial, implementando a exploração do tema e o estabelecimento de legislação para evitar os danos decorrentes do consumo delas por humanos e animais.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos que manifestam o seu potencial quando submetidos a condições de estresse biótico e abiótico, tais como condições climáticas, susceptibilidade do hospedeiro e intensidade da contaminação fúngica. Estes metabólitos são moléculas relativamente pequenas que apresentam uma grande diversidade estrutural e variados efeitos biológicos em outros organismos (Tabela 1) (PEREIRA, 2008). Diferentes espécies fúngicas podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, bem como uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina (SONGSERMSAKUL *et al.*, 2008). Entretanto, sabe-se que nem todos os fungos são toxigênicos e nem todos os metabólitos secundários dos fungos são tóxicos, mas a presença deles em matrizes biológicas pode promover a degradação acelerada do tecido (HUSSEIN e BRASEL, 2001; KUMAR *et al.*, 2008).

As substâncias tóxicas produzidas pelos fungos toxigênicos podem entrar na cadeia alimentar por meio de contaminação direta ou indireta. De forma direta, quando ocorre o consumo de alimentos com a presença da micotoxina. Indiretamente, ocorre

pelo consumo de um tecido animal que foi alimentado com material contaminado (SABINO, 1996).

Tabela 1: Principais micotoxinas, espécies fúngicas produtoras, seus substratos preferenciais e seus efeitos tóxicos em humanos e animais.

Substratos	Fungos Produtores	Principal toxina	Efeitos
Amendoim e milho	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B ₁	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Trigo, aveia, cevada, milho e arroz	<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina	Nefrotóxica para suínos
Centeio e grãos em geral	<i>Claviceps purpúrea</i>	Ergotamina	Gangrena e convulsões
Milho	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisinias	Câncer de esôfago
Cevada, café e vinho.	<i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina A	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Frutas e sucos de frutas	<i>Penicillium expansum</i> e <i>Penicillium griseofulvum</i>	Patulina	Toxicidade vagamente estabelecida
Milho, cevada, aveia, trigo e centeio	<i>Fusarium sp</i> , <i>Myrothecium sp</i> , <i>Stachybotrys sp</i> , <i>Trichothecium sp</i>	Tricotecenos: T2, neosolaniol, fusarenona x, nivalenol, deoxinivalenol	Hemorragias, vômitos e dermatites.
Cereais	<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Masculinização e feminização em suínos.

Fonte: Adaptado de Pereira, 2008.

Para os fungos se desenvolverem e produzirem micotoxinas são necessárias condições favoráveis de temperatura, umidade e pH. (PEREIRA *et al.*, 2002). A

presença do fungo no alimento não implica necessariamente na produção da micotoxina, assim como a remoção do fungo toxigênico não implica na eliminação da toxina. (DINIZ, 2002).

O gênero *Fusarium* é encontrado contaminando principalmente os cereais no campo, especialmente nos tecidos, com atividade de água superior a 70%. Dentre as toxinas de *Fusarium* encontram-se as fumonisinas cujo efeito tóxico em humanos ainda são inconclusivos, mas que pode estar relacionado ao câncer de esôfago (PITT, 2000). Outras constituem a classe dos tricotecenos, um grupo de mais de cem micotoxinas, englobando toxinas de quatro grupos, sendo os mais frequentes em alimentos os do tipo A, tais como: toxinas T-2, HT-2 e do tipo B, na qual está o desoxinivalenol. Tricotecenos de ambos os grupos estão associados a alterações no sistema imunológico e neurológico (RICHARD, 2007).

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são fungos classificados como de armazenamento, pois contaminam cereais após a colheita e secagem. Eles são produtores de aflatoxinas, frequentemente são encontradas em cereais, café e pão como decorrência da contaminação prévia com o fungo e posterior manifestação do potencial toxigênico quando o microclima ao redor começa a ser alterado pela própria atividade respiratória dos grãos (BENNET, 2003).

A ingestão de alimentos que contendo micotoxinas pode resultar em efeitos danosos sobre a saúde animal e humana (BENNET, 2003 e SHEPHARD, 2008), conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo (HUSSEIN e BRASEL, 2001). As micotoxicoses podem ser do tipo primário ou secundário, que pode ser mais difícil de identificar, devido aos baixos níveis de toxinas na amostra e ainda por não produzirem um quadro clínico de sintomas específicos. Em geral elas promovem um aumento de suscetibilidade a infecções intercorrentes devido à imunossupressão ocasionada pelo contaminante, além da ocorrência de hemorragias e necroses teciduais. Muitas destas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso os mais atingidos (BENNET, 2003).

O efeito de uma micotoxina depende da dose e da frequência com que é ingerido, sendo esse efeito agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápida, podendo levar à morte, porque causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado de doses menores que provocam distúrbios e alterações em órgãos de humanos e de animais (BENNETT, 2003; MURPHY *et al.*, 2006; SHEPHARD, 2008). O efeito das micotoxicoses é irreversível ainda que deixe de haver exposição a micotoxina (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

3.2. Patulina

Em 1940 foi isolada a patulina, inicialmente designada por clavacina, claviformina, clavatina, ácido gigante, expansina ou miocina C (WOROBO *et al.*, 2005). Em função de sua ação antibiótica levantou-se a possibilidade dela possuir ação inibitória a diferentes espécies de bactérias, mas novas evidências mostraram que sua toxicidade não afetava apenas as bactérias e os fungos, mas também a animais e plantas, sendo assim o seu uso suspenso como agente bactericida e fungicida (KUMAR *et al.*, 2008).

A patulina possui na sua estrutura uma lactona insaturada (4 - hidroxí-4H furo [3,2-c] piran-2(6H) ona) que a torna altamente reativa, cuja fórmula e massa molecular são $C_7H_6O_4$ e $154,12 \text{ g mol}^{-1}$ respectivamente. Ela é solúvel em água e em solventes orgânicos polares como: etanol, éter, acetona, acetato de etila; insolúvel em benzeno e éter de petróleo. Esta micotoxina apresenta estabilidade em ácidos diluídos e é resistente à temperatura de 125°C numa faixa de pH entre 3,5 e 5,5. Sua atividade biológica é reduzida quando submetida a reações com compostos sulfurosos, representados por metabissulfito e radicais sulfidrilas (UGWUANYI *et al.*, 1999; MOAKE *et al.*, 2005). A sua atividade carcinogênica é atribuída à insaturação α , β , junto com uma dupla ligação conjugada externa, unida na posição 4 do anel lactona que proporciona a formação de adutos com ácidos nucleicos (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 2001; MAJERUS e KAPP, 2002; MOAKE, PADILLA-ZAKOUR e WOROBO, 2005). (Figura 1).

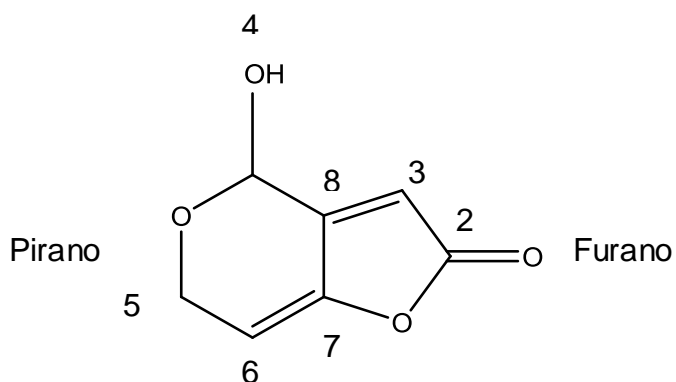


Figura 1: Estrutura da micotoxina patulina.

A patulina é um metabólito secundário produzido principalmente pelo fungo *Penicillium expansum*, um contaminante comum de maçãs e outras frutas. O fungo se desenvolve nas porções das frutas danificadas mecanicamente ou por pragas, especialmente quando ocorre o apodrecimento demonstrado pela coloração azulada na parte externa da fruta e bege ou marrom-clara na polpa, deixando o tecido amolecido. O dano físico na fruta promove condições de atividade de água (a_w) que é favorável ao desenvolvimento do fungo, que requer uma atividade de água entre 0,83 a 0,99. Além disso, fungos do gênero *Penicillium* sobrevivem em altas pressões osmóticas como as que podem ocorrer nas frutas (KUMAR, 2008).

Outras espécies de *Penicillium* são relatadas como produtoras de patulina, dentre elas: *Penicillium cyclopium*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium griseofulvum* (KUMAR, 2008), bem como outros gêneros de fungos presentes em alimentos, tais como: *Aspergillus* e *Byssochlamys spp*, estão associados a produção da micotoxina pela via do policetídeo. A patulina causa efeitos teratogênicos e cancerígenos em animais, além de lesões pulmonares, hepáticas e renais, efeitos gastrointestinais, neurotóxicos e imunotóxicos (MAJERUS e KAPP, 2002; MOAKE *et al.*, 2005). Para humanos os estudos são inconclusivos, mas sugerem efeitos agudos como: agitação, convulsões, edema, ulceração, hiperemia, distensão gastrointestinal, hemorragia intestinal, degeneração de células epiteliais, inflamação intestinal, vômitos e danos nos rins (CARLTON e BOON, 1982; MAHFOUD *et al.*, 2002).

A maçã é a fruta mais frequentemente relatada como contaminada com patulina, embora ela já tenha sido detectada em uvas, cerejas, morangos, pêssegos, ameixas, tomates, bananas, amêndoas, amendoins e avelãs (WOROBO, 2005). Normalmente a micotoxina é encontrada em altas concentrações na parte da fruta onde há presença de esporos fúngicos (93 a 95% de toda toxina detectada), difundindo-se para outras partes sadias do fruto devido sua hidrossolubilidade (BARKAI - GOLAN e PASTER, 2008). Na Tabela 2 estão listados alguns registros de ocorrência de patulina em frutas, bem como as performances dos métodos empregados.

Tabela 2: Ocorrência de patulina em frutas, extração adotada, limite de quantificação e recuperação, usando método da A.O.A.C.

Amostras/nº amostral	Faixa de Contaminação	LOQ %R	Autor/Local
Suco de maçã (37)	(21 – 207 $\mu\text{g L}^{-1}$)	0,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ 95%	Sargentil/2010
Suco de maçã (16)	(50,100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$)	14 $\mu\text{g L}^{-1}$ 96,93 e 96%	Welke/2008
Suco de maçã (100)	-	2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 80%	Arbizu/2009
Maças (Purê)	(15 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	5 $\mu\text{g k}^{-1}$ 81, 98%	Janotová/2010

LOQ - limite de quantificação

%R - porcentagem de recuperação

A ocorrência de micotoxinas em frutas não é um problema apenas de países em desenvolvimento, elas influenciam o agronegócio mundial, pois afetam a viabilidade de exportação e importação das frutas. Além disso, o consumo de alimentos contaminados reduz a produção animal e agrícola, e em alguns países, atingem também, a saúde humana em função dos hábitos e estado nutricional (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, 2009). Na Europa e nos EUA a preocupação com esse problema deu origem à implementação de níveis máximos para conteúdo de patulina em derivados de maçã (WOROBO, 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em associação com a *Food and Drug Administration* (FDA) aconselha

um máximo de ingestão diária de patulina de $0,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ de massa corporal (WHO, 1995).

A União Europeia adotou $50 \mu\text{g L}^{-1}$ como limite máximo para sucos de maçã e derivados, estabeleceu para produtos sólidos como compotas e purês de maçã o limite máximo de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para produtos destinados a crianças e lactantes (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, 2009). A legislação para esta micotoxina é recente no Brasil e está estabelecido pela RDC nº 7 de 2011, da ANVISA, que limita em um máximo tolerável de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para suco e polpa de maçã.

A implementação de limites máximos para produtos alimentares a base de maçã veio demandar por um controle de qualidade mais exigente, de onde surgiu à necessidade de se desenvolver métodos eficientes para detectar a micotoxina na matéria prima e seus derivados, que sejam confiáveis, acessíveis e gerem o mínimo de resíduos. Os métodos eficazes, que geralmente envolvem a cromatografia em camada delgada (TLC), a pioneira e a mais simples (SILVA, 2007) ou a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que é a mais utilizada na determinação de patulina (GOKMEN *et al.*, 2005). O emprego da cromatografia gasosa (GC) não é uma rotina na análise de patulina visto a dificuldade para a derivação química necessária para torná-la volátil (SHEPHARD, 2000; WOROBO *et al.*, 2005; MOUKAS *et al.*, 2008).

3.3. Preparo de Amostra para Determinação de Patulina

O processo de preparação da amostra é uma das etapas mais importantes na determinação de patulina em alimentos, da mesma forma que para outros analitos presentes em baixas a nível de $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou ng kg^{-1} (MAJORS, 1991). Para a seleção de método de extração para analitos traços, é importante a escolha de procedimentos rápidos, com poucas etapas, capazes de produzir recuperações quantitativas e reprodutivas do analito (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Em geral o preparo de amostras inicia pela utilização de solventes que extraem o analito da matriz em função da afinidade (K_w) com o extratante. Os solventes comumente usados para extração de micotoxinas são: clorofórmio, acetona, metanol,

acetonitrila, benzeno, acetato de etila, hexano e água, para patulina o solvente de extração mais utilizado é o acetato de etila, visto que ela está entre as micotoxinas mais polares (JAIMEZ *et al.*, 2000).

O contato do solvente com o analito para extraí-lo precisa ser facilitado por procedimentos prévios. Assim, por exemplo, em amostras sólidas como a maçã o corte, a separação de porções comestíveis e homogeneização são determinantes para a recuperação da micotoxina dos interstícios celulares (RIDGWAY *et al.*, 2007).

Entre as técnicas de extração utilizadas para micotoxina patulina em amostras sólidas estão: MSPD (do inglês “matrix-solid phase dispersion”- dispersão da matriz em fase sólida), QuEChERS (do inglês quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) e para amostras líquidas, as técnicas utilizadas são: LLE (do inglês liquid-liquid extraction - extração líquido - líquido) , SPE (do inglês solid - phase extraction: extração Líquido-Sólido) e partição com acetato de etila (JIAN-HE, 2007; RI-NA, 2008, DESMARCHELIER, 2011).

3.3.1. Amostras Sólidas

3.3.1.1. MSPD

A dispersão da matriz em fase sólida - MSPD, desenvolvida para amostras sólidas e semisólidas (BARKER *et al.*, 2000). No caso de alimentos, onde o estado físico não é facilmente caracterizado aplica-se a amostras com atividade de água baixa e moderada (entre 50 e 80%). Essa técnica tem como característica principal usar pequenas quantidades de amostras, baixo consumo de solventes orgânicos, permite a realização da extração numa única etapa de *clean-up*, os equipamentos são simples, o que torna rápida e de baixo custo (ROACH *et al.*, 2000; GASPAR *et al.*, 2009).

Na prática a técnica consiste em macerar a amostra e o adsorvente (C18, C8 sílica, alumina e outros) até obter uma mistura homogênea; transferir a mistura pastosa para um cartucho contendo um filtro de vidro, recobrir com lã de vidro e acoplar o cartucho a um frasco coletor e realizar a eluição por gravidade ou com pressão. O extrato pode ser levado diretamente para a determinação ou passar por mais uma

etapa de limpeza (LANÇAS, 2004). Na Figura 2 encontra-se o esquema dos passos típicos da técnica.

A técnica MSPD-HPLC-UV foi utilizada para a determinação da patulina em amostras de maçã e suco concentrado de maçã, promovendo uma recuperação de (89-103%) e (85-98%) (RI-NA, 2008).

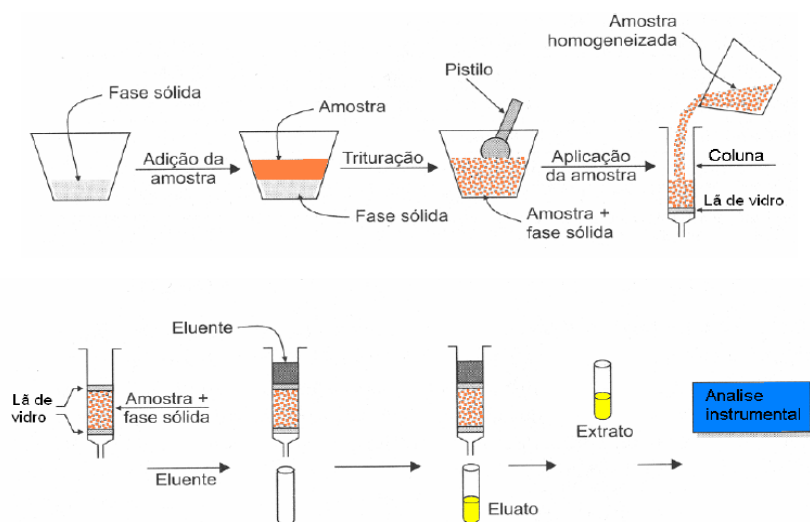


Figura 2: Passos típicos da extração por MSPD, Barker, 2000.

3.3.1.2. QuEChERS

ANASTASSIADES *et al.* 2003, introduziram uma nova técnica de preparo de amostra para a extração de multirresíduos, principalmente para análise de resíduos de pesticidas, denominada QuEChERS. Ela consiste na extração manual da amostra na proporção 1:1 com acetonitrila, acrescentar sais e adsorvente para facilitar a extração e para a limpeza da amostra. A técnica vem se destacando pelas suas vantagens: rapidez, facilidade de manuseio, economia, eficiência, robustez e segurança. Para atender as características necessárias para a extração do analito, pode-se modificar o pH do solvente extrator, aplicar outras misturas de solventes e diferentes tipos de sorventes na etapa de limpeza. Na Tabela 3 estão especificadas algumas modificações das proporções de amostra - solvente, sais e adsorvente que vem sendo realizadas

para propiciar a recuperação de analitos contaminantes aproveitando os benefícios do fundamento da técnica.

Tabela 3: Modificações do método de QuEChERS

QuEChERS (Original)	QuEChERS (Acetato)	QuEChERS (Acidificado)
10 g de amostra	15 g de amostra	15 g de amostra
10 mL de ACN	15 mL de ACN	10 mL de ACN e 1% ácido acético
4 g MgSO ₄	6 g MgSO ₄	6 g MgSO ₄
1 g NaCl	1,5 g CH ₃ COONa	1,5 g CH ₃ COONa
1 mL de extrato + 150 mg de MgSO ₄ +25 mg de PSA	1 mL de extrato + 150 mg de MgSO ₄ +50 mg de PSA	1 mL de extrato + 150 mg de MgSO ₄ +25 mg de PSA

Fonte: Prestes *et al.*, 2011

Um exemplo de aplicação deste método para extração de patulina em amostras de pêra foi descrito por Desmarchelier, 2011 e consistiu numa extração com acetonitrila (solvente extrator), seguido de uma etapa de particionamento (adição de MgSO₄ e NaCl), etapa que tem como função promover o efeito *salting out*, ou seja separar a fase orgânica da fase aquosa e transferir as substâncias polares para a fase orgânica e posterior etapa de *clean-up* com SPE dispersiva (adição de MgSO₄ e PSA). A faixa de recuperação obtida variou entre 94-104% com repetibilidade e reprodutibilidade 7,5% 13%, respectivamente.

3.3.2. Amostras Líquidas

3.3.2.1 LLE

A maioria dos métodos utiliza como preparação de amostra a LLE baseado na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, orgânica e aquosa, em que a eficiência da separação é determinada pela solubilidade do analito no solvente de extração, pela razão de fases e pelo número de extrações (IHA e SABINO, 2006; GOKMEN, 1998 e SEWRAN, 2000). Assim pelo menos em teoria não é possível esperar extrações com recuperação de 100%. A eficiência da extração LLE vai depender de fatores como pH, complexação e concentração salina, que devem ser ajustadas para aumentar a solubilidade do analito na fase extratora, elevando o coeficiente de partição (SNYDER *et al.*, 1997).

A LLE tem sido utilizada por diversos autores para preparação de amostra para a determinação de patulina em amostras líquidas, sucos de frutas ou bebidas fermentadas (SHEPHARD e LEGGOTT, 2000; GOKMEN e ACAR, 1996, 1999; SEWRAM *et al.*, 2000). Um desses estudos foi realizado na China em 2008, utilizou cerca de 5 g de amostra de maçã com 10 mL de água seguida por três partições com 25 mL de acetato de etila, após agitação em vórtex durante um minuto. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com carbonato de sódio 1,5%. Em seguida foram adicionadas cinco gotas de ácido acético glacial. Por fim a solução foi evaporada em banho maria a 40 °C e o resíduo foi imediatamente dissolvido em 1 mL de solução tampão e injetados no HPLC-UV. A faixa de recuperação obtida foi entre 82 -91%, com LOQ (0,70 µg L⁻¹).

3.3.2.2. SPE

A SPE é uma técnica de separação onde os analitos a serem extraídos são particionados entre uma fase sólida e uma fase líquida, sendo que é necessário buscar combinações que propiciem maior afinidade dele com a fase sólida (LANÇAS, 2004).

A SPE é majoritariamente utilizada para preparar os extratos de amostras líquidas ou analitos semivolátil, mas pode ser também utilizada para os sólidos pré-

extraídos em solventes (LANÇAS, 2004; PAVLOVIC *et al.*, 2007). Essa técnica utiliza os mesmos materiais adsorventes empregados na cromatografia líquida, dentre os quais se destacam os derivados de sílica C8, C18 (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Este método foi utilizado para extração de patulina em amostras de maçã in natura comercializadas em Portugal empregando cartuchos C18 pré- lavados com 10 mL metanol, 3 mL da mistura metanol: água (10% em metanol) e 3 mL água ultrapura acidificada com ácido perclórico (100: 0,01 v/v), lavando 0,5 mL de amostra numa vazão de 2-3 mL min⁻¹ com 0,5 mL água acidificada. A eluição foi realizada 3 vezes com 1 mL de metanol. Os eluatos foram combinados e secos a vácuo, depois ressuspenso em água acidificada (0,5 mL) e analisados em HPLC-DAD (JIAN- KE, 2007). A recuperação média encontrada foi de 82% com um desvio padrão para repetibilidade de 1,2% e de reprodutibilidade de 2,2%. Na Figura 3 encontra se um esquema de um conjunto de materiais utilizados na extração SPE.

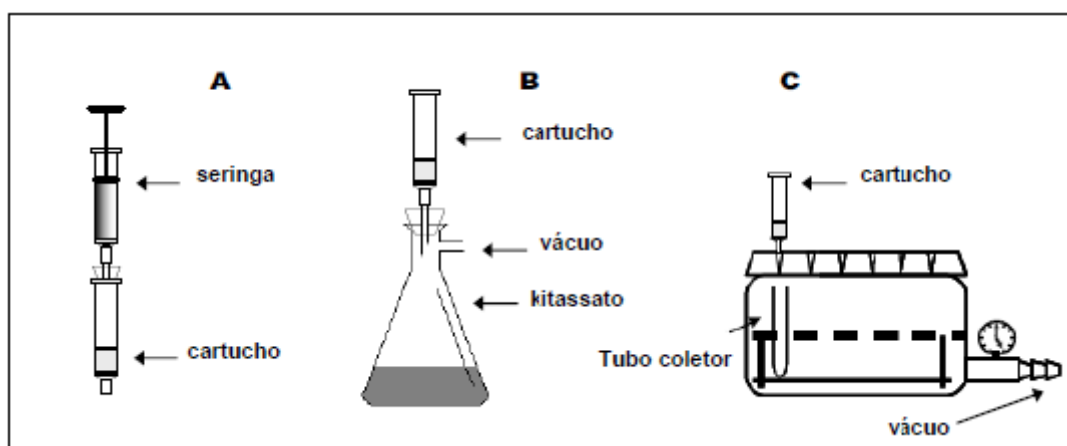


Figura 3: Representação esquemática dos dispositivos empregados na SPE (SNYDER *et al.*, 1997).

3.3.2.3. Método Oficial - A.O.A.C

O método oficial da A.O.A.C (*Association of Official Analytical Chemistry*) é utilizado na extração de amostras sólidas e líquidas e consiste na partição do analito entre duas fases conforme o coeficiente de partição. Este é o método mais frequentemente empregado no levantamento de ocorrência de patulina em amostras de frutas. O método emprega a extração com acetato de etila (1:8 p/v), o emprego de sais

para clarificação e remoção de água respectivamente (CaCO_3 e NaSO_4), seguido de limpeza em coluna de sílica - gel, juntamente com a agitação em vórtex a cada etapa de extração. Empregando este método foi realizado um levantamento de ocorrência de PAT em 16 amostras de suco de maçã provenientes do Rio Grande do Sul. Estando todas as amostras contaminadas ($56 - 653 \mu\text{g L}^{-1}$), considerando um LOQ ($14 \mu\text{g L}^{-1}$) e a recuperação de patulina em suco de maçã concentrado fortificados com 50, 100 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ foi de 93, 96 e 96%, com desvio para a repetibilidade de 4,9, 3,6 e 8,7, respectivamente, para estas concentrações (WELKE *et al.*, 2009).

3.4. Métodos Analíticos para Determinação de Micotoxinas

Para o controle e o monitoramento eficiente dos alimentos susceptíveis à contaminação por micotoxinas, os laboratórios devem dispor de técnicas analíticas com sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de uso, além de exatidão e precisão. Entretanto, a obtenção de resultados confiáveis para micotoxinas não é tarefa fácil, devido as baixas concentrações delas nos extratos, a ocorrência aleatória do contaminante usualmente acompanhado de interferentes como lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos que demandam por uma fase ou mais de limpeza na etapa de preparo de amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

As razões para o interesse na determinação confiável de micotoxinas são: o controle e monitoramento da qualidade de fontes alimentares, a ocorrência das micotoxinas em alimentos que gera a necessidade estimar a exposição durante o consumo de produtos potencialmente contaminados, e o cumprimento da legislação. A avaliação da descontaminação e detoxificação, para maior compreensão do seu destino durante o processamento de grãos, bem como estudo do metabolismo de produção fúngica são outras aplicações para as quais se determina o contaminante.

O método pioneiro para identificação e quantificação da patulina é a cromatografia em camada delgada que ainda é um dos métodos oficiais da Associação Oficial dos Químicos Analíticos (A.O.A.C), desde 1999. Este método envolve a extração da micotoxina com acetato de etila seguido por detecção em placas de sílica-gel, após revelação com 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH). A patulina após a derivação é visualizada como uma mancha amarela sob luz visível e fluorescente

amarelo-laranja sob um comprimento de onda UV (366 nm) (SHEPHARD e LEGGOTT, 2000). A dificuldade em distinguir pequenas diferenças de fluorescência nas placas, a subjetividade envolvida no método, acarretaram a necessidade de métodos mais precisos e sensíveis, como cromatografia líquida de alta eficiência ou a cromatografia gasosa, dentre outros.

A determinação de patulina em HPLC acoplada a detector ultravioleta (UV) ou fotodiodos (DAD) são bastante utilizados na quantificação, pois se trata de um composto muito solúvel em água, relativamente polar e com um espectro de absorção característico a 276 nm (GOKMEN, 1999 e GOKMEN, 2005). A A.O.A.C a partir de 1999 recomenda também como método para identificação e determinação de patulina o HPLC-UV cujo limite de detecção é $5 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando como preparação de amostra a extração líquido-líquido (SHEPHARD e LEGGOTT, 2000 e WOROBO, 2005).

A cromatografia gasosa é pouco utilizada para patulina porque a derivação é uma etapa crítica que pode diminuir a precisão e a exatidão da determinação. As determinações empregadas com GC são realizadas após a formação de um derivado (sililado) utilizando espectrometria de massa com ionização por impacto de elétrons ou usando detecção por captura eletrônica. (SHEPHARD e LEGGOTT, 2000; WOROBO *et al*, 2005; MOUKAS *et al.*, 2008).

3.5. Frutas

Entre os alimentos preferidos ou recomendados, seja como fonte de vitaminas, minerais para a manutenção e prevenção de doenças, estão às frutas. Diante da importância da ingestão de frutas diariamente, os consumidores têm se tornado cada vez mais exigente quanto à qualidade do produto. Não apenas a aparência, forma e uniformidade são buscadas, como também aspectos sensoriais, potencial nutritivo, e principalmente a segurança alimentar do produto, relacionado a presença de contaminantes químicos e biológicos (AZZOLIN, 2002; TIBOLA e FACHINELLO, 2004).

Apesar dos benefícios derivados de uma alimentação rica em frutas, a segurança de produtos frescos e minimamente processados tem sido discutida como

veículo de algumas doenças, em razão da incidência de microrganismos patogênicos (CARVALHO, 2003).

3.5.1. Pêssego

O pêssego (*Prunus persica*) pertencente à família *Rosaceae*, conhecidos como "frutos com caroço", o que se encontra envolvido por um endocarpo duro, sendo o mesocarpo a porção comestível (Figura 4). O pêssego quando maduro é turgido de cor verde amarelada e aroma característico que promovem a preferência para este fruto. (MEDEIROS e RASEIRA, 1998).

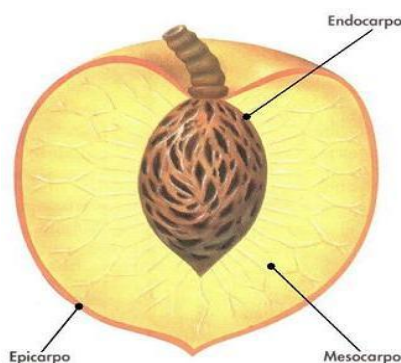


Figura 4: Estrutura do pêssego.

Fonte: <http://www.fotosearch.com.br>

Os pêssegos podem ser classificados de acordo com a sua finalidade de consumo. Os frutos produzidos para o consumo *in natura* são denominados pêssegos de mesa, que apresentam uma coloração de casca amarela, com 40 a 80% de vermelho, polpa não aderente ao caroço e com grande variação na acidez e doçura em função da variedade e do estágio de maturação (BIASI *et al.*, 2004). Os cultivares produzidos para conserva geralmente apresentam epiderme amarela, de polpa firme e aderente ao caroço, sempre mais amarelada e ácida do que as de mesa (RASEIRA e NAKASU, 1998).

A maior produção mundial se concentra na China, com cerca de 30% da oferta seguida da Itália e dos Estados Unidos (FAO, 2010). O Brasil ocupa a 12^o posição

entre os países produtores do mundo, e o terceiro maior produtor da América do Sul, ficando atrás apenas do Chile e da Argentina (FAO, 2009).

Tabela 4: Composição do pêssigo por 100 g de porção comestível

Pêssegos - Fração	Valor (g⁻¹100g)
Umidade (%)	89,3
Proteínas	0,8
Carboidratos	9,3
Fibra alimentar	1,4
Fração	Valor (mg⁻¹100g)
Lipídios	0,1
Cálcio	3,0
Fósforo	15
Ferro	0,2
Potássio	124
Vitamina C	3,3

Fonte: Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia - IBGE, 2009

A temperatura é um fator muito importante para a produção de pêssigos de melhor qualidade, por isso nem todas as regiões conseguem produzir uma fruta de boa qualidade (HERTER; SACHS e FLORES, 1998). Sendo assim os principais centros de abastecimento nacional da fruta se concentram nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. O período de oferta inicia em setembro com a produção paulista e conclui em fevereiro com a produção gaúcha (EMPRAPA, 2005).

O Rio Grande do Sul é o principal produtor (94 mil toneladas), com cerca de 50% da produção nacional, seguido por São Paulo (38 mil t.) (AGRIANUAL, 2010). Toda a produção nacional de pêssigo se destina ao mercado interno. No estado do Rio Grande do Sul a grande parte da produção gaúcha é destinada à indústria de conserva. Em São Paulo, a produção de pêssigos destina-se ao consumo *in natura*, onde se adequam melhor os cultivares precoce. (MADAIL, 2003; ZANETTE e BIASI, 2004).

A qualidade do pêssego é avaliada pelo consumidor pela interação das características físicas como tamanho, forma, cor do fruto e textura da polpa, por características químicas como sólidos solúveis (principalmente os açúcares) e acidez e por características sensoriais como sabor, aroma e suculência. Nos pêssegos, o componente em maior quantidade é a água, seguida dos carboidratos que constituem até 11% do fruto. Os minerais e vitaminas representam menos de 1% da parte comestível (TORALLES, 2005).

Os lipídios que constituem a membrana citoplasmática aparecem em valores traço, assim como as proteínas, que são ricas em aminoácidos neutros alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, prolina, treonina e serina que perfazem em torno de 60% do total (LUH, 1980).

Pêssegos são ricos em potássio, fósforo e cálcio, a vitamina encontrada em maior quantidade no pêssego é a vitamina C com aproximadamente 6 mg por 100 g de fruto, seguida da niacina e da vitamina A (MAHAN e ESCOTT- STUMP, 1999)

Os compostos fenólicos presentes no pêssego tem sua funcionalidade na qualidade do produto fresco e processado, estando envolvido com a cor do exocarpo, escurecimento enzimático, a adstringência do mesocarpo e com escurecimento não enzimático que ocorre em certos cultivares de pêssego quando processadas termicamente (SAINZ, 2006).

A qualidade dos pêssegos está associada a composição química e a aparência física. No entanto, o valor nutricional pode ser alterado pela contaminação da fruta, o que é bastante relevante considerando o custo de produção associado a perecibilidade dele (PENTEADO, 1986).

3.5.2. Maçã

A maçã é um dos frutos mais cultivados e mais conhecidos do gênero *Malus*, pertencente à família Rosaceae (Figura 5). As frutas crescem em árvores de folha caduca que florescem na primavera e produzem o fruto no outono. De coloração vermelha ou verde, podendo apresentar pequenas manchas esverdeadas ou

amareladas no período de fevereiro a abril. O cultivo da maçã ocorre preferencialmente em regiões onde o clima é temperado, solo sílico argiloso e profundo (LUBY, 2003).

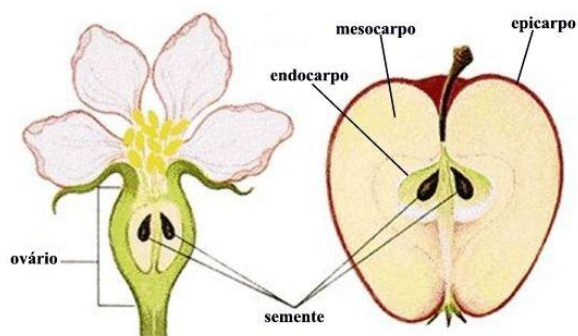


Figura 5: Estrutura da maçã.

Fonte: <http://www.fotosearch.com.br>

Conforme o último dado consolidado pelo IBGE, no Brasil em 2011, foi produzido 1,3 milhões de toneladas de maçãs, o que o classifica como 9º maior produtor mundial. A maior produção mundial de maçã se concentra na China, segundo a FAO, o país produziu 30 milhões de toneladas da fruta em 2008, seguido dos Estados Unidos e da Itália. Na América do Sul os principais produtores são Chile, Argentina seguida do Brasil. Muito bem adaptadas aos climas regionais brasileiros, especialmente do Sul e do Sudeste do país, onde os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná são responsáveis pela quase totalidade do volume produzido (IBGE, 2011).

A produção brasileira ocupa 38 mil hectares dos quais 96% desses pomares estão em Santa Catarina (18 mil ha) e Rio Grande do Sul (17 mil ha), com destaque para os municípios de Vacaria, Bom Jesus e Caxias do Sul (SCP, 2009).

Algumas das variedades mais cultivadas no Brasil são: Gala (tipo precoce, vermelho claro, com tamanho médio e sabor doce) e Fuji (que é mais tardia de cor rajada e a que mais suporta conservação em câmaras frias). Outras cultivares plantadas são: Eva, Golden Delicious, Brasil, Anna, Condessa, dentre outras, essas variedades possuem baixa exigência de frio, o que as torna recomendáveis para plantio em regiões mais quentes. Em suas variedades, os frutos da macieira podem ser distinguidos e agrupados por suas qualidades, sabor, tamanho, forma, aparência e consistência da polpa, e por suas distintas utilidades. Após essa separação as maçãs

são destinadas ao consumo in natura, ou destinadas à fabricação de produtos tais como: suco, sidra, vinagre, álcool, geléias, compotas e doces (SEBRAE).

As variedades Fuji e Gala vêm conquistando a preferência, além de serem ricas em nutrientes, como vitaminas do complexo B e vitamina C (4,6 mg), além do mineral potássio (107 mg). Além disso, sua composição de fibras, principalmente da pectina, fornece aproximadamente 10% das necessidades diárias de fibras. São encontrados açúcares como: a frutose (em maior proporção), a sacarose e a glicose. Os teores de proteínas da maçã são baixos. São baixos também os teores de lipídios, estando estes associados a camadas protetoras das células e da epiderme dos frutos. Quanto aos ácidos orgânicos, predomina o ácido málico, juntamente com os açúcares, ésteres e aldeídos é o principal elemento responsável pelo aroma e sabor característico da maçã (CÓRDOVA, 2006).

Tabela 5: Composição da maçã por 100 g de porção comestível

Maçã - Fração	Valor (g⁻¹100g)
Água (%)	84
Proteínas	traço
Carboidratos	15
Fibra alimentar	1,3
Maçã - Fração	Valor (mg⁻¹100g)
Lipídios	0,2
Sódio	0,4
Ferro	0,1
Potássio	75
Vitamina C (mg)	2,0

Fonte: Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia - IBGE, 2009

Diante da importância comercial da maçã para o Brasil, torna-se essencial a constante avaliação do produto para garantir o fornecimento da fruta com qualidade, já que a mesma é comercializada tanto para o mercado externo e interno, para as indústrias de processamento, consumidores finais da fruta “in natura” e consumidores finais de produtos derivados da maçã.

Os produtos da cadeia maçã foram classificados em três grupos principais, de acordo com a demanda:

Maçã *in natura* para mercado externo: são frutas, em sua maioria da categoria extra de excelente qualidade, selecionadas com alto rigor em coloração, uniformidade, ausência de defeitos e de resíduos químicos. As quantidades comercializadas são principalmente da variedade *Gala*.

Maçã *in natura* para o mercado interno: são comercializadas pelas empresas produtoras de acordo com os critérios de classificação: categoria Extra, categorias I e II, tipos III e IV.

Maçã *in natura* sem classificação: são comercializadas diretamente pelo produtor, os atacadistas ou consumidores, principalmente no período de safra. Por fim a maçã industrializada, subprodutos da fruta, que em função da grande produtividade agrícola do país, acaba gerando um excedente da fruta que não é comercializada no mercado *in natura*, devido a defeitos, como a presença de manchas, rachaduras, tamanho inadequado e o principal fator, o visível apodrecimento de algumas porções, gerando substrato para a indústria do processamento (DANESI *et al.*, 2007).

3.6. Caracterização Físico-Química

Caracterizar um alimento envolve analisar a sua constituição química, características físicas e sensoriais. A determinação da composição centesimal dos alimentos visa determinar principalmente os teores de: umidade, cinzas, proteínas, carboidratos, fibras, lipídios, vitaminas e minerais.

3.6.1. Umidade

A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos e está relacionada com a estabilidade, qualidade e composição do produto (CECCHI, 2003). Neste sentido os teores de umidade de uma matriz podem afetar a contaminação, pois as diferentes espécies fúngicas possuem necessidades distintas de água para o seu desenvolvimento em um substrato. Por exemplo, o fungo de armazenamento *Penicillium* contamina cereais e frutas em ambientes onde a

umidade está na faixa de 80-85% (BENNET, 2003). O conhecimento do teor de umidade das matérias primas é de fundamental importância na conservação e armazenamento, na manutenção da sua qualidade e no processo de comercialização (CECCHI, 2003).

3.6.2. Cinzas

As cinzas constituem a fração mineral dos alimentos; são formadas pelos micro e macronutrientes os quais possuem relação direta com o solo em que foi cultivado. Segundo a literatura as cinzas das frutas são constituídas principalmente de grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg e pequenas quantidades de Al, Fe, Cu, Mn e Zn e traços de Ar, I, F e outros elementos. Em produtos vegetais a determinação de cinzas tem relativamente pouco valor, pois os componentes minerais são muito variáveis e a determinação das cinzas totais fornece, em geral, apenas uma indicação da riqueza da amostra nesses elementos (CECCHI, 2003).

3.6.3. Acidez Total Titulável e pH

A acidez foi determinada e expressa como porcentagem do ácido málico. De acordo com Zambiasi (1987), a acidez para diferentes cultivares de maçã deve estar compreendida entre 0,2-0,7% em ácido málico para a comercialização. Neste estudo os valores de acidez para as quatro variedades nas diferentes coletas se mantiveram constante, tendo as variedades Golden Delicious e Argentina os percentuais (0,2%) similar ao relatado por Córdova (2006), de 0,3%. A acidez das amostras as torna aceitáveis para a comercialização “in natura”.

O teor de ácidos orgânicos nos frutos tende a diminuir durante o processo de maturação devido à oxidação dos ácidos no ciclo dos ácidos tricarbóxicos em decorrência da respiração (BRODY, 1996). Dessa forma, a variação da acidez pode ser um indicativo do estágio de maturação do fruto, pois decresce em função do avanço da maturação. Para as maçãs analisadas não foram observadas variações significativas, indicando que a atividade respiratória, por consequência os índices de maturação se mantiveram variando lentamente (KLUGE *et al.*, 2002).

Cada micro-organismo possui um valor ótimo de pH no qual seu crescimento é máximo, e as mudanças bruscas de pH de um alimento podem se refletir na atividade microbiana. No caso dos fungos que se desenvolvem e produzem micotoxinas nos mais variados pH (PEREIRA *et al.*, 2002). O efeito da variação dele para menos limita, mas não impede a contaminação de tecidos vegetais.

3.6.4. Compostos Fenólicos

Na maçã, os flavonóides que se encontram em maior quantidade são os flavonóis, a florizina (polifenol característico da maçã), as antocianinas, e o ácido fenólico mais abundante é o ácido clorogénico, e o ácido gálico, o ácido fenólico mais simples também encontrado. A estes compostos é atribuído o grande poder antioxidante das maçãs (AWAD *et al.*, 2000). Além disso, os compostos fenólicos são bem conhecidos como fungicidas, antibacterianos e antiviróticos (LO e NICHOLSON, 2008).

O efeito inibitório dos compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e produção/atividade de enzimas microbianas variam entre os diferentes grupos de fenóis. Em vista disto atribui-se aos compostos fenólicos intensa participação nos mecanismos bioquímicos, estruturais e de resistência em plantas (NICHOLSON e HAMMERSCHMIDT, 1992; NICHOLSON, 1995).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Amostras

As amostras de maçã (Gala, Fuji, Golden Delicious e Argentina) e pêssego (Amarelo e Molar) foram adquiridas no período entre julho e setembro de 2013 em diferentes estabelecimentos comerciais (supermercados) e feiras livres da cidade de Rio Grande. A coleta das amostras se fez tomando de forma aleatória 500 g de cada variedade das frutas, considerando o bom aspecto delas, cor, ausência de danos físicos. Cabe salientar que nas feiras livres eram amostrados no mínimo dois fornecedores diferentes para cada variedade. Após a coleta as frutas de mesma variedade eram misturadas e tomadas 500 g que eram armazenadas sob-refrigeração (5 °C) até sua utilização.

4.1.2. Solução Padrão

O padrão de patulina (PAT) foi adquirido da *Sigma Aldrich* (E.U.A.) (P1639). As soluções padrão utilizadas foram preparadas a partir da diluição de aproximadamente 5 mg (massa original contida no frasco de padrão) de PAT em 50 mL de clorofórmio. Os frascos para armazenamento do padrão foram previamente higienizados empregando lavagem com detergente e água corrente e posterior enxágue com ácido nítrico 0,1 M, água destilada seguida por secagem dos frascos. Cada 10 mL da solução estoque foram acondicionados em frascos escuros com tampas de rosca e secos sob corrente de N₂, portanto o resíduo sólido seco continha 1 mg de PAT. A partir das massas do resíduo seco foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 10, 15, 20 µg mL⁻¹ cuja concentração foi determinada espectrofotometricamente, considerando a absorvidade molar de 14600 L mol⁻¹ .cm⁻¹ em etanol a 276 nm, visando empregá-los para a fortificação durante a etapa de escolha do método de extração e validação do procedimento. A estabilidade das soluções foi monitorada, repetindo o procedimento de quantificação durante o período dos experimentos. Para o preparo da curva analítica e estudo da linearidade as soluções padrão foram diluídas 1,33 µg mL⁻¹.

4.1.3. Instrumentação

- Balança analítica de precisão FA 210 4N (Bioprecisa, Brasil);
- Banho Maria BIOPAR COEL TLK 48 (Brasil);
- Banho ultrassônico 25, 37,40 e 40 kHz 150 W - UNIQUE (Brasil);
- Blender WARING COMMERCIAL 34 BL 97 (7012) (USA);
- Centrífuga refrigerada CIENTEC CT – 5000 R (Brasil);
- Coluna analítica DISCOVERY BIO WIDE PORE C18 (25 cm x4, 6 mm 10 µm) (Supelco USA);
- Cromatógrafo líquido Shimadzu, disponível no Laboratório de Micotoxinas e Ciências de Alimentos – FURG, equipado com sistema administrador CBM -20 A, módulo LC – 20 AT, desgaseificador DGU – 20 A5 e detector UV- VIS SPD-20 A, conectado em *software LC solution data aquisition*, injetor Rheodyne loop 20 µL;
- Espectrofotômetro modelo Cary 100 - Varian UV - VISIBLE (USA) controlado pelo software Star;
- Estufa (60 -200 °C) - Quimis (Brasil);
- Evaporador rotatório modelo Quimis Q - 344 B₂ (Brasil);
- Micropipetas automáticas com capacidade variável de 10 - 1000 µL;
- Mufla TECNAL, modelo TE – 631 (Brasil);
- pHmetro LUTRON, modelo 206;
- Shaker TECNAL, modelo TE – 420 (Brasil);
- Sistema de purificação de água Mili- Q Direct – Q UV₃ Millipore (USA);
- Vórtex mixer VIXAR (Coréia).

4.1.4. Solventes e Reagentes

Os solventes e reagentes utilizados durante a parte experimental encontram - se listados abaixo.

- Água destilada;
- Água ultra pura;
- Acetonitrila grau HPLC (Vetec, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Panreac, Espanha);
- Carbonato de sódio 4% (Synth, Brasil);
- Cloreto de sódio (Synth, Brasil);
- Clorofórmio (Quimex, Brasil);
- Fenolftaleína;
- Folin Ciocalteau (Próton Química, Brasil) 2 N;
- Gás nitrogênio;
- Hidróxido de bário 0,1 M (Vetec, Brasil);
- Hidróxido de sódio 0,1 e 2 M (Vetec, Brasil);
- Metanol grau HPLC (Vetec, Brasil);
- Patulina (SIGMA ALDRICH, USA);
- Sílica- gel 60 MERCK;
- Sulfato de sódio (Synth, Brasil);
- Sulfato de cobre 2% (p/v) (Synth, Brasil);
- Sulfato de zinco 5% (p/v) (Synth, Brasil);
- Tartarato de sódio (p/v) (Synth, Brasil);
- Tartarato de potássio (p/v) (Synth, Brasil).

4.2. Estabelecimento das Condições Cromatográficas

4.2.1. Definição da Fase Móvel para Eluição da PAT em HPLC-UV

A patulina foi determinada em HPLC equipado com coluna analítica Discovery C18 (25 cm x 4,6 mm 10 μ m), operando em modo isocrático. Foram realizados experimentos para definir a melhor fase móvel tendo como indicativo o melhor perfil do pico eluído em cromatogramas obtidos no intervalo de dez minutos de corrida, para evitar o alargamento de banda. Para escolher a composição da fase móvel foram testadas diferentes proporções de água e acetonitrila, sempre com a mesma vazão de 1 mL min⁻¹ (Tabela 6).

Tabela 6: Combinações de solventes para eluição em modo isocrático.

Testes	Proporções (% v/v)	
	Água	ACN
Teste 1	90	10
Teste 2	80	20
Teste 3	70	30
Teste 4*	90*	10
Teste 5*	80*	20
Teste 6*	70*	30

* **Teste 4, 5 e 6** - água acidificada

A acidificação da fase móvel foi realizada com ácido acético 1% pH 3 para estabilização da patulina. A escolha dos solventes para definir a fase móvel teve como principal critério a polaridade da micotoxina PAT e as misturas de solventes mais citadas na literatura. Definidas as melhores condições cromatográficas para determinação da micotoxina no HPLC-UV, foi realizada a validação para determinação de patulina, empregando os indicativos de mérito listados a seguir (INMETRO, 2003).

4.2.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para a determinação do LOD_i e do LOQ_i do instrumento foram realizadas injeções em triplicata da fase móvel e da solução padrão em concentrações decrescente (0,01, 0,005, 0,0025, 0,00125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) até que a área do sinal atingisse uma altura três vezes superior ao ruído da linha de base, no tempo de retenção da patulina (4,6 min). A partir do valor do desvio padrão das áreas multiplicada por três e dez foram estimados o LOD_i e o LOQ_i respectivamente, usando o coeficiente angular da curva padrão (INMETRO,2003).

4.2.3. Curva Analítica e Linearidade

A partir da solução trabalho de 1,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi construída uma curva padrão nas concentrações 0,01, 0,02, 0,04, 0,05, 0,06, 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo as diluições preparadas com água ultrapura:acetonitrila (90:10 v/v). Cada ponto da curva foi injetado em triplicata e a partir das médias das áreas dos picos foi possível calcular o coeficiente angular, o coeficiente linear e o coeficiente de correlação linear do modelo de resposta concentração x sinal.

4.2.4. Precisão do Instrumento

A precisão instrumental foi avaliada em função de 10 injeções sucessivas do padrão de PAT, referente a um ponto da curva analítica (0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (RIBANI et al., 2004).

Os resultados de precisão foram expressos através da estimativa do erro padrão relativo percentual (RSD%) (Equações 1 e 2).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (1)$$

$$RSD(\%) = \frac{s \cdot 100}{x} \quad (2)$$

Em que:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

\bar{x} = média das áreas (replicatas);

x = medida da área;

n = número de repetições.

Para avaliação da precisão intermediária foram realizadas 10 injeções sucessivas do padrão de PAT, referente a um ponto da curva analítica ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) por dois analistas (RIBANI et al., 2004).

A precisão foi calculada a partir da estimativa do erro padrão relativo percentual (RSD%) (Equações 1 e 2).

4.3. Estabelecimento das Condições de Extração

Foram testados três métodos para a extração da patulina: MSPD, QuEChERS e A.O.A.C (2000), considerando como indicativo de eficiência o valor de recuperação percentual obtido em cada procedimento.

4.3.1. Preparo de Amostra para Estudo da Extração

Após a coleta as maçãs com casca foram submetidas a um processo de limpeza com água corrente, água destilada e etanol, em seguida foram cortadas manualmente em cubos de aproximadamente 1 cm^3 e armazenadas congeladas em recipientes plásticos até a sua utilização. No momento da extração as amostras de maçãs foram processadas em blender por cinco minutos, até obtenção de uma pasta que foi contaminada com padrão de patulina considerando o LOQ e as diluições próprias de cada método. Para este estudo foi escolhida a variedade Gala, as mais ricas em açúcares redutores que são interferentes da extração, visto a polaridade dos solventes extratores.

4.3.2. Estudo das Técnicas de Extração

O método MSPD validado por Rubert *et al.* (2011), consistia em tomar porções de 1,0000 g de amostra contaminada e misturar com 1 g (C18) durante 5 min, até a

obtenção de uma mistura homogênea que era deixada em repouso por no mínimo 3 horas. A mistura era introduzida em uma coluna de vidro (10 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro), e eluída com 20 mL de uma mistura de acetonitrila: metanol (50:50 v/v). O resíduo foi evaporado e ressuspenso em 1 mL de metanol antes da determinação cromatográfica.

O método QuEChERS desenvolvido Anastassiades et al. (2003) e adaptado por Desmarchelier para determinar patulina: consistia em pesar 10,0000 g de amostra fortificada e deixadas em repouso por 24 horas para total evaporação do solvente. Logo após foram adicionados 10 mL de acetonitrila, seguido de agitação em vórtex. Em seguida foram adicionados 4 g de sulfato de magnésio, 1 g de cloreto de sódio. O material foi centrifugado (3200 g 10 min/ 25 °C) e ao sobrenadante recolhido foram adicionados 150 mg de sulfato de magnésio e 25 mg de ácido propil sulfônico (PSA), seguido de agitação orbital (200 rpm /1 min/temperatura ambiente) e centrifugação (3200 g /5 min/ temperatura ambiente). Após a etapa de limpeza 1 mL do sobrenadante foi recolhido para a determinação cromatográfica.

Método A.O.A.C (2000): consistia em pesar 10,0000 g de amostra fortificadas deixando-as em repouso por 24 horas. Para extração foram empregados 20 mL de acetato de etila agitando vigorosamente a mistura durante 1 minuto em vórtex, repetindo o procedimento mais duas vezes. As fases orgânicas foram combinadas e submetidas a partição com 10 mL de solução de carbonato de sódio 1,5%. O extrato orgânico obtido foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro para a remoção de água residual. O extrato foi transferido para uma coluna de vidro (10 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro) contendo 6 g de sílica gel (seca), sendo a toxina eluída com 20 mL de acetato de etila. Após a evaporação, o extrato foi ressuspenso em 500 µL de água: acetonitrila (90:10 v/v) para determinação cromatográfica. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

O método oficial foi adequado para minimizar o uso de solvente extrator, diminuir o efeito da interferência da pectina através da acidificação do meio (pH 3), inclusão do banho ultrassônico para facilitar a descompartmentalização das células do tecido da fruta e exclusão dos sais para diminuir o gasto de reagentes e os problemas com o descarte dos resíduos. Os efeitos foram avaliados tendo como resposta os níveis de

recuperação da patulina. Na Tabela 7 encontram-se as modificações realizadas no método oficial.

Tabela 7: Variáveis estudadas para adaptação do método oficial a extração de PAT em maçãs.

Variáveis	A.O. A.C Oficial	A.O.A.C Modificado
Solvente extrator (acetato)	80 mL	40 mL
Agitação (vórtex)	3 min.	6 min.
Agitação (ultrassom)	-	15 min.
pH	4,2	3,0
Sais	CaCO ₃ (1,5% p/v) NaCl (1g)	-

Variáveis Adaptadas

- **Solvente extrator:** a proposta do método oficial seria a extração da patulina num volume 80 mL de solvente extrator. Testes foram realizados para verificar se a diminuição do solvente causaria perdas na recuperação da micotoxina. Os volumes foram gradativamente diminuídos nas etapas de extração, resultando em um volume final de 40 mL.
- **Agitação em vórtex:** como descrito no item 4.3.2 o método oficial recomenda 3 minutos de agitação em vórtex. Foram realizados testes dobrando o tempo de agitação.
- **Agitação em ultrassom:** a inclusão do ultrassom na extração de diferentes micotoxinas foi realizada anteriormente no laboratório (LAMCA) mostrando bons resultados em vários métodos de extração de micotoxinas. Foram realizados testes no método oficial de extração da patulina, adotando 15 minutos de banho ultrassônico na potência 60 Hz, estando a amostra e os agentes extratores em

tubos de centrifuga presos em suportes próprios para que ambos fossem submetidos as mesmas condições de ultrassonicação.

- **pH:** a acidificação do meio com ácido clorídrico 0,1 M durante 24 horas a uma temperatura de 25 °C, com o propósito de separação da pectina um interferente na etapa de extração, além da estabilização da patulina.
- **Exclusão dos sais:** A exclusão dos sais para clarificação e remoção de água teve como objetivo a diminuição dos resíduos gerados na extração.

4.4. Validação do Método Oficial Adaptado

Para a determinação do limite de quantificação do método LOQ_m foi considerado o limite de quantificação do instrumento e as diluições realizadas durante o preparo do extrato da amostra (INMETRO, 2003).

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (RSD_r), após fortificação de maçã da variedade Gala em três níveis, seguido por extração da patulina com o protocolo do método oficial modificado. A repetibilidade do método foi expressa pela estimativa do erro padrão relativo percentual (RSD%) (Equação 1,2).

A exatidão foi avaliada através da recuperação, obtida pela determinação cromatográfica das mesmas amostras preparadas para a determinação da precisão e calculada, conforme Equação 3. (INMETRO, 2003).

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

C₁ = concentração determinada na amostra fortificada;

C₂ = concentração determinada na amostra não fortificada;

C₃ = concentração adicionada do padrão.

Os valores aceitáveis de recuperação para análise de traços estão entre 70 e 120% com precisão de até +/- 20% (INMETRO, 2003).

A seletividade do método foi avaliada pela comparação entre uma curva analítica de PAT com o extrato da matriz (curva de efeito matriz) e uma curva analítica sem a presença da matriz. Para a construção da curva de efeito matriz, primeiramente foi

realizada a extração de uma amostra de maçã (isenta de PAT) empregando o método de extração da A.O.A.C modificado.

A curva de efeito matriz foi construída através da injeção de seis pontos em triplicata nas seguintes concentrações: 0,01, 0,02, 0,04, 0,05, 0,06 e 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluídos no extrato da fruta, e a curva com padrão foi construída com os mesmos pontos da curva na matriz. A seletividade foi estimada a partir do cálculo de fator de matriz das curvas, usando a relação entre os coeficientes angular de ambas as curvas analíticas.

4.5. Caracterização Físico- Química da Maçã

4.5.1. Preparo de Amostra para Caracterização Físico- Química da Maçã

Para caracterização físico- química as amostras de maçã de cada coleta foram descascadas e trituradas em blender, até a obtenção de uma pasta homogênea. As cascas também foram trituradas em blender para a caracterização.

4.5.2. Umidade – Método nº 935.29 - AOAC (2000)

Foram secas cápsulas de alumínio por 30 minutos em estufa a 105 °C e resfriadas em dessecador. As cápsulas vazias foram pesadas e suas massas, anotadas; foram adicionadas aproximadamente 3,0000 g de amostra de maçã em cada cápsula tarada e novamente as massas foram apontadas. As cápsulas foram levadas a estufa a 105 °C por 6 horas, após esse tempo, levadas ao dessecador até o equilíbrio com a temperatura ambiente. Foi feito uma pesagem das massas e repetida a operação de secagem a cada 30 minutos, até que o peso se tornasse constante. O mesmo procedimento foi realizado para as cascas das maçãs.

$$\% \text{ Umidade: } M_i - M_f / M_i \times 100 \quad (4)$$

Em que:

M_i = massa inicial (g)

M_f = massa final (g)

4.5.3. Cinzas - Método nº 923.03 – AOAC (2000)

Primeiramente, os cadinhos foram identificados e levados à mufla a temperatura de 560 °C por 1 hora. Antes de retirá-los da mufla a temperatura foi reduzida a 150 °C, seguindo o resfriamento em dessecador até atingir a temperatura ambiente para aferição da massa. Neles foram pesados aproximadamente 3,0000 gramas de amostra de maçã. Foi realizada uma carbonização prévia o em Bico de Bunsen e a incineração foi concluída em mufla a 560 °C ao longo de 3 horas, seguindo o mesmo procedimento operacional antes da pesagem. Para dar fim à determinação, a incineração foi repetida até que a massa se tornasse constante. O mesmo procedimento foi realizado para as cascas das maçãs.

$$\% \text{ cinzas} = \text{massa cinza} / \text{massa amostra} \times 100 \quad (5)$$

4.5.4. Acidez Total Titulável e pH - Método AOAC (2000)

20,0000 g de amostra foram trituradas em homogeneizador com 100 mL de água. Após a filtração foi recolhido o sobrenadante que foi determinado o pH e 20 mL utilizados para titulação com solução de NaOH 0,1 M padronizada (0,098) usando como indicador uma solução alcoólica de fenolftaleína 0,5%.

$$\% (\text{ácido málico}) = [V \times \text{eq.g ácido} \times 100] / P \quad (6)$$

Em que:

V = volume de NaOH.

P = g ou mL da amostra usado na titulação.

4.5.5. Determinação dos Compostos Fenólicos

Foram pesados 3,0000 g de amostra e adicionados 10 mL de metanol, sendo a mistura submetida a agitação horizontal. Após uma interrupção de 15 min, a agitação da mistura foi continuada com auxílio de mais 10 mL de metanol. O extrato foi filtrado, o metanol evaporado e os compostos fenólicos ressuspensos em água destilada. Em seguida o extrato foi clarificado com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5% e após 20min de repouso, centrifugado, filtrado e o volume aferido a 25 mL com água destilada (SOUZA *et al.*,2007).

A quantificação dos fenóis no extrato foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (ácido fosfotungstíco e ácido fosfomolibdico 2 N em meio alcalino). Para isto alíquotas de 0,5 mL do extrato fenólico foram adicionados a tubos de ensaio juntamente com 0,5 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 4,5 mL da solução alcalina (Na_2CO_3 4%, CuSO_4 2% e tartarato duplo de sódio e potássio 4%, na proporção de 100:1:1). Os tubos permaneceram por 15min em banho-maria a 40°C. Posteriormente foram adicionados 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:2 em água destilada), deixando em repouso por um intervalo de 10min. O complexo colorido resultante da redução do reagente pelos componentes fenólicos do extrato teve sua absorvância determinada a 750nm sendo o sinal tomado como transmitância. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi estimada por interpolação das absorvâncias das amostras empregando curva de calibração de ácido gálico (1,7 a 13 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.6. Ocorrência de PAT em Maçã e Pêssego

As amostras coletadas de maçã das variedades Gala, Fuji, Golden Delicious e Argentina e pêssego das variedades Amarelo e Molar foram submetidas à extração conforme o método adaptado e validado. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.7. Estimativa da Distribuição de Patulina em Suco e Polpa das frutas

Para a estimativa da distribuição da patulina no resíduo sólido e na fração aquosa foram consideradas as quatro variedades de maçãs de grande aceitabilidade comercial (Gala, Golden Delicious, Fuji e Argentina), o período de coleta se deu em setembro de 2013. Nos dois casos foram coletados 500 gramas das frutas do próprio produtor (em feiras livres) e coletadas em redes de supermercado, onde se emprega câmaras frias para conservação antes da exposição para venda. Até o momento da utilização as frutas foram mantidas sob refrigeração.

Primeiramente as superfícies das maçãs foram limpas com etanol, e em seguida com o auxílio de uma seringa de 50 μL a solução padrão de patulina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi injetada no centro das frutas e as mesmas colocadas em um recipiente fechado por um período de quatro dias. Após esse período as frutas foram descascadas, logo após foram homogeneizadas em blender por cinco minutos até que os pedaços estivessem totalmente desintegrados. A massa obtida foi centrifugada a uma rotação de 3200 g e temperatura de 25 °C. O sobrenadante foi separado do resíduo sólido para posterior extração da micotoxina distribuída em ambos. Foram quantificadas em HPLC-UV utilizando o método desenvolvido neste trabalho.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Estabelecimento das Condições Cromatográficas

5.1.1. Definição da Fase Móvel para Eluição da PAT em HPLC-UV

Para estabelecer as melhores condições cromatográficas para a determinação de patulina foram feitas injeções usando soluções padrão. As variáveis estudadas na etapa cromatográfica foram as proporções da fase móvel e acidificação. O comprimento de onda escolhido para a detecção do analito foi 276 nm, descrito na literatura (SARGENTIL, 2010). Usando uma proporção de água ultrapura: acetonitrila (90:10 v/v) a patulina foi eluída em 4,2 minutos num total de 10 minutos de eluição. Nesta condição não foi verificado alargamento de banda e o pico apresentava forma gaussiana (Figura 6).

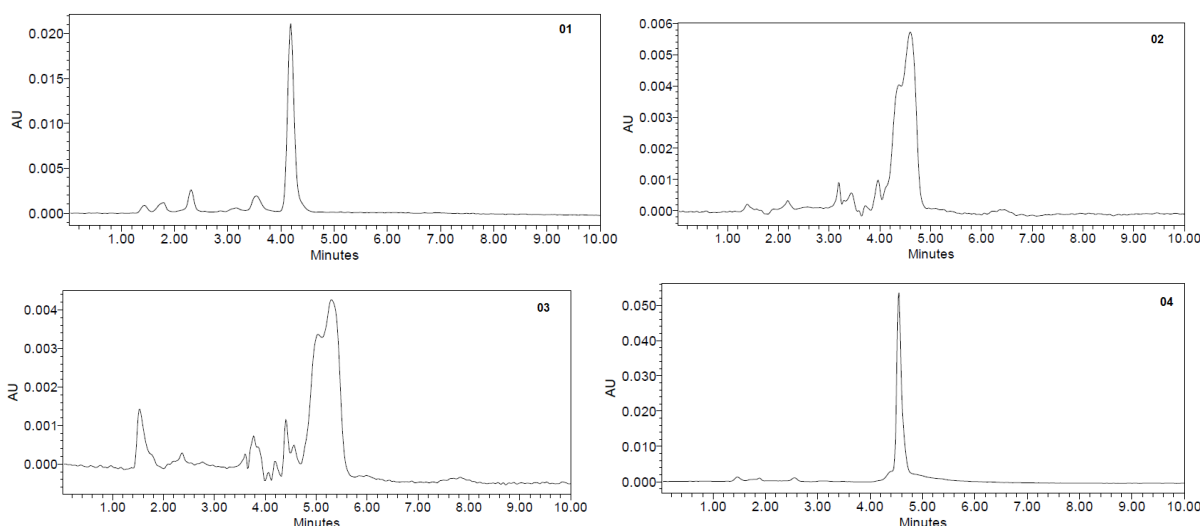


Figura 6: Cromatogramas da micotoxina PAT em HPLC - UV utilizando quatro diferentes testes da fase móvel.

01: Água ultrapura: ACN (90:10 v/v); **02:** Água ultrapura: ACN (80:20 v/v); **03:** Água ultrapura: ACN (70:30 v/v); **04:** mesmas proporções dos testes 01, 02, 03 com acidificação.

Em todos os cromatogramas a patulina pode ser visualizada, mas os tempos de retenção diferiam. Observando os cromatogramas 02 e 03 o pico apresentava deformação posterior e base alargada, sendo os tempos de retenção de 4,5 e 5,5 minutos respectivamente. O cromatograma 04 apresentou ligeiro alargamento na base e tempo de retenção de 4,5 minutos. Portanto foi escolhido o cromatograma 01 que foi obtido na condição descrita.

A acidificação também proporcionou resultados cromatográficos satisfatórios (cromatograma 04), porém o cromatograma 01 foi o perfil mais definido.

Bacha 2012 determinou patulina em HPLC - UV equipado com coluna analítica C18 (25 cm x 4,6 mm 5 μm) e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, operando em modo isocrático com uma fase móvel água: acetonitrila (90:10 v/v), obteve um tempo de retenção de 4,8 min, o que é similar ao deste trabalho.

5.1.2. Limite de Detecção e Quantificação, Curva Analítica, Linearidade e Precisão

Para a construção da curva foram utilizados seis níveis de concentração da PAT, abrangendo desde o LOQi ($0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo o último ponto dez vezes maior que o primeiro ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 7). Esses valores estão de acordo com a ANVISA, que sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo em triplicata de cada, com estimativa de erro relativo de (RSD %) entre as injeções inferiores a 5%.

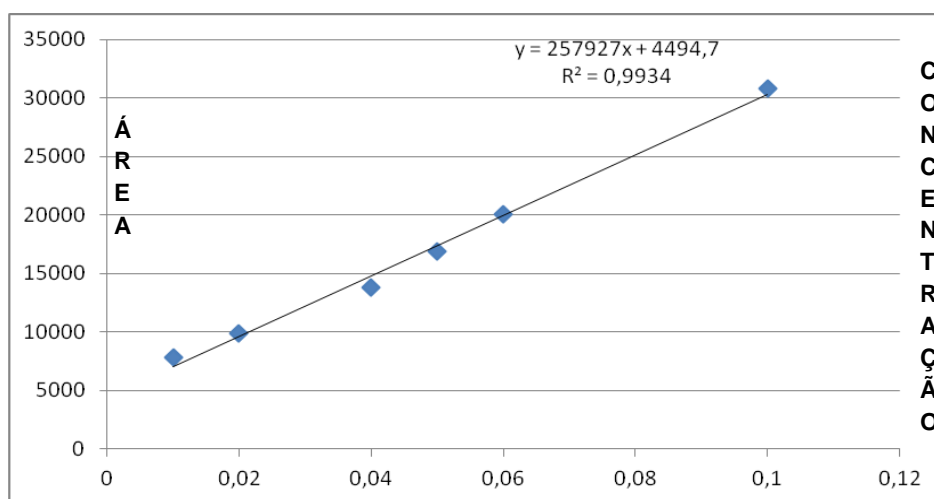


Figura 7: Curva analítica do padrão de PAT ($0,01 - 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$)

As áreas dos picos obtidos com as diferentes concentrações de padrão (Tabela 8) foram ajustadas em modelo de regressão linear para ser empregado na quantificação da micotoxina PAT. O coeficiente de correlação do modelo (r) foi maior que 0,99, portanto de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO, que recomendam a faixa de $r \geq 0,99$ e $r \geq 0,90$ respectivamente (ANVISA, 2003).

Tabela 8: Indicativos quantitativos para determinação da PAT

Indicativos	Curva analítica PAT
Curva analítica	$y = 257927 x + 4494,7$
Intervalo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,01 - 0,1
Coeficiente de correlação (r)	0,9934
Limite de detecção LOD_i ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,001
Limite de quantificação LOQ_i ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,01

A precisão do instrumento foi avaliada em termos de repetibilidade (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi). O RSDr foi obtido a partir de 10 injeções sucessivas do padrão de PAT, referente a um ponto da curva analítica ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a precisão intermediária por dois analitos conforme sugerido pelo INMETRO (2003) que recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. Foi obtido um RSDr entre 1,2 e 1,7 e precisão intermediária entre 6,7 e 9,2%.

5.2. Estabelecimento das Condições de Extração

5.2.1. Estudo da Recuperação do Método MSPD, QuEChERS e A.O.A.C

A escolha do método de extração utilizado para a validação do método de detecção e quantificação da PAT em amostras de maçã foi realizada a partir dos resultados de R(%) e CV%. Estes valores estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: R(%) e CV% dos métodos de extração MSPD, QuEChERS e A.O.A.C

Nível de Fortificação	Método de extração	R(%) +/- CV
(2x LOD)	MSPD	58 +/- 6,1
(4x LOD)		37 +/- 32,4
(5x LOD)		54 +/- 5,9
(2x LOD)	QuEChERS	59 +/- 5,7
(4x LOD)		61 +/- 13,9
(5x LOD)		29 +/- 21,1
(2x LOD)	A.O.A.C	69 +/- 3,7
(4x LOD)		77 +/- 3,1
(5x LOD)		57 +/- 2,9

O método MSPD apresentou valores de recuperação R (%) entre 37 e 58% para os níveis de contaminação estudados, com coeficiente de variação acima do recomendável (32,4%) para conferir confiabilidade ao estudo (máximo 20%). Os valores aceitáveis de recuperação para análise de traços estão entre 70 e 120%, estando todos dentro desse limite (INMETRO, 2003). Nesse estudo os percentuais de recuperação foram inferiores ao encontrado por RI - NA (2008), que obteve percentuais de recuperação satisfatórios para amostras de maçã e suco concentrado de maçã (89-103%) e (85-98%) respectivamente.

O método QuEChERS resultou em de recuperações entre 29 e 61%, ou seja abaixo do recomendado e ainda o coeficiente de variação estava acima do permitido para conferir confiabilidade ao estudo (21,1%). O método foi utilizado para a determinação da patulina em amostras de pêra, promovendo uma recuperação 94-104% (DESMARCHELIER, 2011).

O método A.O.A.C para determinação de patulina resultou em percentuais de recuperação entre 57 e 77%, o mais próximo ao recomendado (ANVISA, 2003), cujo o CV(%) máximo foi de 3,7%. A partir disto foram realizados experimentos para adequar os teores de recuperação e gerar menos resíduos químicos para o descarte.

5.3. Validação do Método A.O.A.C Adaptado

O limite de quantificação LOQ_m para o método de extração da A.O.A.C modificado para a PAT em amostras de maçã foram de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Para a repetibilidade os teores de (RSD_r) variaram entre 4,5 e 7,9% estando de acordo com o estabelecido pela INMETRO (2003), que sugere valores de no máximo 20%.

O método da A.O.A.C é geralmente utilizado na extração da PAT em amostras de tecidos vegetais como maçã, uva e pêra e tem demonstrado ser um método eficiente com valores de recuperação acima de 80%. Neste estudo algumas modificações foram necessárias para que a extração fosse mais eficiente e obtivéssemos percentuais de recuperação desta ordem. Essas modificações foram o emprego da agitação com ultrassom associada a agitação em vórtex, além da acidificação do meio.

O emprego da agitação com ultrassom conferiu maior eficiência na extração, uma vez que as ondas percolam a matéria, provocando bolhas que explodem e conseqüentemente aumentam o movimento das moléculas, que associado a agitação dos tubos em vórtex propiciaram maior interação soluto - solvente. A acidificação pode ter promovido maior estabilidade a estrutura da patulina e uma menor interferência da pectina presente na matriz (WANG, PAGÁN e SHI, 2002; CHO, HWANG, 2000).

O método da A.O.A.C modificado neste estudo foi aplicado em amostras de maçãs em três níveis de fortificação. Os valores de recuperação variaram entre 82 e 87%, cujos CV variaram entre 4,5 e 7,9% demonstrando que a modificação na forma de agitação e acidificação do solvente propiciaram melhora comparativamente ao método original quando aplicado as nossas amostras (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de recuperação para PAT em amostras de maçã

Nível de Fortificação	%R	CV %
(2x LOQ)	82	4,5
(4x LOQ)	83	7,9
(5x LOQ)	87	6,1

Outros autores tem utilizado o método da A.O.A.C com sucesso, porém sem adotar modificações como neste trabalho. Welke, et al. 2008, determinaram patulina em suco de maçã concentrado e pasta de maçã, obtendo 93, 96 e 96% para os três níveis de fortificação estudados 50,100, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, para o suco de maçã concentrado, enquanto que para a pasta de maçã os percentuais de recuperação foram 91, 92 e 88% para os três níveis de fortificação 200, 300 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No trabalho de Junior et al. (2007) também foi utilizado o método oficial para extração da patulina em amostras de uva, e foram obtidos valores de recuperação entre 60 e 85%.

Embora não seja muito estudado o efeito de matriz para detectores de ultravioleta, é recomendável testá-lo visto que quando não é possível garantir que serão encontradas amostras isentas de contaminação, pelo fato que a ocorrência da micotoxina é aleatória. No caso deste estudo as curvas padrão no solvente e no extrato da matriz foram paralelas e os coeficientes lineares foram muito semelhantes, demonstrando que não há interferência da matriz na determinação do analito de interesse (INMETRO, 2003). Os dados de regressão linear da curva de matriz e curva padrão estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Indicativos de desempenho para as curvas na matriz e padrão

Indicativos	Curva na matriz	Curva padrão
Concentrações (ug mL ⁻¹)	0,01- 0,1	0,01- 0,1
Coeficiente de correlação (r)	0,9813	0,9941
Coeficiente linear (a)	255538	257927

A relação entre os dois coeficientes lineares é aproximadamente 1 (1,009), portanto segundo Krueve (2009), quando a resposta do analito é igual a 1 nenhum efeito matriz é observado. Esta característica é mais uma garantia para a confiabilidade dos resultados obtidos para a aplicação do método.

5.4. Caracterização Físico- Química da Maçã

5.4.1. Umidade

No caso das quatro variedades de maçã estudadas foi observado uma diferença significativa entre os percentuais de umidade para a primeira coleta (julho) em relação a última coleta (setembro) (Tabela 12), os valores variaram de (68- 89%) de umidade para a polpa da fruta com um CV entre (2-10%). Para a casca os valores variaram de (59-82%) de umidade com um CV variando de (2-10%).

Os dados do estudo demonstraram que o percentual de umidade foi maior na coleta de setembro, estando as frutas com um tempo de maturação maior, sugerindo que as maçãs estariam mais susceptíveis a contaminação fúngica, pois com o passar do tempo a atividade metabólica propiciou um maior teor de água livre que pode ser verificado nas amostras com mais de 80% de umidade, portanto mais disponíveis para o desenvolvimento microbiano.

Comparando os níveis de umidade ao longo do período amostrado as maiores variações foram verificadas para as maçãs da variedade Fuji e Golden Delicious, que apresentaram aumentos superiores a 10%. O valor médio de umidade estimado para

as quatro variedades foi de 79% que é inferior ao valor encontrado por Córdova (2006) de 87,2% para a maçã comercial, Goularte et al. (2006) encontraram 85% para maçã Fuji madura e 83% para maçã Fuji supermaduras e Souza e Ocácia (2009) encontraram 85%. Cabe salientar que os autores empregaram determinação de umidade pelo método gravimétrico de secagem em estufa, como neste trabalho.

5.4.2. Cinzas

Os percentuais de cinzas encontrados para a polpa das maçãs deste trabalho variaram entre 2 e 3% CV (6-18%). Nas cascas das maçãs os percentuais variaram entre 1 e 4% e CV (7-19%). Os valores de cinzas obtidos nas polpas analisadas foram aproximadamente 5 vezes mais elevados que o relatado por Moura *et al.* (2012), cujos percentuais foram da ordem de 0,5% para maçãs in natura e 0,6% para maçãs desidratadas. Fato que confirma que a variabilidade dos teores de cinzas em frutas é determinada por variáveis abióticas. No caso do interesse em relacionar com a contaminação fúngica não há muitos estudos associando a este fator, embora o metabolismo fúngico possa ser afetado pelos minerais presentes no substrato.

5.4.3. Acidez Total Titulável e pH

Neste estudo o pH das quatro variedades de maçã não variou ao longo das coletas, sendo a variedade Golden Delicious a que apresentou os valores de pH mais baixos durante o período avaliado. O pH médio das amostras (4,3) é semelhante ao encontrado por Vicenzi e Bilhalva (1998) e por Córdova (2006) para maçãs Fuji da região de Curitiba, enquanto que Goulart (2000) encontrou valores inferiores (3,9) para maçã Fuji colhidas no estágio de maturação indicado para a comercialização “innatura”.

Um aspecto que chama atenção é que os valores de pH encontrados são favoráveis a produção de patulina pelo fungo *Penicillium expansum*, uma das espécies produtoras.

5.4.4. Determinação dos Compostos Fenólicos

No nosso trabalho o conteúdo dos compostos fenólicos livres (CFL) foi expresso como ácido gálico/ g de polpa de maçã variando entre (744- 2464 $\mu\text{g g}^{-1}$ +/- 7 e 19%), visto que este é um dos primeiros ácidos fenólicos a ser formado na via de síntese dos compostos polifenólicos. Na variedade Gala foram encontrados os maiores níveis de (CFL) ao longo do período de coleta (2464 $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra), sugerindo que se eles possuem papel de defesa e tem menor probabilidade de ocorrer a contaminação fúngica (BAKAN et al., 2003; GRIFFIN, 1994; RASOOLI e ABYANEH, 2004).

Tabela 12: Faixa de variação da composição das maçãs entre julho a setembro de 2013 e CV %.

Variedades	(Polpa)		(Casca)		(Polpa)		(Casca)		(Polpa)	(Polpa)	(Polpa)
	Umidade % (CV)		Umidade % (CV)		Cinzas % (CV)		Cinzas % (CV)		CFL* ($\mu\text{g g}^{-1}$) (CV)	pH (CV%)	Acidez (CV%)
Fuji	68-81	+/-9,2%	59-72	+/-9,9%	2,5-3,6	+/-18%	2,1-3,1	+/-19%	744-856 +/-7%	4,1-4,7 +/-8%	0,03-0,04 +/-16%
Gala	81-84	+/-2,1%	67-82	+/-10%	2,4-3,3	+/-17%	2-2,4	+/-16%	2104-2464 +/-8%	4,4-4,9+/-6%	0,04 + ni
Argentina	82-87	+/-3,1%	71-81	+/- 6,5%	2,9-3,3	+/-6,5%	1,1-1,7	+/-7,5%	1189-1667 +/-19%	4,3-4,5+/-2,5%	0,2 + ni
Golden	73-89	+/-10%	65-68	+/- 2,2%	2,3-2,8	+/- 10%	3,1-4	+/- 14%	807-934 +/- 7%	3,4-3,5 +/- 1,5%	0,2 + ni

5.5. Ocorrência de PAT em Maçãs e Pêssegos

O método adaptado para determinação de PAT foi utilizado para a quantificação desta micotoxina em amostras de maçãs e de pêssegos “in natura”. Os estudos a cerca da contaminação em pêssegos são escassos comparativamente as maçãs, e na região Sul é praticamente inexistente ainda que seja uma das principais produtoras do país. Das amostras analisadas de maçã das quatro variedades, os níveis de contaminação foram abaixo do limite de detecção do método (Tabela 13). As amostras que apresentaram contaminação mais elevada pertenciam as variedades Golden Delicious (173 $\mu\text{g kg}^{-1}$), seguido da variedade Argentina (59 e 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Esses valores estão acima do permitido pela legislação do Brasil que regulamenta 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para suco e polpa de maçã. Nos pêssegos das variedades amarelo e molar não foi detectada contaminação, usando o método da A.O.A.C adaptado, o que pode ser promissor para a saúde pública.

Tabela 13: Quantificação da PAT em amostras de maçã e pêssego.

Variedades/Nº de amostras	Contaminação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV%
Fuji (15)	<LOQ*	-
	<LOQ*	-
	<LOQ*	-
Gala (15)	<LOQ*	-
	27	8,0
	<LOQ*	-
Argentina (15)	<LOQ*59	4,7
	75	3,9
		6,4
Golden Delicious (15)	173	3,8
	38	7,7
	<LOQ*	-

<LOQ*: nível abaixo do limite de quantificação do método.

A figura 8 mostra o cromatograma da amostra contaminado da variedade Gala, com tempo de retenção em 4,6 minutos, ou seja, com um tempo de retenção maior do que o obtido com o padrão de patulina. Esse fato pode ser explicado pela interferência da matriz na detecção da micotoxina, que tem seu tempo de retenção alterado.

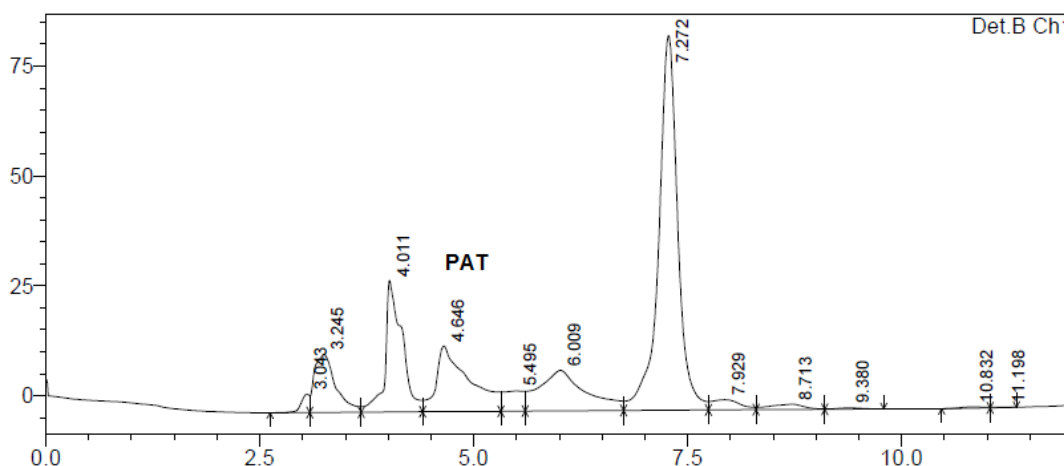


Figura 8: Cromatograma da amostra de maçã contaminada com PAT.

Um estudo realizado no Brasil na cidade de Campinas avaliou a ocorrência de PAT em 30 amostras de suco de maçã obtido por moagem ou prensagem da fruta sólida, com posterior etapa de clarificação e pasteurização, nelas foi detectada a presença de patulina em apenas 3,3% das amostras em níveis inferiores ao recomendado pela legislação ($17 \mu\text{g L}^{-1}$) (SYLOS e RODRIGUES-AMAYA, 1999), semelhante ao deste trabalho onde apenas 4,1% das amostras estavam contaminadas.

No Reino Unido por Burda (1992), analisando 328 amostras de suco de maçã encontrou 23% delas com a toxina com níveis de contaminação variando entre 51 e $1130 \mu\text{g L}^{-1}$, superiores ao permitido pela legislação da União Europeia, que também estabelece $50 \mu\text{g L}^{-1}$ como limite máximo para suco de maçã e derivados. Estas diferenças na frequência de contaminação podem estar relacionadas a diferentes variáveis bióticas (variedade da fruta e virulência da cepa fúngica) e abióticas (manejo da cultura, condições ambientais e outros).

De acordo com os dados obtidos a variedade Golden Delicious apresentou o valor mais elevado de contaminação. Cabe mencionar que ela foi a variedade que apresentou os percentuais mais elevados de umidade na coleta no mês de setembro (89%) e o pH mais próximo ao ideal para o desenvolvimento fúngico. Ainda é importante salientar que nas amostras desta variedade foram encontrados os menores

teores de compostos fenólicos livres, reforçando a relação destes compostos com mecanismos de defesa das plantas.

Como era esperado os fatores bióticos (composição do substrato) são importantes para a susceptibilidade a contaminação fúngica.

5.6. Estimativa da Distribuição de Patulina no Suco e na Polpa de Frutas

O estudo da distribuição da PAT no suco e na polpa das maçãs e pêssegos foi conduzido para inferir sobre o risco de contaminação dos produtos derivados a partir de matéria prima contaminada. As frutas foram contaminadas artificialmente a partir do pedúnculo como ocorre na natureza, pois o fungo penetra a partir deste ponto para o interior. Os valores percentuais de recuperação estão na Tabela 14.

Nas maçãs, apesar da solubilidade da micotoxina em meios polares ela ficou aderida ao resíduo sólido, possivelmente pelo papel adsorvente da pectina (YAPO, 2006). Em pêssego os resultados foram diferentes para ambas as variedades estudadas que resultaram em percentuais de recuperação mais elevados na fração aquosa da fruta, fato que pode ser explicado pela menor interferência da matriz na solubilidade da PAT que acompanha a fração aquosa durante a extração do suco.

Novamente a variedade Golden Delicious destacou-se das demais e mostrou os mais elevados percentuais de recuperação na fração aquosa. Isso indica que essa variedade causaria um risco maior de contaminação no preparo de suco de maçã. A variedade Argentina apresentou os maiores percentuais de recuperação no resíduo sólido, sugerindo que ao serem usadas para o preparo de geleias, haveria maiores risco de contaminação pelo consumo. Nos pêssegos o maior risco está no preparo de sucos a partir das duas variedades (Tabela 14).

Tabela 14: Distribuição da PAT na fração aquosa e resíduo sólido das maçãs e dos pêssegos.

Maçã	% Resíduo sólido	% Fração aquosa
Fuji	78	19
Gala	71	22
Golden	73	33
Argentina	79	13
Pêssego	Resíduo sólido	Fração aquosa
Amarelo	45	49
Molar	37	65

6. CONCLUSÕES

Dentre os métodos propostos o da A.O.A.C foi o escolhido para ser adaptado, devido aos melhores percentuais de recuperação obtidos. Contudo, este método pôde ser aprimorado elevando sua eficácia na aplicação em frutas *in natura* de clima temperado. A agitação em ultrassom e a acidificação do solvente foram fundamentais para maior eficiência do método.

A ocorrência de PAT foi verificada em 4,1% das amostras de maçã *in natura*. As amostras da variedade Golden Delicious apresentaram os maiores percentuais de contaminação ($173 \mu\text{g kg}^{-1}$) seguido das amostras da variedade Argentina ($75 \mu\text{g kg}^{-1}$). Nos pêssegos das variedades amarelo e molar não foi detectada contaminação, usando o método da A.O.A.C adaptado, o que pode ser promissor.

Quanto a composição química não houve diferença significativa entre o teores dos componentes nas quatro variedades estudadas. As maçãs da variedade Gala foram as mais ricas em compostos fenólicos livres.

Avaliando a distribuição da patulina na polpa e no suco das maçãs e pêssegos contaminados artificialmente ficou demonstrado que na fração aquosa da variedade Golden Delicious foram encontrados os mais elevados percentuais de recuperação do contaminante (33%), indicando que essa variedade causaria um risco maior de contaminação ao ser empregada para o preparo de sucos. Ao contrário a variedade Argentina apresentou os maiores percentuais de recuperação no resíduo sólido (79%), demonstrando que o preparo de geleias causaria maior risco no seu consumo. Nos pêssegos o maior risco está no preparo de sucos.

Dentre os principais desafios futuros da presente pesquisa destacam-se a validação do pêssego, a determinação de pectina nos mesmos, assim como, nas maçãs, outras formas de preparo de amostra e seus efeitos, e finalmente o tratamento de resíduos e a sua descontaminação.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL - **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: IFNP Instituto, Consultoria & Comércio. 2007, 516.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, SJ, STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction''for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**. 2003, 86: 412-431.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, RESOLUÇÃO - RDC Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011. Disponível em <www.anvisa.gov.br> Acesso em 27 de janeiro de 2014.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

AOAC - **Official Methods on Analysis of AOAC International**. Method 974.18 patulin in apple juice thin-layer chromatographic method, Natural Toxins.2003.

AOAC - **Association of Official Analytical Chemistry**. Official methods of analysis of the Association on Analytical Chemistry. 2000, 12: 1015.

ARBIZU - MURILLO, M.; AMÉZQUETA, S.; GONZALES-PEÑA, E.; CERAIN, A. L, A Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. **Food Chemistry**. 2010, 420-423.

ASPLIN, F. D.; CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their affect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**. 1961, 73: 1215-1219.

AWAD, M. A.; JAGUER, A.; VAN WESTING, L. M. *Flavonoid and Chlorogenic Acid Concentrations in Apple Fruit: Characterisation of Variation*. **Scientia Horticulturae**.2000, 83:249-263.

AZZOLIN, M.; Fisiologia pós-colheita de goiabas 'Pedro Sato': estádios de maturação e padrão respiratório, 2002.

BACHA, H.; ZAIED, C.; ABID, S.; HLEL, W. Occurrence of patulin in apple-based-foods largely consumed in Tunisia. **Food Control**. 2013, 263-267.

BAKAN, B. et al. Possible role of Plant Phenolics in the Production of Trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different Fractions of Maize Kernels. **Journal and Agricultural Food Chemistry**. 2003, 51: 2826-2831.

BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins. **World Mycotoxin Journal**. 2008, 1:147-159.

BARKER, S.A.; Matrix solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography A**.2002, 885:127.

BARKER, S.A.; Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal of Chromatography A**. 2000, 880: 63.

BATA, A.; LÁSZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**. 1999, 10: 223-228.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology**. Rev. 2003, 16:3: 497-516.

BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; PETRI, J. L.; MARODIN, G. A. B. Cultivares de fruteiras de caroço. In. MONTEIRO, L. B.; MAY-DE MIO, L. L.; SERRAT, B. M.; CUQUEL, F. L. Fruteiras de Caroço: uma visão ecológica, Curitiba, UFPR, 2004, 16-19.

BRACKMANN, A.; BENEDETTI, M.; STEFFENS, C. A.; MELLO, A. M. de. Efeito da temperatura e condições de atmosfera controlada na armazenagem de maçãs 'Fuji' com incidência de pingo de mel. **Revista brasileira de Agrociência**. 2002, 8(1): 37-42.

BRODY, A. L. Envasado de alimentos en atmosferas controladas, modificadas y vacío. Zaragoza: Acribia. 1996, 220.

BURDA, K. A. Research Note: Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit-products marketed in New South Wales. **Journal of Food Protection**. 1992, 55 (10) 796-798.

CARVALHO, J. M. British Importers of Brazilian Fruit: Transaction Characteristics. In: **IV International Conference on Agri-Food Chain/Networks Economics and Management**. USP, 2003.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2003, 2 ed, Unicamp.

CELLI, M.G.; COELHO, A.R.; WOSIACKI, G.; GARCIA, C.H. Patulin: Incidence and Control in apple products. Semina: **Ciências Agrárias**, 2009, 30: 135-161.

COELHO, A. R.; HOFFMAN, F. L.; HIROOKA, E. Y. **Ciências Agrárias**, 2003, 24: 337-358.

COLLINS, C. H. O aperfeiçoamento da cromatografia em camada delgada. **Science Crhomatografica**. 2010, 5-9.

COLLINS, C. H. O desenvolvimento da cromatografia em camada delgada. **Science Crhomatografica**. 2010, 5-12.

COMMISSION DIRECTIVE 2003/78/EC (2003). **Official Journal of the European Union**. 203, 40.

CÓRDOVA, K. R. V. Desidratação osmótica e secagem convectiva de maçã Fuji comercial e industrial. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba - PR. 2006, 148f.

CUNHA, S.C.; FARIA, M.A.; FERNANDES, J.O. Determination of patulin in apple and quince products by GC-MS using 13C5-7 patulin as internal standard. 2009, 352-359.

CHO, Y.; HWANG, J.K. Modeling the and intrinsic viscosity of pectin in acid solubilization of apple pomace. *Journal of Food Engineering*. 2000, 44:85-89.

DANESI, E. D.G; FUKUJI, T. S.; ALVES, G. L.; OLIVEIRA R. C. de; LINO M. C.; PRAÇA, V. A. Avaliação da influência da casca no processamento de sucos clarificados de maçãs Fuji e Gala. **Revista Acta Science. Technology**. 2007, 29 (1), 91-97.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**. 1998, 7:21-25.

DEMIRCI, M.; ARICI, M.; GUNUS, T. Presence of patulin in fruit juice produced in Turkey. *Ernahrungsumschau*. 2003, 50(7): 262-263.

DESMARCHELIER, A.; MUJAHID, C.; RACAULT, L.; PERRING, L.; PERRING, L.; LANCOVA, K. Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, 2011, 59(14): 7659-7665.

DINIZ, S. P. S. S. Micotoxinas. Livraria e Editora Rural, 2002, 181.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária**. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. 2007.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária**. Produção Integrada de Maçãs no Brasil. Disponível em: <http://www.Sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>, 2003. Acesso em: 12/05/ 2013.

FAO - **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. Statistical Databases. Disponível em http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp. Acesso em: 06/07/ 2013.

FRESH PLAZA - Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, 2009. Disponível em <http://www.Freshplaza.es/news>. 2003. Acesso em: 28/07/ 2013.

GARP- **Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas**, Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos, 1999.

GASPAR, E.M.S.M.; LUCENA, A.F.F. Improved HPLC methodology for food control – furfurals and Patulin markers of quality. **Food Chemistry**. 2009, 114: 1576-1582.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 1994, 458.

GOKMEN, V.; ACAR, J. Simultaneous determinations of 5- hydroxymethylfurfural and Patulin in apple juice by reversed- phase liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, 1999, 847:69-74.

GOKMEN, V.; ACAR, J.; SARIOGLU, K. Chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta**. 2005, 543:64-69.

GOKMEN, V.; ACAR, J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. **Journal of Chromatography A**. 1998, 815: 99 – 102.

GOULART, V. D. S., ANTUNES, E. C., ANTUNES, P. L. Qualidade de maçã Fuji osmoticamente concentrada e desidratada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2000, 160-163.

HERTER, F. G.; SACHS, S.; FLORES, C. A. Condições edafo-climáticas para instalação do pomar. In. MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRÁ, M. C. B. **A cultura do Pessegueiro**. Embrapa. Brasília, DF, 1998, 20-27.

HUNSCHE, M.; BRACKMANN, A.; ERNANI, P. R. Efeito da adubação potássica na qualidade pós-colheita de maçãs 'Fuji'. **Revista Pesquisa agropecuária brasileira**. 2003, 38: (4) 89-496.

HUSSEIN, S.H.; BRASSEL, M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**, 2001, 167:101-134.

IBRAF- **Instituto Brasileiro de Frutas**. Frutas Brasileiras em Ascensão. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em 14/09/2013.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 22/10/ 2013.

IHA, M.H.; SABINO, M. Determination of Patulin in Apple Juice by Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**. 2006, 89: 139 – 143.

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

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

JANOTOVÁ, L.; CÍZKOVÁ, H.; PIVONKA, J.; VOLDRICH, M. Effect of processing of apple puree on patulin content. **Food Control**. 2011, 977-981.

JELINEK, W. A.; HARRINGTON, J. P. The Chemistry and manufacture of mycotoxins on foods and feeds- an update. **Journal of AOAC**, 1989, 223-230.

JIAN- KE, LI.; RI-NA, WU.; QIU-HUI, HU.; JIAN-HUA, WANG. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. 2007, 530-534.

JIMINIZ, M.; MATEO, R.; QUEROL, A.; HUERTA, T.; HERNANDEZ, E. Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in seeds and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia*. 1991, 115(2), 121-127.

JUNIOR, M.M.; OLIVEIRA, R.C.; BANDO, E. Intralaboratory optimization and validation of a method for patulin determination in grapes by thin-layer chromatography. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2007, 38:304-308.

KATERERE, D. R.; STOCKENSTROM, S.; SHEPHARD, G.S. HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings. 2008, 389-392.

KUMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**. 2008, 27: 891 – 905.

KLUGE, R. A.; JACOMINO, P. A. Shelf life of peach treated with 1- methyl cyclopropene. **Scientia Agricola**, 2002, 59 (1), 69-72.

KLUGE, R. A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELO, J. C.; BILHALVA, A. B. Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado. Campinas: Emopi, 2002. 214 p.

KRUBE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**. 2009, 651:75-80.

LANÇAS, FM.; A Cromatografia líquida moderna e a Espectrometria de massas: Finalmente compatíveis. **Scientia Chromatographica**. 2004, 1(2): 36-61.

LANÇAS, F.M. Extração em Fase Sólida (SPE) / Fernando M. Lanças - RiMa, 2004.

LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G.S. Patulin in south African commercial apple products. *Food Control*. 2001, 12(2): 73-76.

LO, L. C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R. L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 1996, 49, 21-31.

LUBY, J.J. *Taxonomic Classification and Brief History*. [autor do livro] D.C. Ferree e I.J. Warrington. *Apples - Botany, Production and Uses*. Cambridge. 2003

LUH, B. S. Nectars, pulp juice and fruit juice blends. In: NELSON, P., TRESSLER, D. *Fruit and vegetable juice processing technology*. Wesport: AVI, 1980, 436-505.

MACDONALD, S., LONG, M., GILBERT, J., FELGUEIRAS, I., BRERA, C., JORGENSEN, K. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear

and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. **Journal of AOAC International**. 2000 83(6):1387–1394.

MADAIL, J. C. M. Produção Nacional e Mundial. In: RASEIRA, M. C. B.; QUEZADA, A. C. **Pêssego Produção**. Embrapa Informação Tecnológica. 2003, 11.

MAHFOUD, R.; MARESCA, M.; GARMY, N.; FANTINI, J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 2002, 181 (3), 1209–1218.

MAJERUS, P.; KAPP, K. *Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.8 - Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU member States*. 2002. Disponível em: http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.8_en.pdf. Acesso em: 15/02/2014.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Roca, 1999. 1179p.

MAPA, **Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento**, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 19/10/2013.

MARIN, S.; MORALES, H.; SANCHIS, V.; ROVIRA, A.; RAMOS, A.J. Patulin accumulation in apples during postharvest: Effect of controlled atmosphere storage and fungicide treatments. **Food Control**. 2007, 1443-1448.

MCKINLEY, E. R.; CARLTON, W. W.; BOON, G. D. Patulin mycotoxicosis in the rat: toxicology, pathology, and clinical pathology. *Food and Chemical Toxicology*. 1982, 20 (3), 289-300.

MEDEIROS, C.; RASEIRA, M. (Org.). **A cultura do pessegueiro**. SPI, 1998.

MILLER, J. D. Mycotoxins. In: WORKSHOP ON MYCOTOXINS IN FOOD IN AFRICA: **International Institute for Tropical Agriculture**. 1995, 18- 22.

MOAKE, M. M.; PADILLA-ZAKOUR, O.; WOROBO, R. W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 2005, 4 (1), 8-21.

MOUKAS, A.; PANAGIOTOPOULOU, V.; MARKAI, P. Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. **Analytical Methods**. 2008, 109: 860 – 867.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **J. Food Science**. 2006, 71:5: 51-65.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopatology**. 1992, 30: 369-389.

NICHOLSON, R. L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular

and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**. 1995, 21: 95-99.

OLIVEIRA, A. Q.; VALENTE, S. Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa. 2001, 60 (2): 129-134.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R. G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e *Elisa* na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2000, 20 (3): 369-374, 2000.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to penicillium taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**. 2004, 155(7):507-513.

PAVLOVIC, D. M. *et.al.* Sample Preparation in analysis of pharmaceuticals. Trends in **Analytical Chemistry**. 2007, 26: 1062-1075

PENTEADO, S. R. **Fruticultura de clima temperado em São Paulo**. Fundação Cargil. 1986, 55-91

PEREIRA, L.; J. A. Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos. Tese Doutorado em Engenharia Química e Biológica, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2008.

PEREIRA, M. L. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. B. Ceppa. 2002, 20: 141-156.

PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Med. Bul.** 2000, 56: 184 192.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. Revue de Médecine Veterinaire. 1998, 149:479-492.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**. 2011, 3(1): 51-64.

PRIETA, J.; MORENO, A.; DIAZ, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. Survey of patulin in apple juice and childrens apple food by the diphasic dialysis membrase procedure. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 1994, 42(8): 1701- 1703.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. Química Nova. 2001, 24: 68-76.

RASEIRA, M. C.; NAKASU, B. H. Cultivares: descrição e recomendação. In.

RASEIRA, M. C. B.; MEDEIROS, C.A. **A cultura do pessegueiro**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF. 1998, 29-97.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**. 2004, 15: 479-483, 2004.

RIBANI, M. *et. al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 2004, 27: 771-780.

RICHARD, J.L. Some major mycotoxins and their micotoxicoses- An overview, **International Journal of Food Microbiology**, 2007, 119:3-10.

RIDGWY, K.; LALLIE, S.P.D.; SMITH, R.M. Sample preparation Techniques for trace residues and Contaminants in food. **Journal of Chromatography A**. 2007, 1153: 36-53.

RI-NA, WU.; YA-LI, DANG.; LE, NIU.; HONG, HU. Application of matrix solid-phase dispersion–HPLC method to determine patulin in apple and apple juice concentrate. 2008, 582-586.

RITIENI, A. Patulin in Italian commercial apple products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2003, 51(20): 6086- 6090.

RYCHLIN, M.; SCHIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research & Technology, Berlin**. 2001, 212: 3, 274-278.

ROACH, J.A.G.; WHITE, K.D.; TRUEKSESS, M.W.; THOMAS, F.S. Capillary Gas Chromatography/ Mass Spectrometry With Chemical Ionization and negative Ion Detection for confirmation of Identity of Patulin in Apple juice. **Journal AOAC International**. 2000, 83:104-112.

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

SABINO, M; OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. Atheneu. 1996: 461- 472.

SAINZ, R. L. Suco clarificado de pêsego [*Prunus persica*(L.) Batsch]: processamento, vida de prateleira, comportamento enzimático, físico, químico e sensorial. 2006. 165p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SANT'ANA, A. S.; SIMAS, R. C.; ALMEIDA, C. A. A.; CABRAL, E. C.; R H. RAUBER, R.H.; MALLMANN, C.A.; EBERLIN, M.N.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, R. P. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssoschlamys nivea* and *Byssoschlamys fulva*. **International Journal of Food Microbiology**. 2010, 156-163.

SARGENTIL, S.R.; ALMEIDA, C.A.A. Determination of patulin in apple juice by HPLC using a simple and fast sample preparation method. *Eclética Química*. 2010, 35(2).

SEAB, **Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento**, fruticultura análise da conjuntura agropecuária, 2012.

SEBRAE- **Serviço Brasileiro de apoio as micro e pequenas empresas**
<http://www.sebrae.com.br/setor/fruticultura/o-setor/frutas>

SECEX, **Secretaria de Comércio Exterior**. Disponível em: <<http://www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex/>>. Acesso em: 19/10/ 2013.

SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Add. Contam.** 2008, 25:2 146–151.

SEWRAM, V.; NAIR, J.J.; NIEUWOUDT, T.W.; LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G.S. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography –atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.** 2000, 897: 365 – 374.

SHEPHARD, G.S.; LEGGOTT, N.L. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. **Journal of Chromatography A.** 2000 882: 17–22.

SILVA, S.J.N.; SCHUCH, P.Z.; BERNADI, C.R.; VAINSTEIN, M.H.; JABLONSKI, A.; BENDER, R.J. Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends. **Revista Brasileira de Fruticultura.** 2007, 29: 406 – 413.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC method development. 1997.

SONGSERMSAKUL, P.; Razzazi- Fazili, E.A.; Review of Recent Trends in Applications of for Detection of Mycotoxins. **Journal of Liquid Chromatography e Related Technologies.** 2008, 31: 1641-1686.

SOUZA, M. M.; RECARTE, M. R.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa L.*). **Revista do Instituto Adolf Lutz.** 2009, 68 (2) 192-200.

SOUZA, V. C., OCÁCIA, G. C., Cinética da secagem de maçã em secador convectivo VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.

SUPELCO - Guide to Solid Phase Extraction, Bulletin 910, In: *Sigma Aldrich*, 27.06.2013, Disponível: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>. 1999.

SWEENEY, M.R.; DOBSON, A.D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, 1998, 43:141-158.

SYLOS, C. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, 1999, 16 (2), 71-74.

TIBOLA, C. S.; FACHINELLO, J.C. Tendências e estratégias de mercado para a fruticultura. **Revista Brasileira de Agrociência**. 2004,10: 145.

TORALLES, R. P. **Purê de pêssego [*Prunus persica* (L.) Batsch]: escurecimento e controle, comportamento reológico e sensorial**. 2005. 175p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

UGWUANYI, J.O.; OBETA, J.A.N.; Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999, 79: 1054 – 1059.

WANG, Q.; PAGÁN, J.; SHI, J. Pectin from fruits. 2002, 1 - 47.

WELKE, J.L.; HOELTZ, M.; DALTORI, H.A.; NOLL, I.B. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. **Food Control**, 2008 2048–52.

WHO, World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants.

WHO. Forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives Technical Report Series. 1995, 859:368.

WOROBO, R.W.; MOAKE, M.M.; PADILLA-ZAKOUR, O.I. Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 2005, 1: 8 – 21.

YAPO, B.N.; ROBERT, C.; ETIENNE, I.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties sugar but pulp pectin extraction. *Food Chemistry*. 2006.

ZAMBIAZI, R. C. Ação de agentes químicos na inibição do escurecimento durante o processamento e armazenamento de maçãs desidratadas (*Malus domestica* Bork.L). 1987. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ZANETTE, F.; BIASI, L. A. Introdução à fruteiras de caroço. In. MONTEIRO, L. B.; MAY-DE MIO, L. L.; SERRAT, B. M.; MOTTA, A.C.; CUQUEL, F. L. **Fruteiras de Caroço: uma visão ecológica**. 2004, 1-32.

