

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**CARATERIZAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE
PATULINA: DESENVOLVIMENTO, AGRESSIVIDADE E
ACUMULAÇÃO DE MICOTOXINA EM FUNÇÃO DAS
CARATERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS MAÇÃS**

Cristiana Isabel Marques Duarte

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria
Manuel Lopes e coorientada pela Professora Doutora
Cristina Almeida

Mestrado em Qualidade Alimentar e Saúde

2018

Resumo

Nos dias de hoje existe uma grande preocupação por parte das entidades responsáveis pela segurança alimentar nos níveis de micotoxinas nos géneros alimentícios. A patulina é uma dessas micotoxinas, a qual tem vindo a ganhar grande importância devido aos efeitos tóxicos que provoca no ser humano e nos animais. Esta micotoxina encontra-se sobretudo nas maçãs e nos seus produtos derivados, e é produzida por uma ampla gama de espécies fúngicas do género *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*. *Penicillium expansum* é considerado o principal produtor de patulina. Os estudos realizados com esta micotoxina demonstraram efeitos genotóxicos, embriotóxicos, neurotóxicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos.

A JECFA (Comissão Conjunta de Peritos em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS)) estabeleceu como dose diária admissível máxima provisória de patulina (PMTDI) 0,4 µg/kg de peso corporal. A União Europeia estabeleceu limites máximos de patulina nos alimentos de 25 µg/kg para produtos sólidos à base de maçã (inclui compota e puré de maçã) e 50 µg/kg nos sumos de frutos, sumos de frutos concentrados e néctares.

Nos frutos, os fungos produtores de patulina necessitam das condições necessárias para produzir essa micotoxina, as quais, dependem de fatores ambientais, como a atividade da água, temperatura, atmosfera, e de fatores químicos e físicos típicos do substrato, como o pH e composição nutricional.

Deste modo, o objetivo deste trabalho é caracterizar as principais espécies fúngicas produtoras de patulina e correlacioná-las com as condições ou características das maçãs que favorecem a produção desta micotoxina. Selecionaram-se nove variedades de maçã (Bravo Esmolfe, Fuji, Golden, Granny Smith, Pink Lady, Red Delicious, Reineta, Royal Gala e Starking) e procedeu-se à sua caracterização morfológica e físico-química.

Para a caracterização físico-química das maçãs avaliou-se o pH, o resíduo seco, a cinza, os açúcares totais, a vitamina C e os minerais (cálcio, magnésio, alumínio, ferro, níquel, cádmio, cromo e chumbo). As várias variedades de maçã não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) relativamente à sua composição físico-química.

Para quantificar a patulina nas várias variedades de maçã procedeu-se à otimização e validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência com

detetor de ultra-violeta (HPLC-UV) após extração e limpeza dos extratos de maçã por extração em fase sólida (SPE).

O método de HPLC-UV é linear nas gamas de concentração de 10 – 80 µg/L e 20 – 100 µg/L, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,995, coeficientes de variação do método (CV_m) inferiores a 5% e com um valor teste inferior ao valor F tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor para um grau de confiança de 95%. O método também apresentou uma boa precisão em condições de repetibilidade e de precisão intermédia com valores de desvio padrão relativo inferiores a 10%. O método apresenta uma boa veracidade (erro < 10%).

Das variedades testadas as que apresentaram maiores concentrações de patulina (PAT) foram a Granny Smith (29 µg/kg PAT), Fuji (27 µg/kg PAT) e Royal Gala (24 µg/kg PAT), com diferentes graus de apodrecimento, nomeadamente 25%, 50% e 100%, respetivamente.

A nível microbiológico os fungos mais frequentes foram *Penicillium expansum* presentes em todas as variedades de maçãs, *Alternaria alternata* e *Cladosporium* sp.

Palavras chave: Maçã, HPLC-UV, micotoxinas, patulina, fungo.

Abstract

Nowadays there is a great deal of concern from the responsible entities for food safety regarding the levels of mycotoxins in foodstuffs. Patulin is one of these mycotoxins, which has been gaining great importance due to the toxic effects it causes in humans and animals. This mycotoxin is found mainly in apples and their by-products, and is produced by a wide range of fungal species of the genus *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssochlamys*. *Penicillium expansum* is considered the main producer of patulin. Studies with this mycotoxin have demonstrated genotoxic, embryotoxic, neurotoxic, hepatotoxic and nephrotoxic effects.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) established as the provisional maximum tolerable daily intake dose of patulin (PMTDI) 0.4 µg/kg of the body weight. The European Union has established maximum levels of patulin in foods of 25 µg/kg for solid apple-based products (including apple jam and applesauce) and 50 µg/kg in fruit juices, concentrated fruit juices and nectars.

In fruits, patulin-producing fungi need the necessary conditions to produce this mycotoxin, which depends on environmental factors such as water activity, temperature, atmosphere, and chemical and physical factors typical of substrate, such as pH and nutritional composition.

Thus, the objective of this work is to characterize the main fungal species that produce patulin and to identify the conditions or characteristics of the apples that favor the production of this mycotoxin. Nine apple varieties (Bravo Esmolfe, Fuji, Golden, Granny Smith, Pink Lady, Red Delicious, Reineta, Royal Gala and Starking) were selected and their morphometric and physical-chemical characterization were performed.

The pH, dry matter, ash, total sugars, vitamin C and minerals (calcium, magnesium, aluminum, iron, nickel, cadmium, chromium and lead) were evaluated for physicochemical characterization of the apples. The various apple varieties showed no statistically significant differences ($p < 0.05$) with respect to their physicochemical composition.

To quantify patulin in the various apple varieties, the High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector (HPLC-UV) method was optimized and validated after extracting and cleaning apple extracts by Solid Phase Extraction (SPE).

The HPLC-UV method is linear in the concentration ranges 10-80 µg/L and 20 - 100 µg/L, with determination coefficients (r^2) higher than 0.995, coefficient of variation

of the method (CV_m) of less than 5% and with a test value less than the F-value of the Fisher-Snedecor test or the Mandel test for a confidence level of 95%. The method also showed good accuracy under conditions of repeatability and intermediate accuracy with values of relative standard deviation less than 10%. The method showed a good accuracy (error <10%).

From the varieties tested, the highest levels of patulin (PAT) were found in the Granny Smith (29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PAT), Fuji (27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PAT) and the Royal Gala (24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PAT), with different degrees of decay, namely 25%, 50% and 100%, respectively.

At the microbiological level, the most frequent fungi were the *Penicillium expansum*, present in all apple varieties, *Alternaria alternata* and *Cladosporium* sp.

Key words: Apple, HPLC-UV, mycotoxins, patulin, fungi.

Agradecimentos

Os agradecimentos que vou apresentar são direcionados para todas as pessoas que ao longo deste ano contribuíram para que fosse possível concluir esta dissertação. Algumas pessoas contribuíram de uma forma direta, outras ajudaram com o seu carinho, apoio e amizade.

À Professora Doutora Maria Manuel Lopes que, como orientadora desta dissertação, transmitiu-me todos os conhecimentos de Microbiologia necessários para a elaboração da mesma. Agradecer também por todo o apoio e ajuda durante todo o trabalho prático e na escrita da dissertação, ao nível das correções dos textos. E por toda a sua disponibilidade, incentivo e boa disposição que me ajudaram a terminar esta dissertação.

À Professora Doutora Cristina Almeida que, como coorientadora desta dissertação, me transmitiu todos os conhecimentos químicos necessários para realizar este trabalho tanto ao nível teórico como prático e me deu muitos conselhos que me irão ajudar a crescer enquanto profissional. Apoiou-me durante todo o trabalho experimental e também durante a elaboração da tese, apoiou-me e ajudou-me ao nível da organização do trabalho escrito e da correção dos textos. Quero agradecer por toda a paciência que teve comigo, por todas as horas que abdicou do seu tempo para me ajudar na escrita da tese, e por nessas horas mesmo nos momentos de alguma tensão surgir a sua boa energia e boa disposição para me fazer rir. Foi incansável a dedicação que teve para que me ajudar para que todo este trabalho fosse concluído. E também lhe agradeço por conseguir surpreender-me sempre com as suas habilidades e por tudo o que consegui aprender consigo, nunca irei esquecer.

À Doutora Lucília Vales que me apoiou e ajudou incondicionalmente na realização do trabalho prático. Agradeço toda a sua disponibilidade, carinho e incentivo.

À Dona Maria Teresa Vieira que esteve sempre pronta para me ajudar nas preparações dos meios de cultura, e em tudo aquilo que lhe fosse possível. Agradeço todo o seu carinho e dedicação.

À Sofia Silva, colega de laboratório, por toda a sua pronta disponibilidade a ajudar nos trabalhos experimentais, pela sua simpatia, boa disposição e pela sua companhia.

A todos os colegas de laboratório, Carolina e Dennis, pelas suas palavras de incentivo, boa disposição e simpatia.

À minha família, nomeadamente os meus pais e os meus irmãos, que me apoiaram incondicionalmente em tudo ao longo da realização deste trabalho. Agradeço por toda a paciência, incentivo, amor e por ajudarem-me sempre a ultrapassar todos os momentos. E a toda a minha restante família agradeço por todo o apoio prestado e carinho.

A todos os meus amigos por todo o carinho, amizade e apoio fundamentais para a elaboração desta tese.

Símbolos, siglas, acrónimos e abreviaturas

A

a	Ordenada na origem na equação da reta, $y = a + bx$
Abs	Absorvância
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
$A_{máx}$	Absorvância da solução de patuilna no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvância (276 nm)
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> , Associação dos Químicos Analíticos Oficiais
ARN	Ácido ribonucleico
ATA	Aleucia tóxica alimentar
a_w	Atividade da água

B

b	Declive da equação da reta, $y = a + bx$
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabrico
BrE	Bravo Esmolfe

C

C	Concentração (m/V)
CMPAA	Comissão Mista FAO/OMS de Peritos em Matéria de Aditivos Alimentares
$CV_m, \%$	Coefficiente de variação do método

D

DAS	Diacetoxiscirpenol
DON	Desoxinivalenol
DP	Desvio padrão
DPR, %	Desvio padrão relativo
Delta (δ)	Percurso ótico da célula (cm)

E

ϵ	Coefficiente de absorção molecular para a solução de patulina a 276 nm
EC	<i>European Commission</i> , Comissão Europeia
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> , Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

F

F	Valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor
FAO	<i>Food and Agriculture Organisation</i> , Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database</i> , Base Estatística Corporativa da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FB1	Fumonisina B1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Agência Americana de Controlo da Qualidade de Produtos Alimentares e Farmacêuticos
Fuj	Fuji
FUX	Fusarenona-X

G

Gd	Golden
GrS	Granny Smith

H

HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i> , Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo
HLPC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HMF	5-Hidroximetilfurfural
HT-2	Micotoxina, tricoteceno, (15-Acetoxy-3 α ,4 β -dihidroxi-8 α -(3-metilbutiriloxi)-12,13-epoxitricotec-9-eno)

I

IAC	<i>Immunoaffinity column</i> , Colunas de Imunoafinidade
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> , Agência Internacional de Investigação em Cancro
INE	Instituto Nacional de Estatística
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

J

JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives of the United Nations</i> , Comissão Conjunta de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO/OMS
-------	---

L

LALA	Laboratório de Águas do Litoral Alentejano
LD	<i>Limit of Detection</i> , Limite de Detecção
LQ	<i>Limit of Quantification</i> , Limite de Quantificação

M

MA	Malte Agar
Malonil-CoA	Malonil coenzima-A
MApc	Malte Agar com penicilina G e cloranfenicol
MS	Mass Spectrometer, Espectrómetro de Massa
6-MSA	6-metil-salicílico
MS/MS	Espectrómetro de massa de triplo quadrupolo

N

<i>n</i>	Número de ensaios ou número de réplicas realizadas
N	Número de pontos experimentais da curva de calibração, independentes entre si
NADPH	<i>Dihyronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate</i> , Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Fosfato
NIV	Nivalenol

O

OE	Oxidação Eletrolítica
OMS	Organização Mundial de Saúde

P

<i>p</i>	Probabilidade de significância
<i>p.a.</i>	Pró-análise
PAT	Patulina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação de Polimerização em Cadeia

PDA	Potato Dextrose Agar, Meio de cultura com agar, dextrose e batata
PE	Polietileno
PkL	Pink Lady
PM	Peso molecular
PMTDI	<i>Provisional maximum tolerable daily intake</i> , Dose Diária Admissível Máxima Provisória
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i> , cloreto de polivinilo
R	
r^2	Coefficiente de determinação da reta
RD	Red Delicious
Ref.	Referência
Rein	Reineta
RG	Royal Gala
S	
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual de uma função linear
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> , Extração em Fase Sólida
Stk	Starking
T	
T-2	Micotoxina, tricoteceno, (2 α ,3 α ,4 $\beta\alpha$)-4,15-bis(acetoxi)-3-hidroxi-12,13-epoxitricotec-9-en-8-il 3-metilbutanoato)
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> , Cromatografia em Camada Fina

U

UFC Unidades Formadoras de Colónias

UV Ultravioleta

V

VT Valor teste para o estudo de funções lineares

V/V Volume/Volume

W

WHO *World Health Organization*, Organização Mundial de Saúde

Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Agradecimentos	v
Símbolos, siglas, acrónimos e abreviaturas	vii
Índice	xiii
Índice de figuras.....	xvi
Índice de tabelas	xix
Introdução.....	1
Capítulo I - Micotoxinas.....	7
1. Definição, ocorrência e problema	8
2. Ocorrência em produtos alimentares	10
2.1 Aflatoxinas	13
2.2 Tricotecenos	14
2.3 Fumonisinias.....	15
2.4 Zearalenona.....	15
2.5 Ocratoxinas.....	16
2.6 Patulina.....	16
3. Fungos produtores de micotoxinas	17
4. Controlo das micotoxinas nos produtos alimentares	19
Capítulo II – Patulina	21
1. Breve nota histórica	22
2. Caracterização química.....	22
3. Biossíntese da patulina.....	23
4. Ocorrência de patulina nos géneros alimentícios.....	24
5. Toxicidade	27
6. Controlo da contaminação por patulina.....	29
7. Legislação aplicável.....	32
8. Métodos analíticos: análise de patulina	33
Capítulo III – Maçãs: frutos e sumos	35
1. Apresentação do fruto	36
2. Produção e consumo de maçãs.....	36
3. Ciclo produtivo da maçã	39
4. Variedades de maçãs	40
5. Qualidade das maçãs	43
5.1 Requisitos mínimos da qualidade das maçãs.....	43

5.2	Importância da maturação das maçãs.....	44
5.3	Classificação das maçãs.....	44
6.	Composição química.....	46
7.	Consumo de maçãs e benefícios para a saúde.....	48
8.	Sumos de maçã.....	48
8.1	Processo de Produção de sumos.....	49
Capítulo IV – Parte experimental.....		51
Parte A – Análise química.....		52
1.	Equipamento e material.....	52
1.1	Equipamento.....	52
1.2	Material.....	53
2.	Reagentes.....	54
2.1	Gerais.....	54
2.2	Padrões.....	55
3.	Soluções.....	55
3.1	Determinação de metais.....	55
3.2	Determinação da dureza total (cálcio e magnésio).....	55
3.3	Determinação dos açúcares totais.....	56
3.4	Determinação do teor de ácido ascórbico.....	57
3.4.1	Soluções gerais.....	57
3.4.2	Soluções padrão.....	57
3.5	Determinação da patulina.....	58
3.5.1	Soluções gerais.....	58
3.5.2	Soluções de calibração.....	59
3.5.3	Soluções padrão para o estudo da linearidade.....	61
3.5.4	Soluções padrão para o estudo da homogeneidade de variâncias.....	61
4.	Amostras.....	61
5.	Determinação das características físico-químicas das maçãs.....	62
5.1	Determinação do resíduo seco de maçã.....	62
5.2	Determinação do pH.....	62
5.3	Determinação do teor de cinzas.....	63
5.4	Determinação do cálcio e da dureza.....	63
5.4.1	Determinação da dureza.....	63
5.4.2	Determinação do cálcio.....	64
5.4.3	Determinação do magnésio.....	64
5.5	Determinação de açúcares.....	65
5.6	Determinação do teor de ácido ascórbico.....	66
6.	Determinação da patulina.....	68

6.1	Pré-tratamento das amostras	68
6.1.1	Extração	68
6.1.2	Purificação do extrato por SPE	69
6.2	Condições cromatográficas	69
	Parte B – Isolamento e identificação fúngica	71
1.	Equipamento e material	71
2.	Reagentes e meios de cultura	71
3.	Procedimento da análise micológica nas amostras de maçã	71
4.	Identificação micológica das amostras de maçã	72
4.1	Técnica da fita-cola	72
4.2	Técnica da cultura dilacerada.....	72
	Capítulo V – Resultados e discussão	75
	Parte A – Análise química.....	76
1.	Caracterização morfométrica dos frutos	76
2.	pH.....	78
3.	Resíduo seco.....	79
4.	Cinza	79
5.	Cálcio e magnésio	80
6.	Açúcares totais	81
7.	Vitamina C.....	82
8.	Metais.....	83
9.	Avaliação das características das maçãs	83
10.	Análise da patulina	84
10.1	Estudo da linearidade.....	84
10.2	Precisão e veracidade instrumental.....	86
10.3	Limites analíticos	88
10.4	Análise das amostras	88
	Parte B – Isolamento e identificação fúngica	95
1.	Identificação fúngica	95
	Capítulo VI – Conclusões e perspectivas futuras	99
	Bibliografia	103

Índice de figuras

Figura 1 - Diagrama representativo das várias etapas de produção de alimentos.	10
Figura 2- Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.	13
Figura 3 - Estrutura química dos tricotecenos, Tipo A, Tipo B, Tipo C e Tipo D.	14
Figura 4 - Estrutura química da fumonisina B1.	15
Figura 5 - Estrutura química da zearalenona.	16
Figura 6 - Estrutura química da ocratoxina A.	16
Figura 7 - Estrutura microscópica de <i>Aspergillus</i> sp. (125).	18
Figura 8 - Estrutura microscópica de <i>Penicillium</i> sp. (125).	18
Figura 9 - Estrutura microscópica de <i>Fusarium</i> sp. (126).	19
Figura 10 - Estrutura química da patulina (138).	22
Figura 11 - Diagrama da biossíntese da patulina.	23
Figura 12 - Maçã Royal Gala podre e infetada com <i>Penicillium expansum</i> (167).	26
Figura 13 - Toxicidade da patulina nos seres humanos.	28
Figura 14 - Produção de maçãs desde 1961 a 2016 em Portugal (FAOSTAT).	37
Figura 15 - Produção de maçãs desde 1961 a 2016 na União Europeia (FAOSTAT).	38
Figura 16 - Produção de maçãs desde 2013 até 2017 em Portugal (INE).	38
Figura 17 - Ciclo produtivo das maçãs (225).	39
Figura 18 - Composição nutricional da maçã com casca.	46

Figura 19 - Distribuição energética da maçã com casca.....	47
Figura 20 - Processamento de sumos de maçã.	49
Figura 21 - Esquema do processamento das amostras de maçãs.	70
Figura 22 - Esquema do processamento das amostras de maçãs.	73
Figura 23 - Massa (g) das várias variedades de maçãs (n = 10).	76
Figura 24 - Altura (cm) das várias variedades de maçãs (n = 10).....	77
Figura 25 - Largura (cm) das várias variedades de maçãs (n = 10).....	77
Figura 26 - pH das maçãs determinado por dois métodos, direto e indireto (após homogeneização em partes iguais com água).	78
Figura 27 - Perfil do resíduo seco das várias variedades de maçã.....	79
Figura 28 - Perfil em cinzas das várias variedades de maçã.	80
Figura 29 - Perfil em cálcio e magnésio das várias variedades de maçã, expressos em mg/100 g de maçã.....	80
Figura 30 - Perfil em açúcares totais das várias variedades de maçã, expressos em percentagem de glucose.	81
Figura 31 - Perfil em Vitamina C das várias variedades de maçã, expressos em mg/100 g de maçã.....	82
Figura 32 - Gama de trabalho da patulina por HPLC-UV (gama baixa 10 – 80 µg/L): a) curva de calibração; b) análise de resíduos; c) teste de valores normalizados; d) teste de RIKILT; e) dados do teste de Mandel e do teste de homogeneidade de variâncias. (_ _ _) Critérios de aceitação.	87
Figura 33 - Perfil de apodrecimento das várias variedades de maçãs durante 18 semanas.	89

Figura 34 – Boxplot com o perfil da concentração da patulina nas várias variedades de maçãs com diferentes percentagens de apodrecimento.....94

Figura 35 - Exemplos de alguns fungos identificados.....95

Figura 36 – Caracterização fúngica das várias variedades de maçãs.98

Índice de tabelas

Tabela 1 - Micotoxinas e alimentos onde a sua frequência de contaminação é maior.	12
Tabela 2 - Teores de patulina (PAT) presente em diferentes produtos alimentares.....	25
Tabela 3 - Teores máximos de patulina em determinados produtos alimentares.	32
Tabela 4 - Variedades de maçãs mais cultivadas em Portugal.....	41
Tabela 5 - Variedades de maçãs menos cultivadas em Portuga	42
Tabela 6 - Máximo de defeitos permitidos nas maçãs	45
Tabela 7 - Composição nutricional das diferentes variedades de maçãs.....	47
Tabela 8 - Condições cromatográficas para a análise de patulina por HPLC-UV.	69
Tabela 9 - Concentração dos metais das várias variedades de maçã (n=3).....	83
Tabela 10 - Gama de linearidade da patulina por HPLC-UV (gama inicial de concentrações), limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ).	84
Tabela 11 - Gama baixa de linearidade da patulina por HPLC-UV, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ).	85
Tabela 12 - Gama de trabalho e gama linear (gama alta) da patulina por HPLC-UV, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ).	85
Tabela 13 - Desvio padrão relativo determinado em condições de repetibilidade e erro do método de HPLC-UV para a determinação da patulina (n=10).....	86
Tabela 14 - Concentração mediana em patulina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) nas várias variedades de maçã com diferentes graus de apodrecimento.	90

Tabela 15 - Desvio padrão relativo das diferentes leituras nas várias variedades de maçã com diferentes graus de apodrecimento.92

Tabela 16 - Identificação fúngica nas diferentes variedades de maçãs.96

Introdução



Introdução

A deterioração das frutas e vegetais e o desenvolvimento de fungos favorece a produção de metabolitos tóxicos, as micotoxinas. Estas são metabolitos secundários desenvolvidos por determinados fungos em condições ambientais particulares, os quais apresentam um espectro diversificado de toxicidade (1). Estes contaminantes naturais são substâncias de baixo peso molecular e podem afetar uma elevada variedade de alimentos, como por exemplo, cereais, frutos secos, café, cacau, especiarias, feijão e frutas, particularmente maçãs (2). Devido ao potencial risco para a saúde dos consumidores, têm-se realizado um elevado número de estudos de ocorrência por todo o mundo e desenvolvido vários métodos para a sua determinação nos diversos produtos alimentares (3). Exemplos de alguns desses estudos foram realizados em Portugal (1), Itália (4, 5), África do Sul (6), Bélgica (7), Grécia (8) e Dinamarca (9).

No grupo das micotoxinas, a patulina tem sido alvo de muitos estudos, pois há uma grande preocupação com os riscos para a saúde associados a esta micotoxina. Nos roedores, a patulina pode ser responsável por sintomas agudos graves, tais como, convulsões, náuseas, ulcerações, inflamação intestinal e vômitos, e efeitos crónicos que incluem genotoxicidade, imunotoxicidade, neurotoxicidade, embora os efeitos em humanos ainda não estejam bem esclarecidos (3, 10). A patulina é genotóxica mas não existe evidência da sua carcinogenicidade nos estudos em animais e em humanos, por isso está classificada no grupo 3 da IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (11, 12).

A patulina é uma lactona heterocíclica insaturada designada por 4-hidroxi-4H-furo-[3,2-c]pirano-2(6H)-ona, sendo um metabolito secundário tóxico produzido por uma ampla gama de espécies fúngicas dos géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys* que crescem em vários tipos de frutas (1, 13). Inicialmente, a patulina apresentava propriedades antibióticas, mas esta teoria foi excluída pelo facto desta micotoxina apresentar efeitos imunotóxicos, genotóxicos, embriotóxicos e neurotóxicos nos animais (14, 15).

As maçãs e os produtos derivados de maçã são excelentes substratos para o fungo *Penicillium expansum*, o agente responsável pelo aparecimento do chamado “bolor azul”, sendo considerado o principal fungo produtor de patulina. O agente patogénico do fruto está normalmente associado a frutas contaminadas e em fase de decomposição ou a frutas do pomar já infetadas por outros microrganismos, bem como em determinadas condições pós-colheita (5).

A patulina é considerada um indicador de qualidade dos produtos processados à base de maçãs (16), pois, após o processamento desses produtos, a toxina ainda se encontra em concentrações apreciáveis (17). Como no processamento dos produtos de maçã são realizados vários processos com o objetivo de remover ou reduzir a concentração em patulina, a fruta de origem ou matéria prima, nomeadamente maçãs, não deve estar podre ou contaminada. As maçãs podres, as frutas caídas ou as maçãs contaminadas, por exemplo por insetos ou aves, ou as frutas danificadas devido ao manuseamento excessivo são mais suscetíveis ao crescimento de fungos produtores de patulina (18). A remoção da parte podre da fruta não garante a eliminação completa da micotoxina, pois esta pode estar presente na parte sã da fruta (3).

Em 2001, a FDA (*Food and Drug Administration*) afirmou que a maior exposição à patulina é através do consumo de sumo de maçã produzido a partir de frutos bolorentos ou de frutos dos quais tenham sido retiradas as partes estragadas. Isto leva a uma grande preocupação, uma vez que os sumos de frutas, e em especial os sumos de maçã, são os mais consumidos por bebés e crianças (19, 20).

Devido à toxicidade da patulina, foi necessário estabelecer limites máximos que possam estar presentes nos produtos alimentares bem como as doses diárias admissíveis para o ser humano que não provoquem efeitos adversos na saúde humana. A JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, Comissão Conjunta de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO-OMS) estabeleceu como dose diária admissível máxima provisória de patulina (PMTDI) o valor de 0,4 µg/kg de peso corporal (21).

Tem sido investigado o desenvolvimento de fungos produtores de patulina em frutas, vegetais e produtos derivados e parece estar dependente de fatores como as condições das culturas, atividade da água (a_w), temperatura, pH e outras características químicas intrínsecas aos frutos (13).

As frutas são normalmente armazenadas à temperatura de refrigeração para retardar a senescência, mas também para suprimir a deterioração pós-colheita. Sob temperaturas refrigeradas a deterioração é lenta, mas quando as frutas são transferidas para locais com temperaturas superiores há uma rápida deterioração e acumulação de patulina. Assim, pode-se afirmar que as maçãs mantidas à temperatura ambiente, antes de serem processadas, é um ponto crítico para a acumulação de patulina (22). Alguns estudos demonstram que quanto maior o tempo de armazenamento das maçãs, maior é a probabilidade dos teores de patulina excederem os limites no produto final (20).

É necessário detetar rapidamente e especificamente os fungos produtores de patulina para que se garanta a qualidade das maçãs. Podem ser utilizadas técnicas convencionais baseadas na quantificação dos microrganismos usando as unidades formadoras de colónias (UFC) e os métodos de identificação utilizando técnicas morfológicas, mas estas técnicas são caras e demoradas, além de que exigem conhecimentos de micologia para identificar os fungos. Esta metodologia deve ser ainda procedida de técnicas analíticas para detetar micotoxinas produzidas pelos fungos identificados (23). Existem dois métodos de referência para estimar a presença de fungos em alimentos, que são designados por sementeira direta e sementeira por diluição. A sementeira por diluição é adequada para alimentos líquidos ou em pó, e em situações onde o conhecimento total da micoflora é relevante, enquanto a sementeira direta é adequada à análise de alimentos particularizados. Como os alimentos estão infetados com outras substâncias é necessário a limpeza destes alimentos, de forma a recuperar só os fungos presentes (24).

A escolha dos meios de cultura e das condições de incubação devem ser adequadas ao tipo de fungos que se querem isolar. Neste caso, os meios mais utilizados para o isolamento dos fungos presentes em maçãs são Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Dextrose Agar suplementado com antibióticos (cloranfenicol e vancomicina), Malt Agar (MA), Malt Agar com penicilina G e cloranfenicol (MApc) (25-27).

Também é necessário o desenvolvimento de métodos rápidos e simples para detetar e monitorizar os fungos durante o processamento de alimentos. Em alternativa aos métodos convencionais, pode-se recorrer a métodos utilizando reação de polimerização em cadeia ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sondas de ADN (ácido desoxirribonucleico), por serem métodos mais precisos, sensíveis e mais rápidos (23).

Existem vários métodos para a deteção e quantificação de patulina. O método usualmente utilizado para quantificar a patulina nos produtos de fruta é a cromatografia líquida de alta eficiência ou HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), o qual pode estar associado a vários tipos de detetores, desde o mais simples como o detetor ultravioleta até ao mais complexo como o espectrómetro de massa simples (MS) ou de triplo quadrupolo (MS/MS) (13).

Estes métodos instrumentais utilizados na determinação de micotoxinas em géneros alimentícios são muito dispendiosos, e para lidar com o crescente número de matrizes e com as micotoxinas de interesse foram desenvolvidos métodos mais rápidos, mais simples e precisos, como técnicas imunoquímicas, tais como ELISA

(*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ensaio de imunoabsorção enzimática), biossensores e técnicas não invasivas (28).

A maioria dos métodos utilizados para a determinação de uma micotoxina depende dos métodos corretos de extração e limpeza das amostras. Estas etapas são vitais para que o protocolo seja bem sucedido e afeta a escolha final do procedimento de deteção. O método de extração utilizado para remover a micotoxina da matriz biológica depende da estrutura da toxina (2). Para a extração e concentração da patulina e para a limpeza dos extratos complexos das amostras têm sido utilizadas várias técnicas, nomeadamente, colunas de imunoafinidade (IAC) ou cartuchos de extração em fase sólida (SPE), as quais ajudam a simplificar os protocolos, a melhorar a seletividade e, com isso, obter melhores resultados (28). A seleção das amostras e o conjunto representativo das amostras também são muitas vezes consideradas como fontes de erro (28).

Este trabalho teve como objetivo a caracterização das principais espécies fúngicas produtoras de patulina e também quais as condições ou características das maçãs que favorecem a produção desta micotoxina e está dividido em sete seções, nas quais são abordados os seguintes itens:

- Introdução. Conceito e caracterização sucinta das micotoxinas e da patulina em particular. Apresentação sumária dos métodos analíticos para a caracterização micológica das maçãs e para a quantificação da patulina nos frutos. Apresentação dos objetivos do trabalho.
- Capítulo I – Micotoxinas. Definição e tipos usualmente presentes nos produtos alimentares. Fungos produtores e métodos de prevenção.
- Capítulo II – Patulina. Breve nota histórica, caracterização química e biossíntese da patulina. Géneros alimentícios em que a patulina se encontra em maior quantidade e principais fungos produtores. Métodos para controlar a sua produção nos produtos alimentares, legislação aplicável e métodos analíticos utilizados na sua análise.
- Capítulo III – Maçãs e sumos. Apresentação do fruto, produção e consumo, ciclo produtivo, variedades mais representativas em Portugal, qualidade e composição química.
- Capítulo IV – Parte experimental. A parte experimental está dividida em duas partes, a Parte A, trabalho experimental químico e a Parte B, trabalho experimental microbiológico. Em ambas as partes é referido o equipamento, material, reagentes, soluções e os procedimentos analíticos utilizados.

- Capítulo V – Resultados e discussão. Apresentação e discussão dos resultados obtidos.
- Capítulo VI – Conclusões e perspectivas futuras. Apresentação das principais conclusões referentes à análise da patulina e à caracterização micológica das maçãs e correlação entre ambos os resultados.

Capítulo I - Micotoxinas



Capítulo I – Micotoxinas

1. Definição, ocorrência e problema

Os fungos que decompõem os alimentos têm a capacidade de produzir metabolitos secundários, designados por micotoxinas. As micotoxinas são substâncias químicas de baixo peso molecular e que apresentam propriedades tóxicas. Estes compostos não são essenciais para manter as células do fungo ativas, mas desenvolvem reações de toxicidade noutras espécies. As micotoxinas também têm como função dar aos fungos uma vantagem competitiva sobre outras espécies fúngicas e sobre as bactérias. Uma grande parte das micotoxinas é citotóxica, pelo que provocam uma rutura nas estruturas celulares, como por exemplo nas membranas, e interferem nos processos celulares vitais, como a síntese de proteínas, e a síntese de ácido ribonucleico (ARN) e de ácido desoxirribonucleico (ADN) (29).

As micotoxinas são produzidas por várias espécies de fungos que se desenvolvem em diversas plantas, nomeadamente, plantas de grande produtividade agrícola, como o milho e outros cereais, vários produtos alimentares, como frutos e legumes, as especiarias, as plantas medicinais e nas sementes de algodão (23, 30, 31).

Nos produtos agrícolas e alimentares podem desenvolver-se cerca de 100 000 espécies de fungos, e de entre estes mais de 200 podem produzir micotoxinas, como por exemplo, os fungos do género *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (31).

Inerente ao desenvolvimento analítico, têm-se identificado novas micotoxinas com estruturas muito diversificadas e, conseqüentemente, com propriedades físico-químicas e biológicas também muito diferentes (28), as quais conferem importância aos fungos do ponto de vista toxicológico.

Nem todas as micotoxinas são tóxicas para o ser humano ou para outras espécies. A toxicidade provocada no Homem pode ser agrupada em três grupos, toxicidade aguda, como hemorragias, convulsões, edema e ulceração intestinal, fraqueza muscular, dificuldades respiratórias, degeneração e necrose do miocárdio (32-34), subaguda como perda de peso, alterações intestinais e alterações na função renal (35-37) ou crónica como mutagenicidade, indução de hormonas, distúrbios gastrointestinais ou renais e imunossupressão (38). As micotoxinas foram diferenciadas em três grupos em relação ao grupo alvo da sua toxicidade (39):

- Zootóxicas: tóxicas para animais;
- Fitotóxicas: tóxicas para plantas;
- Antibióticas: tóxicas para bactérias.

Quando são tóxicas para os animais, as micotoxinas afetam principalmente o fígado, os rins e o sistema nervoso, endócrino e imunitário. Quando são inativadas no tubo digestivo antes de serem absorvidas ou mesmo quando não são absorvidas, não têm efeito tóxico (31).

Visto que são contaminantes que se apresentam de forma natural nos alimentos, não é possível eliminar totalmente a sua presença, pelo que é de extrema importância acompanhar todo o processo de produção dos alimentos que tendem a ser contaminados por fungos, para que os níveis de micotoxinas nesses alimentos sejam reduzidos para concentrações que não afetem a saúde humana (30). Além disso, também é de extrema importância vigiar os animais das pecuárias ou de outro tipo de exploração, pois estes podem apresentar micotoxinas que podem ser transferidas para o leite, ovos ou carne. É muito mais provável os animais serem afetados por micotoxinas do que os seres humanos (31). Isto deve-se ao facto das culturas contaminadas por fungos serem direcionadas para a alimentação animal (40). Os cereais e oleaginosas, alimentos suscetíveis de desenvolver fungos e terem micotoxinas, são a base da alimentação dos animais de criação, nomeadamente, aves, suínos e bovinos (41, 42). Os animais são expostos às micotoxinas através de alimentos que tenham na sua constituição grãos contaminados, ou pastagem com feno infetado (43).

Instituições e organizações internacionais, como a *European Commission* (EC), a *Food and Drug Administration* (FDA) americana, a *World Health Organization* (WHO) e a *Food and Agriculture Organization* (FAO) reconheceram que de facto estas micotoxinas presentes nos alimentos são prejudiciais para a saúde tanto do Homem como dos animais e conseqüentemente, estabeleceram valores limites para a presença destas substâncias por cada classe de micotoxinas. Para que estes limites fossem definidos, estas instituições e organizações tiveram que desenvolver um grande número de métodos analíticos de modo a ser possível identificar e quantificar as micotoxinas nas várias matrizes alimentares (28).

Historicamente houve dois casos dramáticos associados ao consumo de alimentos contaminados com micotoxinas e que conduziram a milhares de mortes, como o ergotismo (envenenamento por Ergot, envenenamento por cravagem do centeio ou Fogo de Santo António) e a aleucia tóxica alimentar (ATA) (31).

O ergotismo surgiu na Europa, afetando sobretudo os franceses durante a Idade Média. Esta micotoxicose provocava alucinações, dores insuportáveis nas mãos e nos pés seguidas da gangrena dos membros. O ergotismo foi associado ao consumo de cereais contaminados por *Claviceps purpurea* que origina a designada cravagem do

centeio. Nos dias de hoje esta doença é rara, apesar do fungo ser utilizado em farmacologia (31).

A aleucia tóxica alimentar surgiu na Rússia no final da Segunda Guerra Mundial e atinge principalmente a medula óssea, e os sintomas mais graves resultantes desta intoxicação passam pela redução da taxa dos glóbulos brancos, imunodepressão, hemorragias e lesões internas. A ATA era derivada da ingestão de milho-miúdo contaminado com fungos do género *Fusarium* produtores de tricotecenos (31).

Hoje em dia, este tipo de casos é raro nos países desenvolvidos. Mas nas populações em que o plano alimentar é muito pouco variado e que, por vezes, também consomem alimentos que estão parcialmente contaminados com fungos, é maior a probabilidade de sofrerem intoxicações crónicas (31).

Nas populações que apresentam uma alimentação diversificada a tendência de uma intoxicação alimentar causada por micotoxinas é menor, pois não haverá uma ingestão regular de concentrações suficientes de micotoxinas para que isso aconteça (31).

2. Ocorrência em produtos alimentares

Os produtos agrícolas crus, alimentos processados e produtos animais, tais como carne, leite e ovos são suscetíveis de serem contaminados com micotoxinas devido à infeção provocada por fungos toxigénicos. Esta contaminação pode ocorrer em qualquer uma das fases de produção do alimento (Figura 1), desde o cultivo até ao consumo humano (44).



Figura 1 - Diagrama representativo das várias etapas de produção de alimentos.

Os fungos que conseguem desenvolver micotoxinas nos alimentos são classificados em dois grupos (45):

- 1) Fungos de campo que se desenvolvem antes da colheita. Este grupo inclui:
 - a) Patogêneos das plantas (por exemplo, *Fusarium graminearum*);
 - b) Fungos que se desenvolvem em plantas doentes ou stressadas (por exemplo, *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus*);
 - c) Fungos que surgem na planta antes da colheita e assim predispõem à contaminação do produto após a colheita (por exemplo, *Penicillium verrucosum* e *Aspergillum flavus*).
- 2) Fungos de armazenamento que ocorrem depois da colheita.

Para detetar a presença de micotoxinas nas várias etapas de produção de um alimento é de extrema importância recorrer aos programas de vigilância, os quais já estão implementados em vários países. A FDA estabelece esses programas de vigilância nos alimentos (44, 46).

As micotoxinas que representam um maior risco para a saúde humana e animal e as mais frequentes nos alimentos são a aflatoxina, a ocratoxina A, as fumonisinas, a patulina, a zearalenona e os tricotecenos (47). As doenças relacionadas com as micotoxinas têm sido mais frequentes no gado do que em humanos e, por isso, é necessária uma maior atenção sobre os alimentos ingeridos pelos animais (44).

As micotoxinas são segregadas na fase final do crescimento dos fungos e a sua produção depende de três fatores, nomeadamente, da estirpe fúngica, das condições ambientais e do substrato. Consoante a estirpe pode haver ou não produção de micotoxinas, ou produção a diferentes escalas (alta, média ou baixa). Nas condições ambientais, os dois fatores mais importantes são a temperatura e a humidade, os quais têm um papel significativo não só no crescimento do fungo, como também na quantidade de micotoxina produzida. A refrigeração limita o desenvolvimento do fungo e a produção de micotoxinas. O substrato tem um papel importante não só no desenvolvimento de determinado tipo de fungos como na produção de micotoxinas. A mesma espécie fúngica pode apresentar um perfil de produção de micotoxinas muito diferente nos vários tipos de alimentos. Por exemplo, os alimentos ricos em glícidos (cereais e derivados), as oleaginosas, a fruta e os legumes são mais favoráveis ao desenvolvimento das micotoxinas do que os alimentos que são ricos em proteínas, como por exemplo as carnes, queijos e peixe (31). A Tabela 1 apresenta os vários tipos de micotoxinas e os alimentos onde elas são frequentemente detetadas (44).

Tabela 1 - Micotoxinas e alimentos onde a sua frequência de contaminação é maior.

Micotoxina	Alimento contaminado	Referências
Aflatoxina	Amendoim, milho, trigo, arroz, nozes, leite, ovos, queijo, figos	(48-55)
Ocratoxina A	Grãos de cereais (trigo, cevada, aveia, milho), feijão seco, amendoim mofado, queijo, café, passas de uva, frutos secos, vinho	(56-63)
Fumonisinias	Grãos de trigo e milho	(48, 64)
Patulina	Ração mofada, fruta (maçãs, uvas, peras), sumo de maçã, vegetais e cereais	(65-70)
Zearalenona	Milho, ração comercial	(71, 72)
Tricotecenos	Milho, trigo, ração comercial para gado, cevada, aveia	(73-76)

As micotoxinas presentes nos alimentos são difíceis de eliminar porque a maior parte delas é termoestável e não volátil (31). As micotoxinas são muito estáveis à temperatura, mas são sensíveis à radiação ultra-violeta (77). A intoxicação crónica provocada por micotoxinas, ou seja, a sua administração contínua em pequenas concentrações, pode causar lesões no organismo humano ou animal passados alguns meses ou anos (31).

Cada organismo vivo apresenta diferentes reações à micotoxina que é absorvida. Hoje em dia existem mais estudos sobre os efeitos tóxicos que cada micotoxina provoca nos animais de laboratório e, por vezes, nos animais das pecuárias do que estudos em humanos (3). O efeito das micotoxinas na saúde humana é mais difícil de demonstrar, embora existam muitos dados de estudos epidemiológicos sobre os efeitos tóxicos no Homem (78-80) e estudos *in vitro* em culturas de tecidos humanos (81-84).

2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas são consideradas o grupo de micotoxinas mais perigosas no mundo. Nos países em desenvolvimento, a população está continuamente exposta a este tipo de micotoxinas, e nestes países mais de 40% as doenças são causadas pelas aflatoxinas (85). As aflatoxinas podem ser produzidas por quatro espécies de *Aspergillus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus pseudotamarii*, com predomínio das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Existem cerca de 18 tipos diferentes mas que apresentam composição química idêntica. Existem quatro tipos principais de aflatoxinas: B1, B2, G1 e G2 (Figura 2). Existe uma toxina derivada da aflatoxina B1, designada por aflatoxina M1, que afeta os animais mais jovens e é transmitida através do leite (31).

Nos estudos realizados até então, estas micotoxinas apresentam efeitos cancerígenos, teratogénios e mutagénicos, tanto nos seres humanos, como nos animais. O órgão alvo destas micotoxinas é o fígado podendo conduzir a cancro hepático mas estão descritos outros efeitos clínicos, tais como problemas reprodutivos (86), anemia (87), supressão do sistema imunológico (88), icterícia e morte (89).

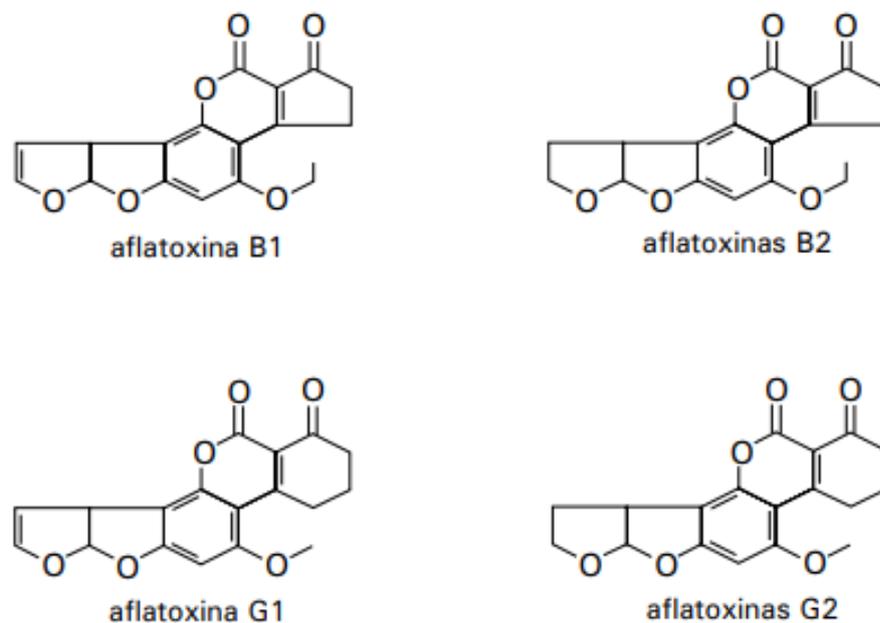


Figura 2- Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

2.2 Tricotecenos

Os tricotecenos são o maior grupo de micotoxinas, estando representado por 150 estruturas químicas diferentes e produzidos por várias espécies de fungos, tais como *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, entre outros (41, 44). São poucos os tricotecenos que são considerados importantes em relação à toxicidade nos seres humanos e nos animais. Este grupo de micotoxinas foi dividido em quatro tipos, Tipo A, Tipo B, Tipo C e Tipo D por serem quimicamente diferentes. Na sua estrutura química, o Tipo A apresenta o grupo carbonilo na posição C8 e o Tipo B não tem presente este grupo. O Tipo C apresenta um grupo adicional epóxido na posição C_{7,8} ou C_{9,10} e no tipo D está presente um anel macrocíclico entre as posições C_{4,15} (Figura 3) (39, 41). Exemplos dos diferentes tipos de tricotecenos incluem a toxina T-2 (T-2), toxina HT-2 (HT-2), diacetoxiscirpenol (DAS) do Tipo A, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) e fusarenona-X (FUX) do Tipo B, crotocina e bacarina do Tipo C, e satratoxina e roridina do Tipo D (39, 90). Em relação à toxicidade dos tricotecenos, estes apresentam efeito tóxico ao nível gastrointestinal (91, 92), dermatológico (93), imunotóxico (94, 95), hematotóxico (96, 97) e genotóxico (98, 99).

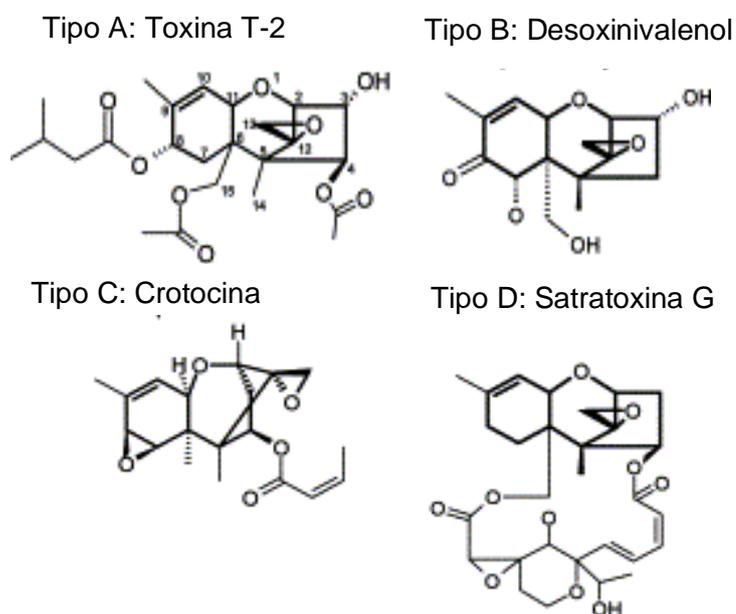


Figura 3 - Estrutura química dos tricotecenos, Tipo A, Tipo B, Tipo C e Tipo D.

2.3 Fumonisinias

As fumonisinas são produzidas por fungos do género *Fusarium*, mas a espécie fúngica que produz quantidades significativas desta micotoxina é *Fusarium verticillioides* (100). O principal tipo de fumonisina encontrado nos alimentos é a fumonisina B1 (FB1) (Figura 4) (40). Estas micotoxinas são responsáveis por causar leucoencefalomalácia (101, 102) e edema pulmonar (103), e também apresentam efeitos carcinogénicos, nomeadamente cancro do esófago. Este efeito foi verificado num estudo realizado na África do Sul e na China (104, 105), em que se relacionou o consumo de milho infetado pelo fungo *F. verticillioides* e a forte incidência de cancro do esófago no Homem (44).

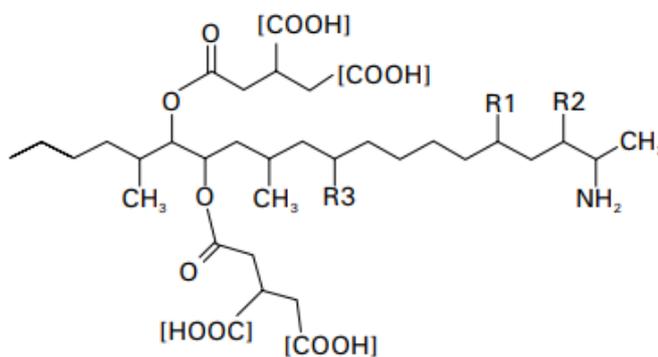


Figura 4 - Estrutura química da fumonisina B1.

2.4 Zearalenona

A zearalenona (Figura 5) é uma micotoxina estrogénica, produzida nomeadamente pelo fungo *Fusarium graminearum*, que se desenvolve no milho que apresenta elevada humidade. Temperaturas baixas e elevada humidade são as condições favoráveis para o desenvolvimento da zearalenona (44). Esta micotoxina está associada a efeitos estrogénicos (106), abortos (107) e perturbação da reprodução no porco (31, 108).

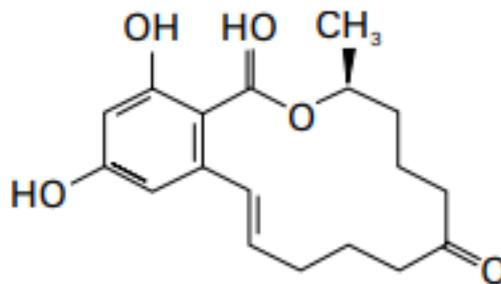


Figura 5 - Estrutura química da zearalenona.

2.5 Ocratoxinas

As ocratoxinas são um grupo de micotoxinas produzidas por várias espécies fúngicas de *Aspergillus* e *Penicillium*. Existem três formas de ocratoxinas, A, B e C. A ocratoxina A (Figura 6) é considerada a mais importante, as formas B e C são menos tóxicas e menos comuns (31, 44). A administração desta micotoxina leva a patologias graves e por vezes fatais. No grupo dos efeitos tóxicos estão documentados efeito teratogénico (109), imunotóxico (110, 111), genotóxico (112, 113), mutagénico (114), hepatotóxico (115, 116) e carcinogénico (30, 117).

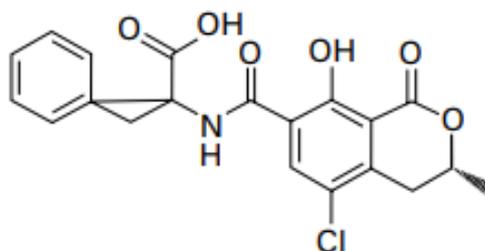


Figura 6 - Estrutura química da ocratoxina A.

2.6 Patulina

Outra micotoxina igualmente importante e que tem sido muito investigada devido à sua toxicidade é a patulina. Como é a micotoxina em estudo na tese, ela será descrita mais pormenorizadamente no Capítulo II.

3. Fungos produtores de micotoxinas

Os fungos podem estar presentes em qualquer ambiente, e existe um elevado número destes que conseguem crescer em alimentos, os quais são ricos nos nutrientes necessários para o seu crescimento. O desenvolvimento dos fungos nos alimentos necessita de condições ambientais ótimas. Estas condições ambientais incluem atividade da água (a_w), temperatura, pH, composição da atmosfera (percentagem de oxigénio e de dióxido de carbono) e do substrato (31). Os fungos desenvolvem-se em meios com atividade da água iguais ou superiores a 0,70 (118), temperaturas superiores ou iguais a 25°C (119), pH ácido (120), percentagem em oxigénio elevada, percentagem em dióxido de carbono baixa (121) e substratos ricos em glúcidos (122). Os fungos causam uma elevada perda na produção de alimentos a nível mundial, na sua maioria vegetais, sendo a segunda maior causa de deterioração dos alimentos, a seguir aos estragos causados pelos insetos. Todos os anos, estas perdas alimentares levam a perdas significativas a nível económico (31).

Até aos anos 60 pensava-se que os fungos não tinham qualquer efeito prejudicial para a saúde humana, mas posteriormente verificou-se que algumas espécies fúngicas podem produzir toxinas que podem ser prejudiciais para a saúde humana e animal. A produção de micotoxinas é mais frequente em cereais, nos seus produtos derivados, nas oleaginosas, nos frutos e seus derivados. Este tipo de contaminação é mais frequente em climas quentes e húmidos, pois são as melhores condições para o desenvolvimento destes fungos. As intoxicações alimentares causadas por essas micotoxinas são mais frequentes nas populações que vivem em climas favoráveis ao desenvolvimento dos fungos e à produção dessas micotoxinas e que têm uma alimentação pouco variada. As intoxicações alimentares desta natureza são menos frequentes nas populações que têm uma alimentação mais diversificada (31).

Os principais fungos produtores de micotoxinas pertencem ao género *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* que contaminam e se desenvolvem durante as várias fases de produção dos alimentos para o Homem e para os animais (123, 124).

O género *Aspergillus* (Figura 7) altera diversos alimentos, tais como frutas e derivados, legumes, cereais e derivados, oleaginosas, carnes salgadas e secas, óleos. A fase mais propícia ao desenvolvimento desta espécie fúngica é o armazenamento dos alimentos (31). Este fungo desenvolve-se em alimentos produzidos em climas com temperaturas mais elevadas e com valores baixos de atividade de água (a_w), atingindo vários tipos de culturas. Os fungos que são economicamente mais importantes pertencem a este género (44). Exemplo de espécies que pertencem a este género são

Aspergillus niger que altera as frutas, os legumes e os produtos lácteos e *Aspergillus flavus* que produz micotoxinas que são das mais prejudiciais para a saúde pública (31).

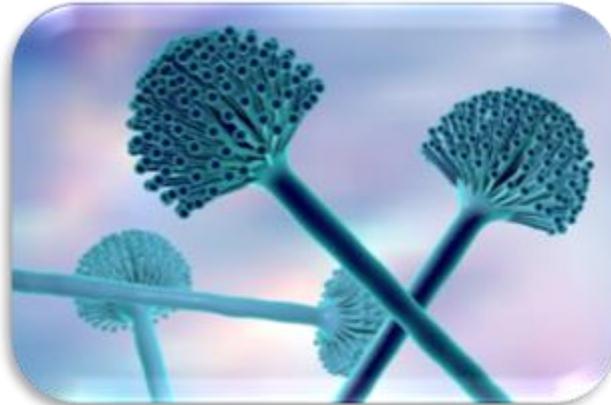


Figura 7 - Estrutura microscópica de *Aspergillus* sp. (125).

Em relação ao género *Penicillium* (Figura 8), este apresenta um papel muito importante na alimentação (31). Os mais comuns são fungos esverdeados, e que se conseguem desenvolver num intervalo de temperaturas maior do que o género *Aspergillus* (31, 44). O crescimento do género *Penicillium* é mais significativo em climas temperados. As espécies fúngicas deste grupo estão mais ligadas à contaminação que ocorre no armazenamento dos alimentos (44). Estes fungos são suscetíveis de alterar os sumos de fruta concentrados e de frutas de conserva, devido ao facto de produzirem esporos que são resistentes a temperaturas mais elevadas. Os citrinos e outras frutas, cereais e os seus produtos derivados são os mais suscetíveis a esta espécie fúngica. Neste género também não são todas as espécies fúngicas que produzem micotoxinas (31).



Figura 8 - Estrutura microscópica de *Penicillium* sp. (125).

O género *Fusarium* (Figura 9) é um grupo mais complexo, representado por espécies que se adaptam a uma maior diversidade de condições ambientais. As várias espécies são consideradas importantes patógenos das plantas, mas também se desenvolvem no solo. As espécies fúngicas deste género desenvolvem-se na fase de pré-colheita dos alimentos e alteram principalmente as frutas e os legumes. Os limões, ananases, tomates e batatas são exemplos de alimentos em que há desenvolvimento destes fungos, mas também têm sido isolados de cereais e produtos derivados. Nem todas as espécies fúngicas deste género produzem micotoxinas (31, 44).



Figura 9 - Estrutura microscópica de *Fusarium* sp. (126).

4. Controlo das micotoxinas nos produtos alimentares

Em todas as fases de produção de um alimento é de extrema importância serem estabelecidas medidas preventivas de modo a diminuir substancialmente o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas, ou criar as condições para que a concentração das micotoxinas seja o mais baixa possível e dentro dos valores limite aceitáveis para cada uma delas (47).

Algumas dessas medidas preventivas passam por aplicar práticas agrícolas corretas, desinfetar os alimentos contaminados quando é possível e controlar eficazmente todos os alimentos suscetíveis de produzirem micotoxinas prejudiciais para a saúde humana e animal (47) .

Em relação às práticas agrícolas, devem ser tomadas várias medidas, nomeadamente (47):

- i. Os equipamentos que são utilizados na colheita não devem provocar qualquer dano no alimento, ou minimizar quanto possível os danos provocados;
- ii. Colher todos os alimentos maduros, de modo a que os valores de atividade da água não seja o adequado ao desenvolvimento do fungo;
- iii. Secar o alimento até níveis de água adequados;
- iv. Todas as sementes oleaginosas e os grãos têm de ser limpos para que seja possível a remoção de qualquer matéria indesejada;
- v. Os locais de armazenamento devem estar limpos e climatizados.

Capítulo II – Patulina



Capítulo II – Patulina

1. Breve nota histórica

A patulina foi isolada por Nancy Atkinson em 1943 e foi inicialmente usada no combate às infecções bacterianas, devido às suas propriedades antibióticas (127-129). Nos estudos realizados com esta micotoxina verificou-se que ela inibia a atividade de bactérias de Gram positivo e bactérias de Gram negativo, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* (130). Após vários relatos dos efeitos tóxicos observados nos ratos (131), gatos, coelhos (132) e hamsters (133, 134), a sua utilização como antibiótico foi posta de parte. Estudos posteriores revelaram ação genotóxica (135), embriotóxica (136) e neurotóxica (14, 137). Em 1987, a IARC classificou a patulina como pertencente ao grupo III, ou seja, evidência inadequada de carcinogenicidade (138).

A patulina é usada como um inibidor de absorção de potássio em aplicações de laboratório (139). Um estudo realizado por Kashif Jilani e colaboradores verificaram que a patulina em concentrações fisiológicas estimula a morte suicida programada por eritrócitos ou eriptose (140).

Independentemente da classificação da IARC, a patulina apresenta outros efeitos nefastos sobre os seres vivos, incluindo o Homem e por esse motivo, há restrições relativas à concentração desta micotoxina nos alimentos, os quais, são mais limitantes nos produtos destinados à alimentação infantil (141, 142).

2. Caracterização química

A patulina é uma lactona heterocíclica (Figura 10) insaturada, com o nome químico de 4-hidróxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona, com a fórmula molecular $C_7H_6O_4$ e peso molecular 154,15 g/mol (138, 143).

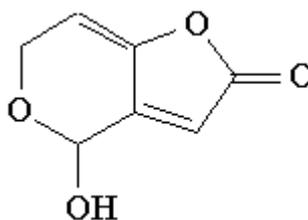


Figura 10 - Estrutura química da patulina (138).

A patulina é um sólido cristalino incolor, com ponto de fusão de 110 °C, absorvância máxima em 276 nm e com uma absorvidade molar (ϵ) em etanol de $14600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esta micotoxina é estável a pH ácido, no intervalo entre 3,5 e 5,5, e é termorresistente (144, 145). A patulina é instável em soluções com sulfitos, grupos tiol e/ou ácido ascórbico e perde a sua atividade biológica em soluções alcalinas (144, 146). A patulina é solúvel em água, etanol, acetato de etilo, clorofórmio e acetona e é insolúvel em éter de petróleo e benzeno (143, 146).

3. Biossíntese da patulina

A patulina é uma micotoxina produzida por mais de 60 espécies de fungos. A sua biossíntese tem sido muito estudada (13) indicando que ela é um metabolito secundário que deriva de um poliacetato. O processo de síntese realiza-se através de reações de condensação e redox, muitas das quais catalisadas por enzimas (13).

Os fungos produtores de patulina utilizam a frutose, glicose, sacarose e ácido málico presente nos frutos como fontes de carbono para produzir acetilcoenzima A (Acetil-CoA) e o malonil coenzima A (malonil-CoA). A partir destes compostos e através de reações de oxidação-redução forma-se a patulina, como ilustrado na Figura 11 (147, 148).

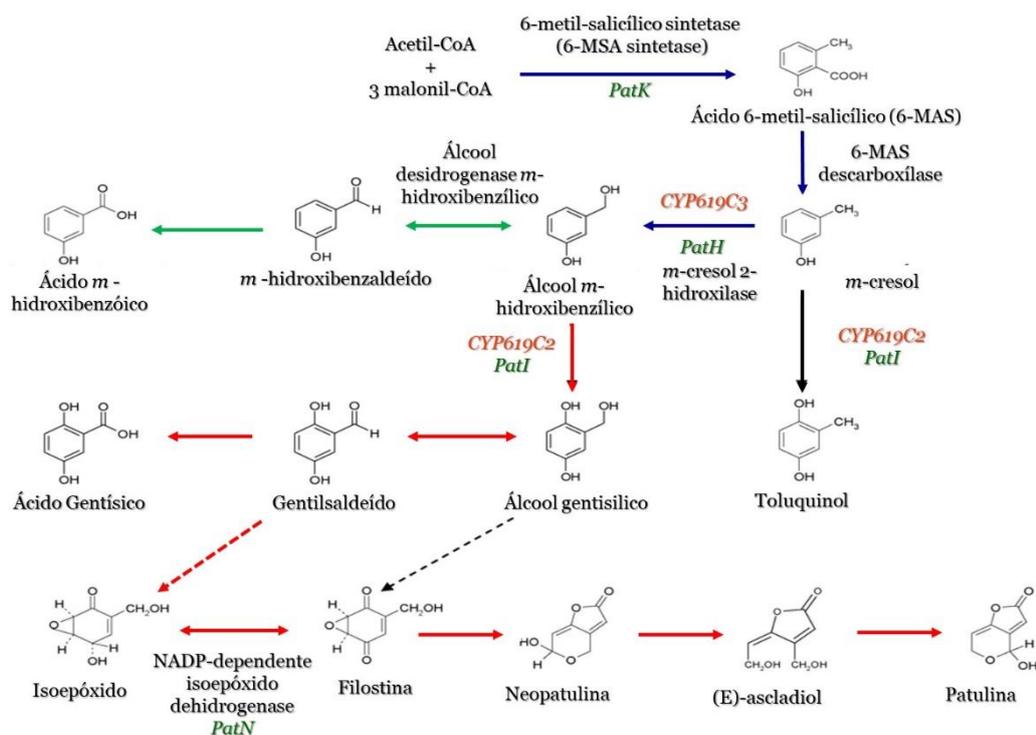


Figura 11 - Diagrama da biossíntese da patulina.

Inicialmente o Acetil-CoA juntamente com 3 unidades de malonil-CoA, condensam e formam o ácido 6-metil-salicílico (6-MSA), reação esta catalisada pela enzima ácido 6-metil-salicílico sintetase (6-MSA sintetase) (13). Vários estudos têm demonstrado que a inativação da enzima 6-MSA sintetase é considerada o primeiro passo limitante da produção de patulina (149).

Seguidamente o 6-MSA é convertido em *m*-cresol, através da ação do 6-MSA descarboxilase. O *m*-cresol, é convertido em álcool *m*-hidroxibenzílico, pela ação do *m*-cresol 2-hidroxilase (13).

O álcool *m*-hidroxibenzílico é convertido em gentilsaldeído por dois mecanismos independentes e ambos aceites, cujas propostas para o composto intermediário são o álcool gentisílico ou o *m*-hidroxibenzaldeído. Vários estudos revelam que o *m*-hidroxibenzaldeído é o intermediário mais provável, embora também existam estudos que defendem que ambos os compostos são possíveis de serem intermediários (150). No entanto, também há estudos que revelam que a conversão do *m*-hidroxibenzaldeído em gentilsaldeído não ocorre, sendo o *m*-hidroxibenzaldeído convertido em ácido *m*-hidroxibenzóico. Nesta reação o álcool hidroxibenzílico é convertido em *m*-hidroxibenzaldeído através do álcool desidrogenase *m*-hidroxibenzílico. Para que esta enzima tenha atividade, bem como a *m*-cresol 2-hidroxilase, necessitam de ter presente oxigénio e a fosfato de dinucleotídeo de adenina (NADPH) (151).

Depois da formação do gentilsaldeído, este é convertido em isoeopóxido que por sua vez é convertido em filostina através da atividade de NADP-dependente isoeopóxido dehidrogenase. A filostina formada converte-se em neopatulina e esta por sua vez, com a redução do NADPH, transforma-se em (E)-ascladiol. Este último é oxidado e transforma-se em patulina (13).

4. Ocorrência de patulina nos géneros alimentícios

A patulina é uma micotoxina presente numa grande variedade de alimentos. É sobretudo nos frutos de pomar, como as maçãs e peras, e nos seus produtos derivados, que a patulina existe em maiores concentrações (152). No entanto, ela pode estar presente noutros frutos, como por exemplo, figos (153), pêsegos (154), bananas (155), abacaxis (156), uvas (156)), legumes (155), cereais (cevada, trigo, milho) (68), queijos (157), peixe (158) e respetivos produtos derivados (154, 156, 159).

A Tabela 2 apresenta os teores de patulina encontrados em vários produtos alimentares de vários países.

Tabela 2 - Teores de patulina (PAT) presente em diferentes produtos alimentares.

Produto Alimentar	PAT (µg/kg)	País	Ref ^a
Maçã	150 - 267	Brasil	(154)
Pera	134 - 245		
Pêssego	92 - 174		
Compota de maçã	27	Argentina	(160)
Puré de maçã	123		
Compota de pera	25		
Uvas sem grainhas	921,1	Paquistão	(156)
Maçã Golden	196,5		
Ananás	254,1		
Peras	232,1		
Tomate	410,2		
Sumo de maçã	20,4		
Smoothie (tomate + hortelã + cenouras)	50,7		
Smoothie (beterraba + tomate + maçãs)	45,5		
Smoothie (laranjas + cenouras + hortelã)	110,4		
Figos secos	276,9	China	(161)
Sumo de fruta (sumos de maçã, laranja, manga, limão, e mirtilo)	16,8		
Compotas (compotas de maçã, amora, morango e abacaxi)	11,0		
Figos	39,3 – 151,6	Turquia	(153)
Alimentos à base de cereais	4,50	Portugal	(68)
Sumo de maçã	1,2 - 42	Portugal	
Queijo	15 - 460	Itália	(157)

A patulina é um metabolito secundário tóxico produzido por várias espécies de fungos dos géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys* (162). Nas frutas apodrecidas há crescimento dos fungos, os quais, podem ter ou não as condições favoráveis à produção de patulina. No entanto, esta micotoxina também pode estar presente nos frutos sem apodrecimento visível (130). Os níveis elevados de patulina nas frutas em decomposição encontram-se principalmente no tecido infetado, apesar de também poder estar presente no tecido adjacente. A remoção do tecido apodrecido

reduz significativamente a contaminação por patulina no produto processado (143, 152). Por isso, os sumos de maçã que apresentam concentrações significativas de patulina indicam que no processo de fabrico foram utilizadas maçãs apodrecidas (152)

A patulina é produzida por mais de 60 espécies fúngicas e cerca de 30 géneros, de entre os quais se destacam *Penicillium expansum*, *P. griseofulvum*, *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. claviforme*, *Paecilomyces* spp., *Saccharomyces vesicarium*, *Alternaria alternata*, *Byssochlamys nivea*, *B. fulva*, *Aspergillus giganteus*, *A. terreus*, e *A. clavatus* (163).

Penicillium expansum é um fungo filamentososo, sendo considerado o principal produtor de patulina na fruta e nos seus produtos derivados. O substrato principal para o desenvolvimento deste fungo são as maçãs e produtos derivados destas (164).

Penicillium expansum é um fungo que se desenvolve em alimentos cuja atividade de água (a_w) varia entre 0,85 a 0,99 e tolera um meio até 80% de sacarose (165, 166). Uma peça de fruta infetada com este fungo apresenta na sua parte externa bolor de cor azul, o tecido infetado tem uma coloração castanha, o fruto fica mole e liberta água (163). Este apodrecimento ocorre sobretudo durante o armazenamento do fruto (164). A Figura 12 ilustra o aspeto de uma maçã Royal Gala podre e infetada por *Penicillium expansum*.



Figura 12 - Maçã Royal Gala podre e infetada com *Penicillium expansum* (167).

A produção de patulina nos frutos em consequência do desenvolvimento de fungos produtores dessa micotoxina é influenciada em grande parte por fatores ambientais e endógenos típicos do substrato. Os fatores que mais influenciam essa produção são a atividade da água, a temperatura, a atmosfera (percentagem de oxigênio (O₂) e percentagem de dióxido de carbono (CO₂)) e o pH (164).

Estudos realizados verificaram que a patulina é eliminada no processo de fermentação dos vinhos, enquanto no processo de produção dos sumos de frutas a sua concentração diminui por volta de 10% (168-170).

Os frutos que são mais suscetíveis de desenvolver fungos que irão produzir patulina são os frutos que se encontram caídos no solo, as maçãs que estão deterioradas devido ao ataque por insetos ou aves, ou maçãs que se encontram com danos físicos devido à fase de embalagem ou manuseamento (28).

5. Toxicidade

Até à data foram realizadas várias experiências para saber quais os alimentos que produzem esta micotoxina (171, 172), quais são as condições necessárias para o seu desenvolvimento (173-176), qual a concentração de patulina nos vários alimentos (67, 177, 178), e quais as concentrações que são prejudiciais para a saúde humana (179). Paralelamente, têm sido realizados vários estudos sobre a sua toxicidade.

A maioria dos estudos realizados para avaliar a toxicidade da patulina são realizados em animais e, conseqüentemente, têm algumas limitações resultantes da extrapolação dos resultados obtidos nos animais para o potencial efeito no Homem. Na literatura estão documentados vários efeitos secundários na saúde humana e animal associados à exposição à patulina. Os órgãos alvo nos quais a patulina tem efeito tóxico no ser humano estão presentes na Figura 13.

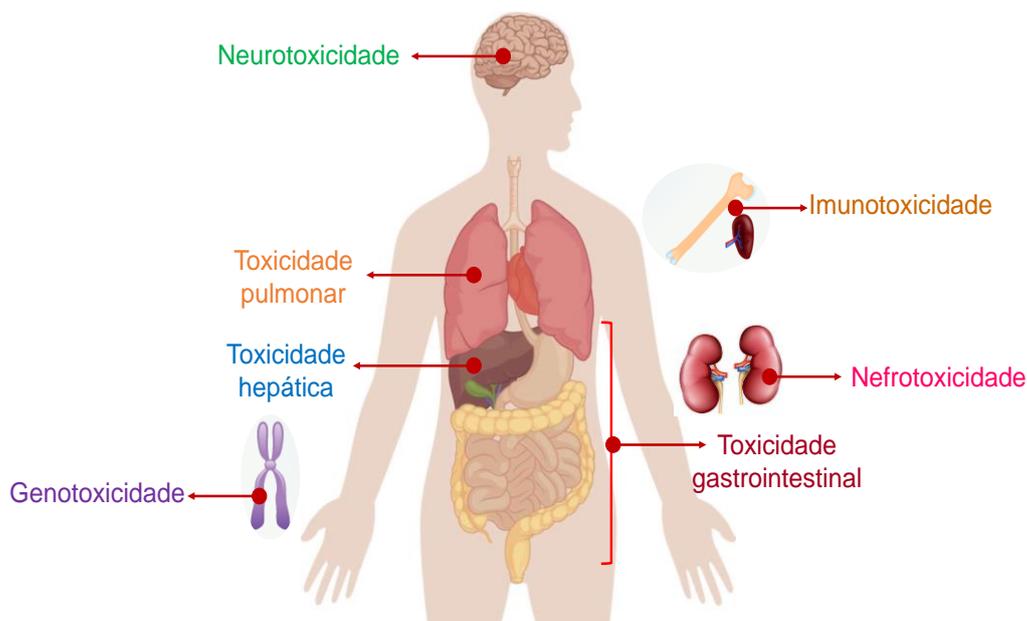


Figura 13 - Toxicidade da patulina nos seres humanos.

Nos estudos realizados em animais verificou-se que a patulina tem efeitos tóxicos ao nível imunológico (180), neurológico (181) e gastrointestinal (133), mas também pode causar danos ao nível do ADN (20, 182). Como já referido anteriormente, os estudos realizados em animais não evidenciam que a patulina tenha ação carcinogénica, e por isso, a IARC classificou esta micotoxina no Grupo III, ou seja, classificada como não carcinogénica para o ser humano (138). Os estudos de toxicidade aguda com animais apresentaram vários efeitos, nomeadamente, edema pulmonar (32), processos hemorrágicos, danos no fígado e nos rins, e também edema cerebral (137, 143).

Nos seres humanos há registo de hiperemia, congestão e lesões hemorrágicas, nomeadamente ao nível do trato gastrointestinal (183, 184), hepático (185) e renal (143, 186).

Em 2004, os estudos *in vitro* realizados por Schumacher e colaboradores, verificaram que a patulina é uma micotoxina mutagénica para as células mamárias, e também apresentava atividade genotóxica (187). Em outro estudo realizado por Bing-Hui Liu e colaboradores verificou-se que a patulina também pode causar a morte celular (188).

Em 2003, Rychlik, realizou um estudo em humanos para avaliar a degradação da patulina no sangue. Neste estudo, os voluntários consumiram sumo de maçã com uma concentração de patulina inferior a 50 µg/L (limite máximo permitido). A concentração

de patulina no sangue era inferior a 2% da quantidade de patulina consumida. Com este estudo, Rychlik verificou que esta micotoxina é degradada antes de atingir outros tecidos. Neste estudo pode-se comprovar que a toxicidade da patulina é local e não sistêmica (189).

Em 1990, o Comité Misto FAO/OMS de peritos em matéria de aditivos alimentares (CMPAA), *Joint FAO/WHO Expert Committee on Foods Additives* (JECFA) avaliou a patulina e no ano 1995 foi novamente reavaliada. Nesta última avaliação verificaram que a maior parte da patulina ingerida por ratos é eliminada durante 48 horas e que cerca de 98% da patulina é eliminada durante os 7 dias após a ingestão. Num estudo sobre os efeitos da patulina na reprodução, na toxicidade a longo prazo e na carcinogenicidade conclui-se que 43 µg/kg peso corporal por dia foi considerada uma concentração que provoca toxicidade. Com base neste estudo e extrapolando a dose obtida em ratos para humanos, multiplicando o valor obtido pelo fator de segurança 100, a CMPAA estabeleceu assim uma dose diária admissível máxima provisória (PMTDI) de 0,4 µg/kg de peso corporal por dia (21, 190).

6. Controlo da contaminação por patulina

A concentração de patulina nos alimentos tem de ser controlada e para isso devem tomar-se medidas preventivas capazes de minimizar ou mesmo impossibilitar a produção desta micotoxina nos alimentos. Em primeiro lugar, é imperativo controlar o desenvolvimento dos fungos que produzem patulina nos alimentos e haver um maior controlo do desenvolvimento de fungos após a colheita dos frutos e nos produtos preparados à base destes alimentos.

Para evitar a contaminação da fruta com fungos e o seu posterior desenvolvimento existem vários métodos, tais como, a aplicação de fungicidas (191), agentes de biocontrolo, uso de resistência induzida (192), boas práticas de colheita, irradiação (193), água quente, resfriamento, entre outros (190).

Num estudo realizado por Janotová L. e colaboradores (2011) verificou-se que os níveis de patulina na fruta fresca são superiores em relação aos purés obtidos dessa fruta. Isto porque todas as etapas do processamento dos purés de maçã contribuíram para a redução da patulina (194).

Nos sumos de maçã é necessário implementar medidas eficazes que reduzam o nível de patulina. Essas medidas devem ser implementadas desde a colheita das maçãs que vão ser utilizadas no processo de fabrico nesses sumos, até ao processamento do mesmo. Como exemplo dessas medidas temos a não utilização de frutas presentes em atmosfera controlada ou a não utilização de frutas que apresentem um apodrecimento visível superior a 10 cm² (195). Uma outra medida para reduzir a contaminação por patulina é remover o tecido apodrecido da fruta, pois é nesta parte que está presente uma elevada concentração desta micotoxina. Esta medida é considerada eficaz, mas num processo industrial torna-se economicamente pouco viável porque é muito dispendioso (152, 196).

No processamento dos sumos de maçã, a clarificação é uma etapa desse processo que reduz significativamente os níveis de patulina nesses produtos, e este facto foi comprovado no estudo realizado por Bissessur e colaboradores em 2001. Mas existem outros métodos que são eficazes na redução desta micotoxina, tais como a centrifugação, refinação, tratamento enzimático e filtração, com eficiências de remoção da patulina de 89%, 77%, 73% e 70%, respetivamente (197).

A patulina também reage com o dióxido de enxofre (SO₂). Deste modo, pode ser utilizado um antioxidante ou um agente microbiano que seja constituído por dióxido de enxofre para que a patulina seja destruída. Outros métodos nos quais é possível reduzir as concentrações de patulina é através da fortificação com ácido ascórbico, a adição de tiamina, piridoxina e pantotenato de cálcio (130).

Outros métodos utilizados para prevenir a contaminação por patulina nas maçãs incluem um rigoroso controlo da humidade, a implementação de boas práticas de fabrico, garantir a boa qualidade da fruta e aderir aos Princípios da Análise dos Pontos Críticos de Controlo (HACCP) (13, 198).

Antes da produção dos sumos ou purés de fruta, a prevenção da contaminação com micotoxinas faz-se através da seleção de frutas de qualidade e na utilização de instalações com boas condições de saneamento. Regra geral, a fruta de melhor qualidade é vendida ao consumidor (fruta de mesa), enquanto a fruta de qualidade inferior é utilizada na indústria alimentar para a produção de derivados (sumos, compotas, geleias, entre outros). Esta fruta pode apresentar danos físicos o que facilita a entrada de fungos que podem vir a produzir patulina (13).

Uma outra etapa igualmente importante no controlo da contaminação com fungos e posterior desenvolvimento de micotoxinas é a fase de lavagem. Acar J. e colaboradores em 1998 concluíram que nos sumos de maçã a concentração de

patulina diminuía na lavagem com água a alta pressão (199). Jackson LS e colaboradores (2003) determinaram como o tratamento de lavagem afeta os níveis de patulina na sidra de maçã, e concluíram que a lavagem das maçãs colhidas diretamente do solo diminuiu a concentração de patulina entre 10 a 100% na sidra de maçã (200). Mas existe uma contra indicação pois a fase de lavagem pode ser considerada uma fase em que é possível o desenvolvimento de fungos (13).

Na fase de armazenamento das maçãs também é importante haver um controlo do desenvolvimento de fungos. Foi realizado um estudo por Sifton J. e colaboradores (1992) em que as maçãs foram armazenadas numa atmosfera controlada durante algum tempo e verificou-se que o crescimento dos fungos era lento (201). Mas nem todos os produtores de maçãs podem usufruir deste tipo de armazenamento. O processo usual de armazenamento é em plataforma, o qual é mais propenso ao desenvolvimento de fungos e, conseqüentemente, à produção de patulina. Existem outras alternativas para o armazenamento das frutas tais como a utilização de embalagens, como o polietileno (PE), em que este tipo de material inibe o crescimento de fungos e, conseqüentemente, a não produção de patulina nas maçãs (202). Há também evidências de que se as maçãs estão armazenadas por períodos de tempo maiores, conduz a uma maior produção de patulina (13).

Um outro tratamento para a diminuição dos fungos produtores de patulina era a utilização de inseticidas organofosforados nas maçãs, mas este tratamento foi abandonado por falta de segurança, quer na aplicação quer no produto final (13, 203).

Um estudo cujo objetivo era diminuir o apodrecimento das maçãs depois da sua colheita recorreu à utilização de três tratamentos em simultâneo e comparou os resultados com os obtidos com cada tratamento isoladamente. Os tratamentos utilizados foram o tratamento térmico, adição de cloreto de cálcio 2% e controlo biológico com a utilização de uma bactéria de ação antagonica, *Pseudomonas syringae*. As maçãs utilizadas neste estudo foram inoculadas com o fungo *P. expansum*, armazenadas a 38 °C durante 4 dias, com posterior armazenamento a 1°C durante 6 meses. As maçãs não apresentaram qualquer podridão visível. Seguidamente estas maçãs foram sujeitas a mais dois tratamentos, uma infusão de cloreto de cálcio a 2% por cada dia e a bactéria de ação antagonica. Em cada tratamento anteriormente referido observou-se uma diminuição de 25% no apodrecimento das maçãs. A junção destes dois tratamentos com o tratamento térmico reduziu o apodrecimento nas maçãs em 91%, e sem o tratamento térmico houve uma redução de 89% (13, 204).

7. Legislação aplicável

Devido à toxicidade da patulina é necessário estabelecer limites máximos que possam estar presentes nos produtos alimentares, bem como as doses diárias admissíveis, as quais não provoquem efeitos adversos na saúde humana. A JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) estabeleceu como dose diária admissível máxima provisória de patulina (PMTDI) o valor de 0,4 µg/kg de peso corporal (21).

De acordo com o Regulamento nº 1881/2006 os teores máximos estabelecidos para a patulina variam com o tipo de produto alimentar, tal como ilustrado na Tabela 3 (142).

Tabela 3 - Teores máximos de patulina em determinados produtos alimentares.

Produto alimentar	Teor máximo de patulina (µg/kg)
Sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos	50
Bebidas espirituosas, sidra e outras bebidas fermentadas derivadas de maçãs ou que contenham sumo de maçã	50
Produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã, destinados ao consumo direto, com exceção dos géneros alimentícios referidos nos pontos abaixo	25
Sumo de maçã e produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã, destinados a ser consumidos por lactentes e crianças jovens e rotulados e vendidos enquanto tal	10,0
Alimentos para bebés, com exceção de alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças jovens	10,0

8. Métodos analíticos: análise de patulina

As micotoxinas atualmente conhecidas têm propriedades químicas muito diversas e estão presentes num amplo intervalo de concentrações e numa grande panóplia de produtos agrícolas, alimentos e amostras biológicas, os quais são suscetíveis ao desenvolvimento de fungos produtores de micotoxinas. Por isso, é necessário desenvolver métodos que sejam específicos para a análise de cada micotoxina, através da seleção, otimização e validação das condições de extração, limpeza, separação e detecção de micotoxinas (28).

Existem várias condições que interferem na análise de patulina nos produtos alimentares, nomeadamente boa homogeneização da amostra para que todos os componentes da amostra estejam uniformemente distribuídos, baixa concentração de micotoxina no produto alimentar, instabilidade da patulina a pH elevado, entre outros, exigindo uma maior atenção no pré-tratamento da amostra (130).

Para a quantificação da patulina num produto alimentar é necessário proceder ao pré-tratamento da amostra, o qual consiste na extração/concentração da patulina e na limpeza/purificação do extrato obtido para posterior análise (1). Estas etapas melhoram a seletividade e sensibilidade dos métodos de quantificação (28).

Na fase de extração da patulina presentes nas amostras alimentares é necessário serem utilizados alguns solventes. Na fase de purificação o objetivo é eliminar impurezas e concentrar a patulina (130).

Na fase de extração o solvente mais utilizado é o acetato de etilo (205, 206) e há estudos em que se utiliza a mistura de acetato de etilo e hexano (130, 207). Na fase de purificação, os métodos tradicionais mais utilizados são a extração líquido-líquido (208) e a extração em fase sólida (SPE) (1, 66). Na extração em fase sólida, para a purificação dos extratos resultantes da fase de extração, utilizam-se cartuchos de sílica (209). Outros dos métodos utilizados são o método de diálise difásica (210) e os métodos com cartuchos convencionais de fase reversa para absorver/adsorver a toxina (130, 211).

Após o tratamento da amostra, passa-se à fase de detecção e quantificação da patulina, tendo sido propostos vários métodos para a sua análise. Ao longo dos anos têm-se desenvolvido métodos analíticos mais rápidos, mais específicos e com limites de detecção mais baixos (13). O primeiro método para a quantificação da patulina foi a

cromatografia em camada fina (TLC) (212), mas atualmente o método mais utilizado é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (1, 130, 213). Métodos como a eletroforese capilar também têm sido alvo de investigação (206). Mais recentemente têm sido propostos novos métodos, nomeadamente métodos de biologia molecular como o método envolvendo a reação em cadeia da polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (214).

Quimicamente, a patulina é uma molécula polar, de baixo peso molecular e apresenta forte absorção da luz ultravioleta (UV). Por isso o método mais utilizado na sua análise é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com fase reversa acoplada ao detetor ultravioleta (130).

Neste método a quantificação da patulina nas amostras de maçã foi feito pelo método do padrão externo. No método de HPLC para a análise de patulina foi utilizada uma fase móvel que contém uma elevada percentagem de água. As fases móveis mais utilizadas apresentam, na sua constituição água e acetonitrilo em diferentes proporções (130).

Também é preciso ter em conta que, nas análises de maçãs e dos seus produtos derivados há um composto que interfere na determinação e quantificação de patulina nessas amostras. Esse composto químico é designado por 5-Hidroximetilfurfural (HMF) e está presente em níveis duas ou três vezes superiores aos que se encontram de patulina, e é eluído antes desta (13, 130). O HMF resulta da desidratação de cetopentoses que podem estar a pH baixo ou a elevadas temperaturas que surgem durante as fases de processamento e armazenamento de alimentos (130).

Capítulo III – Maçãs: frutos e sumos



Capítulo III – Maçãs e os seus sumos derivados

1. Apresentação do fruto

As maçãs são muito importantes para a economia agrícola, pois é considerado o fruto mais produzido e consumido no mundo (215).

A maçã é o fruto pomáceo da macieira, árvore pertence à família *Rosaceae*. A macieira teve origem na Ásia Central e, ao longo dos anos, a sua produção disseminou-se pelo mundo. Hoje em dia existe uma maior produção na China e nos Estados Unidos da América (215).

Este fruto é produzido há milhares de anos e conquistou a preferência dos consumidores pelas suas propriedades organoléticas (216). É uma fruta saborosa e nutritiva, de coloração avermelhada ou verde, dependendo da variedade (217).

Atualmente são conhecidas mais de 7500 espécies e variedades de maçãs (217). É um fruto que se desenvolve em climas temperados e subtropicais; em áreas tropicais a macieira não floresce pois, independentemente do tipo de maçã cultivada, precisa de um ambiente frio durante algumas horas (215, 217). As maçãs são das espécies de fruta com maior estabilidade e por isso apresentam um maior período de conservação, sem que haja apodrecimento e sem perdas significativas do seu valor nutritivo (217). A maçã é um fruto que se conserva durante muito tempo em câmaras de frio (218).

As maçãs são agrupadas em diferentes variedades consoante o seu tamanho, forma, aparência, e consistência da polpa e da casca, as quais também lhe conferem diferentes utilizações (maçã de mesa, geleia, compota, entre outras). Regra geral, as maçãs são agrupadas em três tipos: maçãs frescas para consumo (fruta de mesa), maçãs utilizadas na indústria agroalimentar (por exemplo, para a produção de sumos, purés de fruta, papas para a alimentação infantil), ou maçãs para a produção de sidra ou vinagre. A mesma variedade de maçãs pode ser utilizada para diferentes fins (163).

2. Produção e consumo de maçãs

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE), a maçã é um dos principais frutos frescos produzidos em Portugal. No ano 2017 foram produzidas 329 371 toneladas de maçãs, representando a maior produção de maçã até à data (219).

Em 2015, a produção de maçã em Portugal também apresentou um dos valores mais altos dos últimos 5 anos, representado por 326 mil toneladas. Este aumento da produção de maçã deveu-se a uma floração abundante e a um vingamento regular. Esta produção foi pontualmente excessiva no interior Norte e deveu-se a um programa adequado de regas para compensar a falta de precipitação (ano de seca) (220).

De acordo com o *site* da Base Estatística Corporativa da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database* (FAOSTAT), em 2016 foram produzidas em Portugal 241 611 toneladas de maçãs, valor inferior ao do ano anterior. Na Europa, no ano 2016, foram produzidas 12 591 008 toneladas de maçãs (12 ton/ha) (221). Em Portugal, no ano 2013, foram produzidas 287 000 toneladas de maçãs e produtos derivados. Enquanto na Europa o valor foi de 11 889 000 toneladas (222).

As Figura 14 e Figura 15 apresentam o perfil de produção de maçãs em Portugal e na Europa, respetivamente (223).

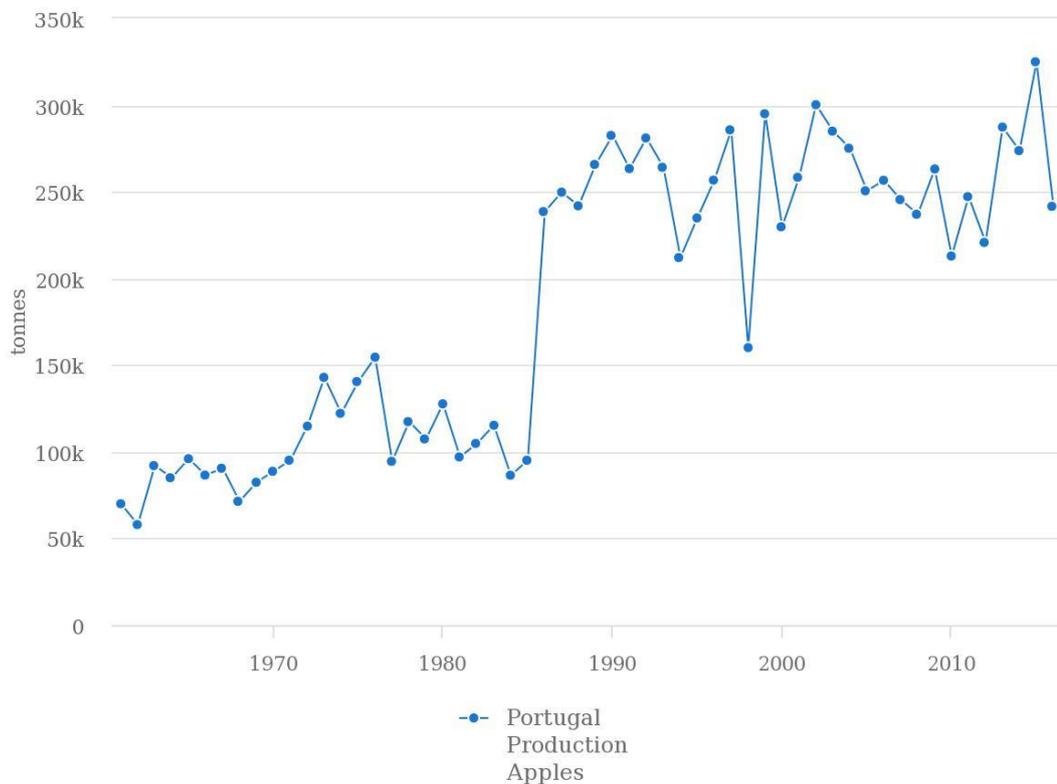
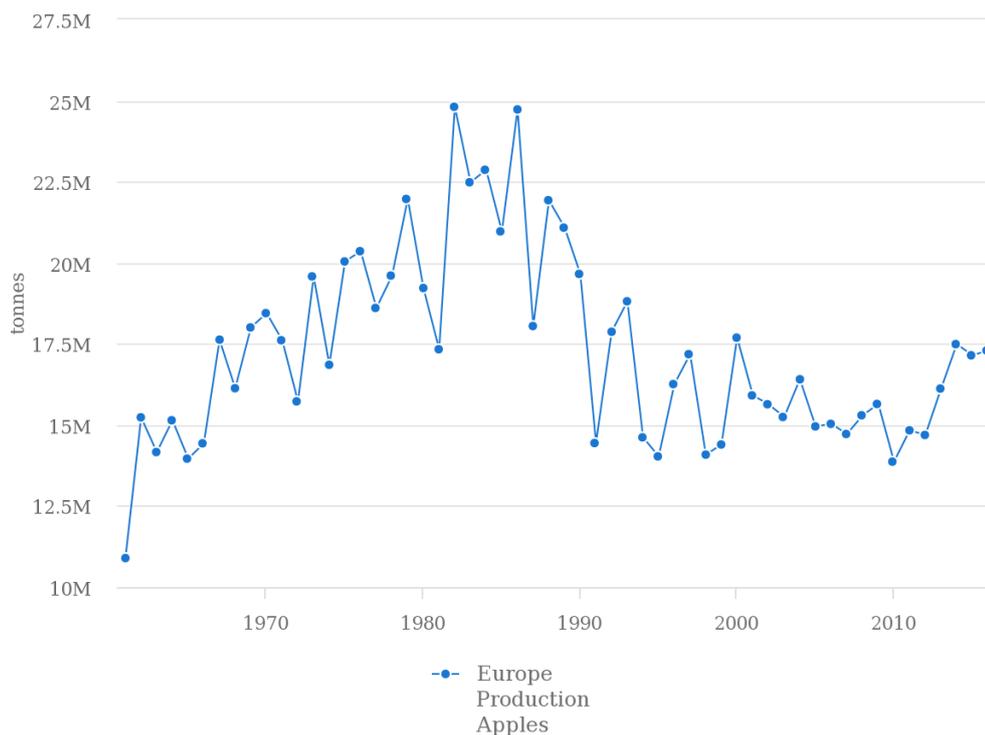


Figura 14 - Produção de maçãs desde 1961 a 2016 em Portugal (FAOSTAT).



Source: FAOSTAT (Dec 14, 2018)

Figura 15 - Produção de maçãs desde 1961 a 2016 na União Europeia (FAOSTAT).

Na Figura 16 estão presentes os valores de produção de maçãs desde o ano 2013 até ao ano 2017. A sua produção é realizada principalmente em regime de regadio e a sua apanha decorre em agosto e setembro. Apesar da falta de precipitação no ano 2017, esta não afetou o desenvolvimento da maçã, apresentando uma coloração normal e um bom calibre. As maçãs que foram danificadas pelas quedas de granizo em julho e agosto foram aproveitadas para a indústria alimentar (219).

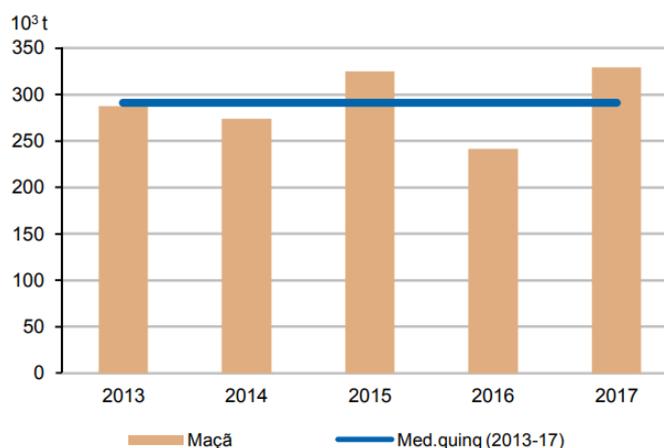


Figura 16 - Produção de maçãs desde 2013 até 2017 em Portugal (INE).

Em Portugal, de abril de 2016 até março de 2017, o consumo humano de maçã *per capita* foi de 26,3 kg/habitante (224).

3. Ciclo produtivo da maçã

Desde a produção até ao consumidor final, a maçã passa por várias fases de produção, de forma a garantir um produto de qualidade.

A campanha da maçã decorre de meados de julho de um ano e vai até meados ou fins de julho do ano seguinte. A maçã é um fruto que se conserva durante muito tempo em câmaras de frio (218).

Durante um ano todas as macieiras passam por diferentes fases, representativas de uma determinada estação do ano (225). A Figura 17 apresenta o ciclo produtivo das maçãs.



Figura 17 - Ciclo produtivo das maçãs (225).

A primeira fase a que chamam repouso invernal, ocorre no final do outono e dura todo o inverno. Nesta fase a macieira perde todas as folhas e as suas funções são quase anuladas (225).

A segunda fase que ocorre no início da primavera, tem o nome floração. Nesta fase a macieira começa a ganhar as novas folhas e também surgem os botões florais que vão dar lugar às flores (225).

Na fase seguinte, a meio da primavera, as macieiras estão cheias de cachos de flores brancas ou rosadas. Nesta fase há mais ataques por insetos, devido ao elevado aroma que circula no ar e também pelo cenário florido. As abelhas são os insetos que mais atacam as macieiras, e estas transportam o pólen das flores das macieiras polinizadoras (masculinas) para as flores portadoras (femininas). Esta é uma fase bastante importante em relação à quantidade de fruta que se pretende obter (225).

Na fase de formação e amadurecimento a árvore armazena a água e os nutrientes que são necessários para o desenvolvimento do fruto, o qual se encontra em crescimento. Para que as maçãs se desenvolvam bem existem dois fatores muito importantes nesta fase, a exposição solar e o clima (225).

Por último, mas não menos importante, procede-se à fase da colheita que ocorre no final do verão princípio do outono. Os frutos encontram-se na sua fase madura, mas é importante fazer uma avaliação para saber se é mesmo o estado ideal de maturação dos frutos. Esta fase pode comprometer a fase posterior de comercialização das maçãs (225). Posteriormente, as maçãs são transportadas para centrais fruteiras e são armazenadas em câmaras de frio (226).

4. Variedades de maçãs

Hoje em dia existem muitas variedades de maçãs que apresentam diferenças no aspeto, no sabor, bem como diferenças ao nível dos nutrientes que as constituem, da atividade antioxidante e dos fotoquímicos. Numa dieta equilibrada deve-se ir variando os tipos de maçãs, pois cada tipo apresenta um ou mais benefícios para a saúde humana (225).

Em Portugal as variedades de maçãs que são mais cultivadas são as Royal Gala, Golden Delicious, Red Delicious, Starking, Jonagold e Jonagored, Reineta Parda e Branca e Bravo Esmolfe. As maçãs menos cultivadas são a Riscadinha de Palmela, Casa Nova, Granny Smith e a Pink Lady (218).

As Tabelas 4 e 5 apresentam as características das variedades de maçã mais cultivadas em Portugal e as que são menos cultivadas, respetivamente (225, 227).

Tabela 4 - Variedades de maçãs mais cultivadas em Portugal.

	Golden Delicious	Red Delicious	Royal Gala	Fuji	Reineta
Aspeto					
Origem	América, 1890	América, 1870	Nova Zelândia	Japão, 1930	França
Cor	Amarela ou verde, por vezes pode ter tonalidades alaranjadas	Vermelho escuro	Vários tons de vermelho raiados com tons alaranjados	Vermelho vivo, ou uma mistura de manchas vermelhas com verde amarelado	Acastanhado claro
Forma	Oblongo-cónica	Tronco-cónica ou oblonga	Arredondada oblonga	Achatada	Arredondada e achatada
Sabor	Doce e suave	Doce	Muito doce e pouco ácida	Muito doce	Muito ácido
Textura	Consistente	Crocante, consistente e medianamente succulenta	Crocante, succulenta	Consistente e muito sumarenta	Consistente e pouco sumarenta
Polpa	Creme clara	Creme clara	Quase branca	Branca	Creme clara
	Jonagold	Starking	Jonagored	Bravo Esmolfe	
Aspeto					
Origem	América, 1943	América	América	Portugal	
Cor	Bicolor, a cor de fundo é vermelho alaranjado com estrias amarelas	Vermelho escuro	Vermelho ligeiramente estriado com fundo amarelo	eventualmente com manchas avermelhadas	
Forma	Arredondada	Tronco-cónica	Oblongo-cónica, alongada	Oblongo-cónica	
Sabor	Agridoce	Doce	Ácido	Doce	
Textura	Medianamente consistente e sumarenta	Consistente e sumarenta	Consistente e sumarenta	Macia e sumarenta	
Polpa		Creme clara		Branca	

Tabela 5 - Variedades de maçãs menos cultivadas em Portugal.

	Riscadinha de Palmela	Casanova de Alcobaça	Granny Smith	Pink Lady
Aspeto				
Origem	Portugal	Portugal	Austrália, 1868	Austrália
Cor	Verde-amarelada, com riscas vermelhas	Manchas avermelhadas e amareladas	Completamente e intensamente verde	Cor-de-rosa avermelhada com manchas amarelas esverdeadas
Forma	Achatada irregular	Cónica-oblonga ou tronco-cónica	Redonda-globosa	Redonda-globosa
Sabor	Doce e ácido	Agridoce	Ácido	Agridoce
Textura	Muito sumarenta	Consistente e medianamente sumarenta	Elevada consistência e muito sumarenta	Consistente e sumarenta
Polpa	Esverdeada	Branca	Branca	Branca

5. Qualidade das maçãs

A FAOSTAT define em várias normas a qualidade das maçãs (228). É de extrema importância o controlo rigoroso da qualidade das maçãs fornecidas ao consumidor após a sua preparação e embalagem (228). As maçãs são transportadas para centrais de fruta onde são separadas por lotes e rotuladas. São conservadas em câmaras de atmosfera normal e/ou controlada e, para cada variedade, são definidos a temperatura/humidade e o tempo de conservação. Antes do embalagem das maçãs dos vários lotes, estas são lavadas e separadas pelo seu calibre (229).

5.1 Requisitos mínimos da qualidade das maçãs

A FAOSTAT apresenta uma série de requisitos mínimos de qualidade para as várias variedades de maçã:

- Inteiro, pode não apresentar caule, mas a fenda tem de estar limpa e a pele adjacente tem de estar sem danos;
- Saudável, o produto que apresenta apodrecimento é excluído pois não é próprio para consumo;
- Firme;
- Limpo, que não esteja presente qualquer tipo de matéria estranha;
- Livre de pragas e de tecido afetado por estes;
- Ausência de humidade externa fora do normal, à exceção da condensação que ocorre após remoção do armazenamento a frio;
- Ausência de odor e/ou sabor estranhos;
- Sem danos provocados por baixas e/ou altas temperaturas;
- Sem sinais de desidratação.

Durante o manuseamento e transporte das maçãs devem ser mantidos os requisitos de qualidade, de forma a chegarem inalteradas ao destino (228).

5.2 Importância da maturação das maçãs

Durante o desenvolvimento das maçãs, mais concretamente no período de amadurecimento, existem algumas características que têm de ser verificadas, tais como, os aspetos morfológicos, a firmeza e o índice refratométrico (228).

A qualidade dos frutos é modificada durante a fase de maturação, e estas alterações fazem aumentar o tamanho e a massa do fruto, a respiração, o etileno, os sólidos solúveis e a cor, enquanto há uma diminuição da acidez, firmeza e do teor de clorofila. Na fase de maturação também há um controlo da cor das maçãs, que é um fator apelativo para o consumidor. O desenvolvimento da cor é mais acentuado duas semanas antes da colheita e uma semana depois da colheita. A rigidez também é outro fator importante para a qualidade das maçãs, em termos do aspeto que apresenta, pelo que é essencial encontrar formas de armazenamento que diminuam o amolecimento dos tecidos da maçã (217).

As maçãs têm a particularidade de ter um maior tempo de conservação e, deste modo, elas são comercializadas fora da época de colheita, uma vez que existem maçãs do ano anterior que foram conservadas em câmaras de frio. Existem alguns parâmetros que definem a qualidade da maçã durante o tempo que está a ser conservada, nomeadamente, o estado de maturação, a temperatura à qual o fruto está armazenado, a utilização e o momento em que se utiliza a atmosfera controlada (217).

Uma forma de manter ou reduzir as alterações das características qualitativas da maçã, aumentando assim o seu tempo de conservação, é a refrigeração em atmosfera controlada (217).

5.3 Classificação das maçãs

As maçãs são classificadas em três grupos, de acordo com os defeitos que são permitidos nos frutos (228):

- Classe Extra: maçãs com qualidade superior. Tecido saudável. Ausência de defeitos, com exceção de defeitos muito leves na superfície mas que não afetam a aparência do fruto, a qualidade, a qualidade de conservação e a apresentação na embalagem.

- Classe I: maçãs com boa qualidade. Tecido saudável. Podem apresentar defeitos ligeiros mas que não afetam a aparência do fruto, a qualidade, a qualidade de conservação e a apresentação na embalagem. Esses defeitos ligeiros podem ser na forma, no desenvolvimento, na cor, pele leve, entre outros.
- Classe II: maçãs que não são incluídas nos grupos anteriores, mas que cumprem os requisitos mínimos de qualidade anteriormente referidos. Têm de manter as características essenciais de qualidade, conservação e apresentação, mas podem apresentar defeitos na forma e desenvolvimento, na cor, na pele, entre outros.

O máximo de defeitos permitidos nas maçãs está presente na Tabela 6 (228).

Tabela 6 - Máximo de defeitos permitidos nas maçãs

Defeitos permitidos		Classe Extra	Classe I	Classe II
Carepa na parte exterior	Liso	3 % da área de superfície	20 % da área de superfície	50 % da área de superfície
Cavidade do cálice/haste	Sólido liso	1 % da área de superfície	5 % da área de superfície	33 % da área de superfície
Acumulação para ambos os tipos de carepa não devem ultrapassar os seguintes valores		3 % da área de superfície	20 % da área de superfície	50 % da área de superfície
Manchas e contusões acumuladas:		0,50 cm ²	1,0 cm ²	1,5 cm ²
– Contusões com ligeira descoloração				
– Cicatrizes provocadas pela sarna (<i>Venturia inaequalis</i>)			0,25 cm ²	1,0 cm ²
–Outros defeitos/ manchas, incluindo marcas de granizo curadas			1,0 cm ²	2,5 cm ²
Fissuras na haste ou cálice (curadas ou bem-curadas)		...	0,5 cm	1 cm
Comprimento máximo de defeitos de forma alongada		...	2 cm	4 cm

6. Composição química

A maçã é um fruto benéfico para a saúde humana quer na prevenção quer no tratamento de doenças devido à diversidade dos seus nutrientes, tais como, vitamina C, beta-caroteno, cálcio, potássio, magnésio, ferro, zinco, ácidos fólico, málico e tartárico, pectinas, fibras, ácidos fenólicos e flavenóis (215).

Este fruto tem um sabor agradável por ser uma fruta doce devido ao teor elevado de açúcares na sua constituição (230). Apresenta um sabor ligeiramente ácido por apresentar valores de pH entre 3 e 4 (231).

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) 90 % da maçã é edível; por cada 100 g dessa porção edível a maçã possui 64 kcal, o que corresponde a 269 kJ. A maçã é essencialmente constituída por água e apresenta uma elevada percentagem de carbono. A composição e a distribuição energética da maçã fresca com casca estão presentes nas Figura 18 e Figura 19, respetivamente (232).

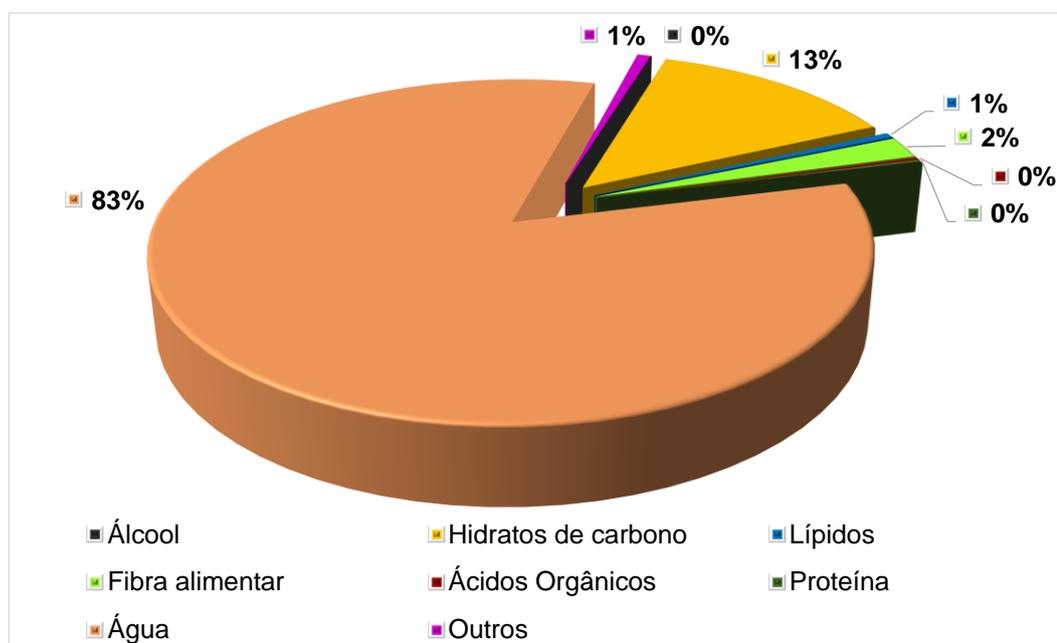


Figura 18 - Composição nutricional da maçã com casca.

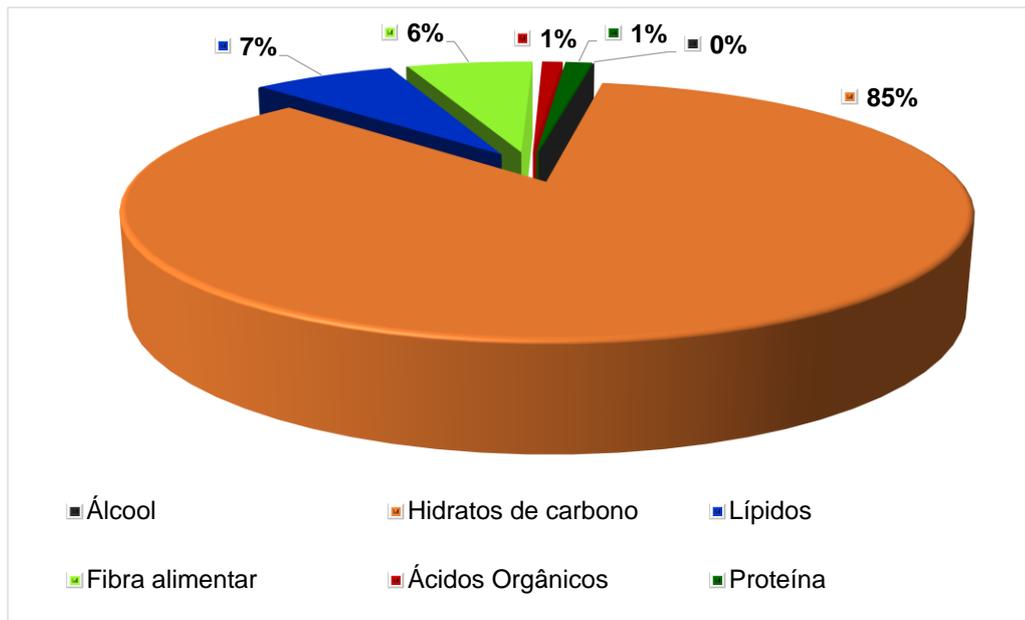


Figura 19 - Distribuição energética da maçã com casca.

Entre cada variedade de maçã os valores da composição nutricional são diferentes. A Tabela 7 apresenta algumas variedades de maçãs e os respetivos valores da composição nutricional (230, 233).

Tabela 7 - Composição nutricional das diferentes variedades de maçãs.

Variedade de Maçãs	Energia (kcal/100 g)	Água (g/100 g)	Fibra alimentar (g/100 g)	Hidratos de carbono (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Gordura (g/100 g)
Golden	49,6	86,6	1,5	12,8	0,33	0,10
Fuji		82,0	2,03	12,87	0,08	
Reineta	61,2	81,7	2,4	17,5	0,47	0,10
Starking	52,2	84,3	2,0	15,1	0,33	0,10
Jonagored	54,1	82,7	2,2	16,7	0,27	0,10
Bravo Esmolfe		81,38	2,27	11,90	0,09	
Casanova de Alcobaça	53,4	83,6	2,7	15,7	0,30	0,13
Granny Smith	45,2	87,7	1,9	11,5	0,47	0,10

7. Consumo de maçãs e benefícios para a saúde

O consumo de maçã traz variadíssimos benefícios para a saúde humana, nomeadamente a prevenção do colesterol ou mantendo os valores do mesmo em níveis que não sejam prejudiciais e auxiliando no emagrecimento. Isto ocorre, devido ao facto da casca da maçã apresentar concentrações elevadas de pectina que vai dificultar a absorção das gorduras, da glicose e elimina o colesterol (217).

Devido ao elevado teor em potássio, o consumo de maçãs também diminui a retenção de líquidos, permitindo eliminar o excesso de sódio (217).

Também tem efeitos benéficos ao nível do coração, participando na prevenção da arteriosclerose, ou seja, vai evitar que se deposite gordura na parede arterial, melhorando a circulação sanguínea. Também estão documentados outros efeitos benéficos, nomeadamente prevenção de gripes, elimina toxinas do sangue, auxilia no tratamento da prisão de ventre, problemas digestivos, reumatismo, entre outros (217, 234-236).

8. Sumos de maçã

Grande parte da produção nacional de maçãs é utilizada para produzir alimentos processados, como por exemplo, sumos, néctares, sopas e purés para alimentação infantil. A fruta utilizada nestes produtos é fruta madura, que pode estar contaminada com fungos produtores de patulina (237).

O sumo de maçã é consumido mundialmente por ser nutritivo e ter sabor agradável. No entanto, nestes sumos é frequente encontrar patulina (238).

A patulina tem sido detetada nos sumos à base de maçã, em diversos estudos de ocorrência realizados em vários países, tais como Portugal (1), Brasil (239), Turquia (240), Japão (241), África do Sul (242), Irão (177), Itália (5) e Bélgica (243).

A presença de patulina nos sumos de maçãs é um indicativo da utilização de maçãs podres na produção do sumo. A utilização de fruta de boa qualidade, isto é, a utilização de frutas não danificadas reduz o teor de patulina nestes produtos (5, 244). A presença de patulina também indica que esta micotoxina é estável nas etapas de produção dos sumos de maçãs (245).

O *Codex Alimentarius* recomenda que durante todas as etapas de produção dos sumos de maçãs sejam implementadas as Boas Práticas Agrícolas (BPA) e as Boas Práticas de Fabrico (BPF), para que a concentração de patulina seja reduzida ou mesmo eliminada (190). A FAO também recomendou a implementação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo, *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) (246).

Independentemente das boas práticas de produção ou fabrico do sumo, a variedade da maçã utilizada e conseqüentemente as suas propriedades físico-químicas podem favorecer ou limitar a produção de patulina, em função do tipo de fungo que nelas se desenvolve.

Deste modo, é importante avaliar se há ou não condições intrínsecas a cada variedade de maçã que favoreçam o desenvolvimento de determinadas espécies de fungos e conseqüentemente a produção de patulina. Esta relação pode ter um peso significativo na seleção das maçãs para a produção de sumo, principalmente nos sumos destinados à alimentação infantil. Na ausência de informação mais específica, a fruta destinada à produção de sumos é pautada pela produção de cada variedade de maçã, em cada ano.

8.1 Processo de Produção de sumos

A Figura 20 apresenta as várias etapas do processamento de sumos de maçã (247).

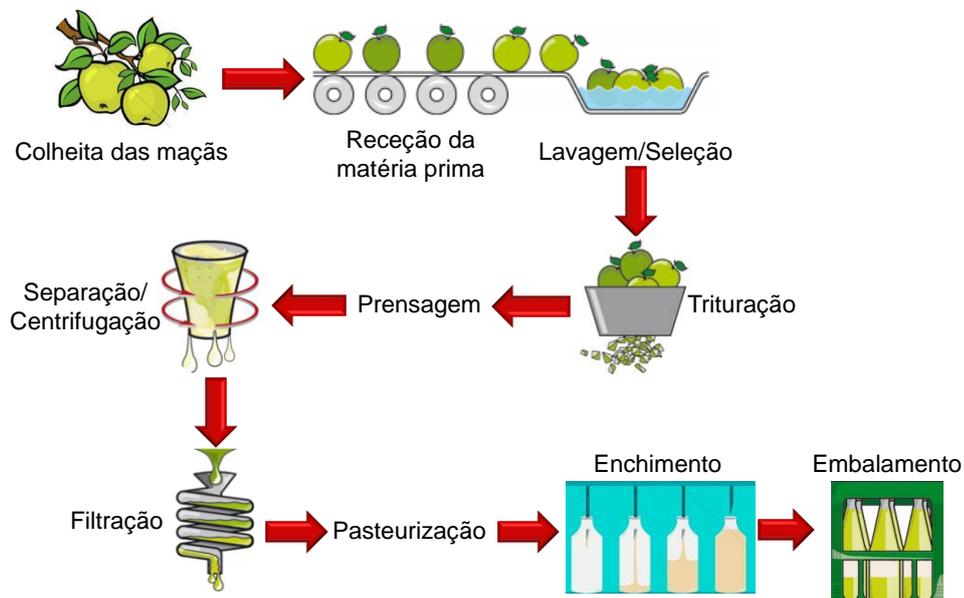


Figura 20 - Processamento de sumos de maçã.

Nas etapas de pré-colheita e colheita das maçãs para processamento do sumo há que ter em conta que o crescimento fúngico nem sempre é visível e, por isso, maçãs que não apresentem danos visíveis podem apresentar patulina. Assim, é de extrema importância aplicar nestas etapas boas práticas agrícolas (245). As maçãs utilizadas neste processo que apresentem patulina, transferem esta micotoxina para o produto final. Esta micotoxina é estável em meio ácido e não é eliminada com temperaturas mais elevadas durante a produção dos sumos de maçã. No entanto, existem etapas que podem reduzir os teores desta micotoxina, como a lavagem, seleção, prensagem e filtração (199, 205).

A técnica de lavagem que apresenta um maior controlo nas maçãs infetadas por fungos é a oxidação eletrolítica (OE) em suspensão aquosa, em alternativa à utilização de desinfetantes de cloro (248). Na fase de seleção, a quantidade de patulina também pode ser reduzida por remoção das maçãs podres ou danificadas (205). Nas etapas de centrifugação e filtração a utilização de carvão ativado reduz os níveis de patulina no sumo de maçã (249).

Alguns estudos demonstram que mesmo com concentrações elevadas de patulina nas fases anteriores à fase de pasteurização, torna-se difícil reduzir os teores de patulina no produto final (250, 251).

No enchimento e embalagem, o material de embalagem utilizado também pode afetar o nível de patulina (245).

No final de todo este processo há a possibilidade de sobreviverem fungos que sejam resistentes à temperatura da pasteurização e criarem as condições necessárias e produzir patulina durante o armazenamento (245).

Capítulo IV – Parte experimental



Capítulo IV - Parte experimental

A parte experimental deste trabalho está dividida em duas partes: Parte A) análise química das várias variedades de maçãs e Parte B) isolamento e identificação fúngica.

Na análise química, com exceção da determinação da patulina, só foi realizada uma réplica de cada parâmetro em cada variedade de maçã. Estas determinações tiveram como objetivo fazer uma breve caracterização química das várias variedades de maçã.

Parte A – Análise química

1. Equipamento e material

1.1 Equipamento

- Agitador vórtex, modelo REAX 2000, Heidolph
- Balança analítica, modelo AB204-S, Mettler Toledo
- Balança de precisão, modelo, PCB 1000-2, KERN
- Banho de água, modelo 230A, Combimax
- Banho de ultrassons, Selecta
- Bomba de vácuo, modelo DOA-P730-BN, PALL Life Sciences
- Centrífuga, modelo, 2K15 Sigma
- Cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC), Beckman Coulter, System Gold 126, equipado com:
 - Detector UV/Vis, modelo 166
 - Sistema de solventes, modelo 168
- Espectrofotómetro UV-Visível, Hitachi U-2000
- Espectrofotómetro de absorção atómica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, Perkin Elmer 4110ZL, equipado com amostrador automático AS-72, Perkin Elmer
- Estufa, Memmert
- Potenciómetro multiparamétrico, Crison, GPL22 equipado com:
 - Eléctrodo combinado de vidro para amostras líquidas, Crison
 - Eléctrodo combinado de vidro para amostras sólidas, semi-sólidas e pastosas, Eutech

- Sonda de compensação automática da temperatura, Crison
- Mufla, modelo MR170, Heraeus
- Sistema de obtenção de água ultra-pura, sistema de osmose inversa, modelo Rios 16, Millipore
- Sistema de obtenção de água desmineralizada (condutividade < 2 $\mu\text{S}/\text{cm}@$ 20°C), desionizador de leito misto, Desmiwater
- Sistema manual de extração em fase sólida de 10 posições, Supelco
- Sistema de evaporação e concentração de amostras, modelo TurboVap, Biotage.

1.2 Material

Não se encontra descrito o material de uso corrente de laboratório, apenas está descrito o material específico para este estudo.

- Bureta semi-automática 25 ml, classe AS, Hirschmann
- Cartuchos de SPE, 500 mg/3 mL, Phenomenex
- Cápsula de porcelana, 25 ou 50 mL
- Células de quartzo com percurso ótico de 1 cm
- Filtros de celulose, para filtração de solventes para HPLC, 13 mm \times 0,45 μm , Millipore
- Filtros de seringa de PTFE, 13 mm \times 0,45 μm , Interchim
- Micropipetas de 200 μL e 1000 μL , Gilson
- Papel de filtro 15 cm, Fioroni
- Seringa 3 mL, Norm-Ject
- Sistema de filtração de solventes constituído por copo de vidro, funil, pinça metálica e kitasato, Millipore
- Tubos de centrífuga, com rosca, PVC, 50 mL
- Tubos de vidro de 10 mL para o Turbovap
- Vials de cor âmbar de 2 mL com tampa de rosca, Supelco

2. Reagentes

2.1 Gerais

- Acetato de etilo, ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), 99,0% *p.a.*, J.T. Baker
- Acetato de sódio anidro (NaCH_3CO_2), 99% *p.a.*, Carlo Erba
- Acetato de zinco ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 99,5-101,0% *p.a.*, Panreac
- Acetonitrilo, (CH_3CN), para HPLC, 99,9% *p.a.*, Fisher Scientific
- Ácido acético glacial 100%. (CH_3COOH), 99,8% *p.a.*, Chem-Lab NV
- Ácido clorídrico concentrado, 37% *p.a.*, Chem-Lab NV
- Ácido metafosfórico (HPO_3), 98% *p.a.*, Acros Organics
- Ácido perclórico (HClO_4) 70%, Suprapur, (HClO_4)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), 95-97%, Chem-Lab NV
- Água desionizada
- Água ultrapura
- Amoníaco 25% *p.a.*, Merck
- Ampola Titrizol de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,01M *p.a.*, Panreac
- Areia do mar purificada, José Manuel Gomes dos Santos JMGS
- Bicarbonato de sódio, (NaHCO_3), 99,5% *p.a.*, Chem-Lab NV
- Comprimidos tampão para a dureza *p.a.*, Merck
- 2,6-Diclorofenol-indofenol ($\text{OC}_6\text{H}_2\text{Cl}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{ONa}$) sal sódico, 90% *p.a.*, Riedel-de Haën
- Etanol absoluto, ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), 98,53% *p.a.*, Fisher Scientific
- Ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 99% *p.a.*, Chem-Lab NV
- Hidróxido de sódio (NaOH), *p.a.*, 98,5%, *p.a.*, José Manuel Gomes dos Santos
- Murexida *p.a.*, Merck
- n-hexano, (C_6H_{14}), $\geq 95\%$, para HPLC, Fisher Scientific
- Sulfato de sódio anidro, (Na_2SO_4), 99,0% *p.a.*, PanReac AppliChem
- Sulfato férrico, ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), 97% *p.a.*, Acros Organics
- Tartarato de potássio e sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{O}_6\text{H}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 99,5% *p.a.*, Chem-Lab NV
- Xileno, 99,0% *p.a.*, PanReac AppliChem

2.2 Padrões

- Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), 99,7% *p.a.*, Panreac
- Material de referência certificado (MRC), TMDA-70.2, lote 0916, Environmental and Climate Change Canada, Canada.Ca
- Patulina (4- hidroxi-4H-furo (3,2-c)pirano-2(6H)-ona), 98%, Toronto Research Chemicals
- Solução padrão multielementos, *ICP multi-element standard VI*, Merck

3. Soluções

Todas as soluções preparadas foram armazenadas em material de vidro, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

3.1 Determinação de metais

Os metais foram analisados no Laboratório de Águas do Litoral Alentejano (LALA). A preparação das soluções e respetiva análise foram da responsabilidade do laboratório. Neste capítulo apenas será apresentado o equipamento, material e reagentes utilizados pelo LALA. A preparação das amostras, nomeadamente mineralização e dissolução em ácido sulfúrico 5N foi realizada no Laboratório de Bromatologia e Qualidade da Água.

Solução de ácido sulfúrico H_2SO_4 5N

Diluir 70 mL de ácido sulfúrico concentrado com água ultrapura e perfazer 500 mL.

3.2 Determinação da dureza total (cálcio e magnésio)

Solução de NaOH 1N

Pesar cerca de 40 g de NaOH. Transferir para balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar com água desmineralizada. Guardar a solução num frasco de cor âmbar.

3.3 Determinação dos açúcares totais

Solução acetato de zinco a 30%

Pesar 89,72 g de acetato de zinco ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) para um balão volumétrico de 250 mL, dissolver com água desionizada e perfazer o volume. Transferir o preparado para um frasco de cor âmbar.

Solução alcalino tartárica

Pesar 200 g de tartarato de potássio e sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{O}_6\text{H}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dissolver numa pequena quantidade de água desionizada, adicionar 37 g de hidróxido de sódio, dissolver o conteúdo e completar o volume de 1000 mL.

Solução de ferrocianeto de potássio

Pesar 43 g de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), transferir para balão volumétrico de 250 mL, dissolver em água desionizada e perfazer o volume. Colocar a solução num frasco de vidro de cor âmbar.

Solução de permanganato de potássio

Pesar 3,161 g de permanganato de potássio (KMnO_4) e diluir em água desionizada para um balão volumétrico de 1000 mL.

Solução de sulfato férrico

Pesar 50 g de sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), dissolver em água desionizada, adicionar 109 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após o arrefecimento, completar o volume de 1000 mL.

3.4 Determinação do teor de ácido ascórbico

3.4.1 Soluções gerais

Solução de ácido metafosfórico a 6% e de ácido acético

Colocar num balão volumétrico de 500 mL, 30g de ácido metafosfórico, 80 mL de ácido acético glacial e 200 mL de água desmineralizada. Agitar o balão, até dissolução do preparado e perfazer o volume com água desmineralizada. Filtrar a solução e guardar no frigorífico em frasco de cor âmbar.

Solução de ácido metafosfórico a 3%

Adicionar a 500 mL de água desmineralizada, 250 mL de solução de ácido metafosfórico a 6%. Guardar a solução no frigorífico em frasco de cor âmbar.

Solução de 2,6-diclorofenol-indofenol

Num balão volumétrico de 1000 mL, dissolver 250 mg de sal sódico de 2,6-diclorofenol-indofenol em 500 mL de água quente (temperatura entre 50 – 60°C) contendo 210 mg de bicarbonato de sódio. Arrefecer a solução e completar o volume com água desmineralizada. Filtrar e guardar em frasco de vidro de cor âmbar.

Solução tampão pH 4 (acetato de sódio/ ácido acético)

Adicionar 300 g de acetato de sódio anidro a 700 mL de água e adicionar 1L de ácido acético glacial.

3.4.2 Soluções padrão

Solução mãe de ácido ascórbico, 1 g/L

Pesar com rigor 50 mg ($\pm 0,0005$ g) de ácido ascórbico. Transferir para um balão volumétrico de 50 mL, dissolver e completar o volume com solução de ácido metafosfórico a 3%. Como esta solução é instável, deve proceder-se imediatamente à aferição da solução de 2,6-diclorofenol-indofenol.

Diluir 10 mL da solução padrão de ácido ascórbico com 10 mL da solução de ácido metafosfórico a 3%. Titular rapidamente com a solução de 2,6-diclorofenol-indofenol até coloração rosa persistente durante 5 segundos.

Repetir a titulação mais duas vezes, registrando o volume da solução de 2,6-diclorofenol-indofenol gasto de cada vez. Os três valores obtidos não devem diferir entre si mais que 0,1 mL.

Fazer um ensaio em branco, substituindo a solução de ácido ascórbico por igual volume de solução de ácido metafosfórico a 3%, isto é, titular 20 mL de solução de ácido metafosfórico a 3%.

Subtrair ao volume médio da solução de 2,6-diclorofenol-indofenol gasto nas três titulações, o volume gasto no ensaio em branco e expressar a concentração da solução de 2,6-diclorofenol-indofenol em massa, em miligramas, de ácido ascórbico equivalente a 1,0 mL da solução.

Solução padrão de ácido ascórbico, 3 mg/L

Diluir 150 µL de solução mãe de ácido ascórbico (1 g/L) e diluir para 50 mL com ácido metafosfórico a 3%.

3.5 Determinação da patulina

A preparação das soluções está de acordo com o apresentado por Barreira e colaboradores, adaptado às condições laboratoriais (principalmente equipamento) e ao tipo de amostra em análise, maçãs (1, 141).

3.5.1 Soluções gerais

Água a pH = 4

Num litro de água ultrapura ajustar o seu pH com ácido acético (0,2%). Colocar esta solução em frasco de vidro e desgaseificar no ultrassons durante 15 minutos.

Ácido acético em acetato de etilo

Juntar 3 mL de ácido acético glacial 100% a 97 mL de acetato de etilo. Misturar muito bem a solução e reservar em frasco de vidro.

Ácido acético 0,2%

Num balão de 250 mL pipetar 0,5 mL de ácido acético glacial e completar com água ultrapura.

Solução de extração acetato de etilo-n-hexano (60+40, V/V)

Adicionar 180 mL de acetato de etilo a 120 mL de n-hexano. Misturar a solução e guardar em frasco de vidro.

Solução de ácido perclórico 60%

Para um balão volumétrico de 100 mL adicionar 51 mL de ácido perclórico 70% e perfazer o volume com água desionizada. Homogeneizar a solução e colocar num frasco de vidro.

Fase móvel para HPLC

Medir 940 mL de água ultrapura, juntar 60 mL de acetonitrilo e 1 mL de ácido perclórico a 60%. Filtrar a fase móvel com um filtro de 0,45 µm.

3.5.2 Soluções de calibração

Solução mãe de calibração (200 mg/L)

Medir 5 mL de acetato de etilo e transferir para o frasco que contém a patulina. Dissolver totalmente o conteúdo. Transferir toda a solução para um balão volumétrico de 25 mL e perfazer o volume com acetato de etilo. Armazenar esta solução em frascos de vidro com tampa de rosca a -20°C. Esta solução permanece estável durante 6 meses. Cada vez que se utiliza esta solução, a sua concentração é aferida de acordo com o procedimento descrito para a solução padrão de calibração.

Solução padrão de calibração, intermédia I (10 mg/L)

Evaporar 1 mL da solução mãe até à secura no rota-vapor. Dissolver o resíduo resultante em 5 mL de etanol. Transferir para um balão de 20 mL e perfazer o volume com o mesmo solvente. Armazenar esta solução a -20°C. Determinar a concentração da solução de patulina por espectrofotometria ($\lambda = 276$ nm). Colocar a solução numa célula de quartzo de 1 cm e na outra célula colocar etanol como branco. Aferir a concentração da solução de patulina usando a equação 1:

$$C = A_{max} \times PM \times \frac{100}{\varepsilon} \times \delta \text{ (Equação 1)}$$

Em que:

C – concentração de patulina, mg/L.

A_{max} – absorvância da solução de patulina no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvância (276 nm).

PM – peso molecular da patulina (154,12 g/mol).

ε – coeficiente de absorção molecular para a solução de patulina a 276 nm (1460 m²/mol em etanol).

δ – percurso ótico da célula, em cm.

Preparar duas soluções padrão de calibração, intermédia I. Uma das soluções é para o estudo da linearidade, a outra é para o estudo da homogeneidade de variâncias, precisão e da veracidade.

Solução padrão de calibração, intermédia II (1 mg/L)

Diluir de 1 mL de solução padrão de calibração intermédia I para 10 mL com etanol. Preparar duas soluções padrão de calibração, intermédia II. Uma das soluções é para o estudo da linearidade, a outra é para o estudo da homogeneidade de variâncias, precisão e da veracidade.

3.5.3 Soluções padrão para o estudo da linearidade

Proceder à preparação de 25 soluções padrão de patulina com concentrações entre 0,22 µg/L e 100 µg/L. Os volumes medidos para a preparação dessas soluções são sempre ajustados de acordo com a concentração de patulina aferida na solução intermédia I (10 mg/L). Os padrões de calibração de concentrações entre 0,22 µg/L e 70 µg/L foram preparados a partir da solução intermédia II, enquanto os padrões de calibração de concentração entre 80 e 100 µg/L foram preparados a partir da solução intermédia I.

3.5.4 Soluções padrão para o estudo da homogeneidade de variâncias

Preparar 10 soluções independentes de solução padrão de patulina de concentração 2 µg/L, 4 µg/L, 6 µg/L, 8 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 80 µg/L e 100 µg/L. Estas soluções são preparadas de acordo com o procedimento para a preparação das soluções padrão do estudo da linearidade.

4. Amostras

As maçãs em estudo foram de nove variedades diferentes, às quais foram atribuídas acrónimos para facilidade de representação gráfica:

- Bravo Esmolfe, BrE;
- Fuji, Fuj;
- Golden, Gd;
- Granny Smith, GrS;
- Pink Lady, PkL;
- Red Delicious, RD;
- Reineta, Rein;
- Royal Gala, RG;
- Starking, Stk.

A toma de amostras foi de 10 maçãs de cada variedade. Foi registada a massa e dimensão das maçãs (largura x altura).

As maçãs foram armazenadas no laboratório à temperatura ambiente durante 4 meses (25 maio 2018 a 21 setembro 2018), agrupadas por variedade e acondicionadas em caixas de cartão abertas.

A determinação da patulina foi realizada nas maçãs podres: 25%, 50% e 100% de apodrecimento.

A determinação dos restantes parâmetros da qualidade das maçãs foi realizada no fruto fresco e sem sinais de apodrecimento.

5. Determinação das características físico-químicas das maçãs

De cada variedade de maçã foi selecionada uma maçã sã para a sua caracterização físico química. As maçãs foram lavadas com água corrente, secas com papel adsorvente e raladas.

5.1 Determinação do resíduo seco de maçã

Pesar uma cápsula com areia e vareta (m_1), adicionar cerca de 16 g de maçã e registar a massa (m_2). Com o auxílio da vareta misturar a areia com a amostra de maçã. Secar até massa constante na estufa a 105°C (m_3).

O resíduo seco da maçã é calculado pela equação 2 (252):

$$\text{Resíduo Seco (\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

5.2 Determinação do pH

Proceder à calibração do equipamento de acordo com o procedimento técnico do equipamento.

A determinação do pH foi feita por dois métodos: método direto e indireto (252). No método direto colocar uma determinada quantidade de maçã ralada no copo e ler o pH. No método indireto, pesar determinada massa de maçã para dentro de um copo e misturar com igual massa de água desmineralizada e morna. Misturar com o auxílio de uma vareta e ler o pH.

5.3 Determinação do teor de cinzas

Registrar a massa de um cadinho pré-tratado (calcinação e arrefecimento em exsiccador), (m_1). Colocar uma quantidade de maçã ralada (cerca de 75% do volume do cadinho) e registrar a massa (m_2). Secar na estufa a 105°C (cerca de 3 dias). Carbonizar lentamente à chama e calcinar em mufla a 600°C até obter cinzas brancas (cerca de 4 horas). Arrefecer em exsiccador e registrar a massa da cinza (m_3). O teor em cinza expressa-se em percentagem (%) e é calculado de acordo com a seguinte fórmula (252):

$$\text{Cinza (\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

5.4 Determinação do cálcio e da dureza

Para cada tipo de maçã, colocar numa cápsula cerca de 10 g de maçã. Secar na estufa a 105 °C (252). Carbonizar lentamente à chama e calcinar em mufla a 600°C até obter cinzas brancas (cerca de 4 horas). Dissolver o resíduo em água desmineralizada num balão volumétrico de 50 mL, adicionar 3 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5N e perfazer o volume com água desmineralizada. A solução obtida foi utilizada na determinação da dureza e do cálcio (S_{DCa}).

5.4.1 Determinação da dureza

Medir 10 mL da amostra preparada anteriormente (S_{DCa}) para um matraz e adicionar 40 mL de água desmineralizada. Dissolver uma pastilha de tampão indicadora para dureza (tampão + negro de eriocromo T) e adicionar 2 mL de amónia a 25%. Verificar se o pH = 10, caso contrário adicionar mais amónia a 25%. A solução apresenta uma coloração vermelho-vinoso (252).

Titular com EDTA 0,01M até viragem para verde escuro. Registrar o volume de titulante utilizado.

A dureza é calculada através da equação 4:

$$\text{Dureza total (mg CaCO}_3\text{/100 g)} = \frac{n \times M \times 10^6}{m \times V} \quad (\text{Equação 4})$$

n – Volume de EDTA adicionado à amostra, mL

M – Molaridade do EDTA

V – Volume de amostra em estudo, mL

m – massa da toma de maçã, g.

5.4.2 Determinação do cálcio

Num matraz adicionar 25 mL de solução amostra ($S_{D_{Ca}}$) e acertar a pH=12 com NaOH 5 N. Adicionar uma pitada de murexida e titular com EDTA 0,01M até que a coloração mude de rosa para violeta. Registrar o volume de titulante gasto.

A concentração em cálcio é dada pela equação:

$$\text{Cálcio (mg /100 g)} = \frac{n \times M \times 40 \times 10^4}{m \times V} \quad (\text{Equação 5})$$

n – Volume de EDTA adicionado à amostra, mL

M – Molaridade de EDTA

V – Volume de amostra em estudo, mL

m – massa da toma de maçã, g.

5.4.3 Determinação do magnésio

O magnésio é determinado por cálculo, com base no valor da dureza e do cálcio.

5.5 Determinação de açúcares

Determinar os açúcares totais pela técnica de Bertrand (252).

a) Diluição da amostra

Pesar cerca de 20 g de maçã ralada e dissolver em água desmineralizada morna. Diluir para 200 mL.

b) Defecação

Para um balão volumétrico de 200 mL medir 100 mL do preparado anterior, adicionar 2 mL de ferrocianeto de potássio, 2 mL de acetato de zinco, misturar e completar o volume com água desmineralizada. Homogeneizar por inversão, deixar repousar para depositar o precipitado e compensar o volume de floculado com água desmineralizada (\approx 5 mL). Deixar sedimentar e filtrar.

c) Inversão

Num balão volumétrico de 200 mL, medir 50 mL do filtrado e adicionar 0,5 mL de HCl concentrado. Misturar e colocar em banho de água fervente durante 30 minutos. Arrefecer, completar o volume com água desmineralizada e misturar.

d) Redução

Para um erlenmeyer de 200 mL, medir com pipetas volumétricas, respectivamente 20 mL de sulfato de cobre, de solução alcalino tartárica e da solução de maçã resultante da inversão. Levar à ebulição (3 minutos exatos) e deixar arrefecer para que o óxido cuproso sedimente.

e) Filtração e dissolução do óxido cuproso

Filtrar a solução obtida no ponto anterior com um filtro de placa de vidro poroso (G4) adaptado a um frasco de kitasato. A filtração pode ser realizada com trompa de vácuo ou com bomba de vácuo.

Lavar o precipitado retido no matraz com 20 mL de água desmineralizada. Repetir a operação 3 vezes. Rejeitar os filtrados.

Adaptar o filtro com o precipitado vermelho de óxido cuproso a um novo kitasato. Lavar o matraz com 20 mL de sulfato férrico para dissolver o precipitado remanescente, transferir para filtro de placa de vidro poroso (G4) e filtrar. Pode ser necessário utilizar mais sulfato férrico (a placa de vidro poroso deve ficar branca).

f) Titulação

Titular o filtrado com solução de permanganato de potássio N/10 até obtenção de cor de rosa persistente.

O teor de açúcares é calculado com base na equação 6:

$$\text{Glucose (g /100 g)} = \frac{Gl \times f_1 \times 100}{m} \quad (\text{Equação 6})$$

Gl – massa de glucose equivalente ao volume de KMnO_4 N/10 usado na titulação, g

f_1 – fator de diluição da amostra, $f_1 = \frac{200 \times 200 \times 200}{20 \times 50 \times 100} = 80$

m – massa de amostra, g

5.6 Determinação do teor de ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi determinado pelo método volumétrico e espectrofotométrico do 2,6-diclorofenol-indofenol (252,253).

a) Aferição da solução corante (2,6-diclorofenol-indofenol)

Misturar 10 mL de solução padrão ácido ascórbico a 3 mg/L com 10 mL de solução de ácido metafosfórico 3%. Titular com a solução corante 2,6-diclorofenol-indofenol até coloração rosa persistente durante 5 segundos. Realizar o ensaio em triplicado. Preparar um branco com 20 mL de solução de ácido metafosfórico 3%. Subtrair ao valor do volume médio da solução corante gasto nas três titulações, o volume gasto no ensaio em branco e expressar a concentração da solução corante em massa de ácido ascórbico (mg) equivalente a 1 mL da solução corante.

b) Curva de calibração

Preparar cinco tubos de centrífuga com 3 mL de ácido metafosfórico 6%, 3 mL da solução padrão de ácido ascórbico a 1000 mg/L, 3 mL da solução tampão (acetato de sódio/ácido acético), e adicionar sequencialmente a cada tubo 100 µL, 200 µL, 600 µL, 800 µL e 1000 µL da solução corante (2,6- diclorofenol-indofenol). Preparar um sexto tubo de centrífuga com o branco, no qual não se coloca a solução corante. Adicionar a cada tubo 10 mL de xileno, rolar os tubos e agitar.

Centrifugar a 3000 g durante 1 minuto, para que seja possível promover a separação das duas fases.

Transferir a fase superior para uma célula de vidro de percurso ótico de 1 cm e medir a absorvência a 500 nm. Todos os padrões são lidos contra o xileno.

Obtém-se a curva de calibração de ácido ascórbico, absorvência em função do volume da solução corante adicionado.

c) Preparação das amostras de maçã

Ralar cada variedade de maçã. Pesar 10 a 30 g de maçã e transferir essa massa para um balão volumétrico de 100 mL. Perfazer o volume com a solução de extração, ácido metafosfórico 6%. Homogeneizar o preparado. Filtrar a solução por lã de vidro. Esta solução ácida de maçã é utilizada para a quantificação do ácido ascórbico pelos dois métodos, espectrofotométrico e volumétrico.

d) Método espectrofotométrico

Num tubo de centrífuga adicionar 3 mL da solução ácida de maçã, 3 mL da solução tampão (acetato de sódio/ ácido acético) e 1 mL de solução corante. Adicionar 10 mL de xileno, rolar o tubo e agitar.

Centrifugar a 3000 g durante 2 minutos. Transferir a fase superior para a célula e medir a absorvência da fase orgânica a 500 nm. Utilizar o xileno como branco.

e) Método volumétrico

Num matraz adicionar 10 mL da solução ácida de maçã e 10 mL de ácido metafosfórico 3%. Titular este preparado e registrar o volume de titulante gasto.

A concentração em ácido ascórbico é calculada a partir da equação 7:

$$\text{Vitamina C (mg /100 g)} = \frac{(V_1 - V_2) \times M_0}{M_1} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Em que:

V_1 – Volume, em mL, da solução corante adicionada na amostra

V_2 – Volume, em mL, da solução corante em excesso, que corresponde à absorvência lida e determinado na curva-padrão

M_0 – Massa, em mg, de ácido ascórbico, equivalente a 1 mL da solução corante

M_1 – Massa, em g, contida na alíquota da amostra utilizada na redução

6. Determinação da patulina

6.1 Pré-tratamento das amostras

6.1.1 Extração

- Retirar o tecido apodrecido da maçã para uma caixa de Petri. Entre utilizações guardar a amostra no frigorífico;
- Pesar cerca de 10 g de maçã para tubo de centrífuga de 50 mL (ou tubo Falcon de 50 mL);
- Adicionar 10 ml de solvente de extração, acetato de etilo + n-hexano (60+40 V/V) e agitar;
- Num segundo tubo, misturar 2 g de areia do mar, 15 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e 2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Misturar durante um minuto no vortex. Adicionar esta mistura ao tubo que contem a amostra de maçã e o solvente de extração;
- Agitar vigorosamente com a mão durante alguns segundos e depois agitar no vortex durante 2 minutos;
- Centrifugar a solução a 1850 rpm durante 2 minutos, para que seja possível haver a separação das duas camadas.

6.1.2 Purificação do extrato por SPE

- Adicionar 50 μ L de ácido acético em acetato de etilo a cada tubo de vidro de 10 mL com tampa de rosca (tubo de recolha do eluído);
- Colocar o tubo de vidro no concentrador de SPE;
- Da solução resultante da extração medir 2,5 mL de solução de extração (obtida em 6.1.1.) para o cartucho e deixar eluir, gota a gota, para o tubo de vidro;
- Adicionar 3 mL da mistura de acetato de etilo + n-hexano (60+40, V/V) no cartucho de SPE para eluir a patulina. Quando deixar de gotejar, forçar a saída do restante solvente, por ação do vácuo (ligar a bomba de vácuo ao sistema);
- Evaporar o eluído no TurboVap a 40°C, 2,5 psi, durante 30 minutos;
- Dissolver o resíduo com 1 mL de água pH = 4. Agitar no vortex durante 3 minutos para assegurar a dissolução completa da patulina;
- Filtrar o extrato com filtros de seringa PDVF (13 mm \times 0,45 μ m) para o vial. Analisar o extrato por HPLC-UV.

6.2 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas neste procedimento estão presentes na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições cromatográficas para a análise de patulina por HPLC-UV.

Parâmetro	Condições cromatográficas
Composição da fase móvel	Água ultra-pura: acetonitrilo: ácido perclórico (94:6:0,1)
Modo	Isocrático
Fluxo do eluente	1 mL/min
Detetor de UV	Comprimento de onda fixo a 276 nm
Volume de injeção	20 μ L

A Figura 21 ilustra o processo de extração da patulina das amostras de maçã e o processo de purificação dos extratos.

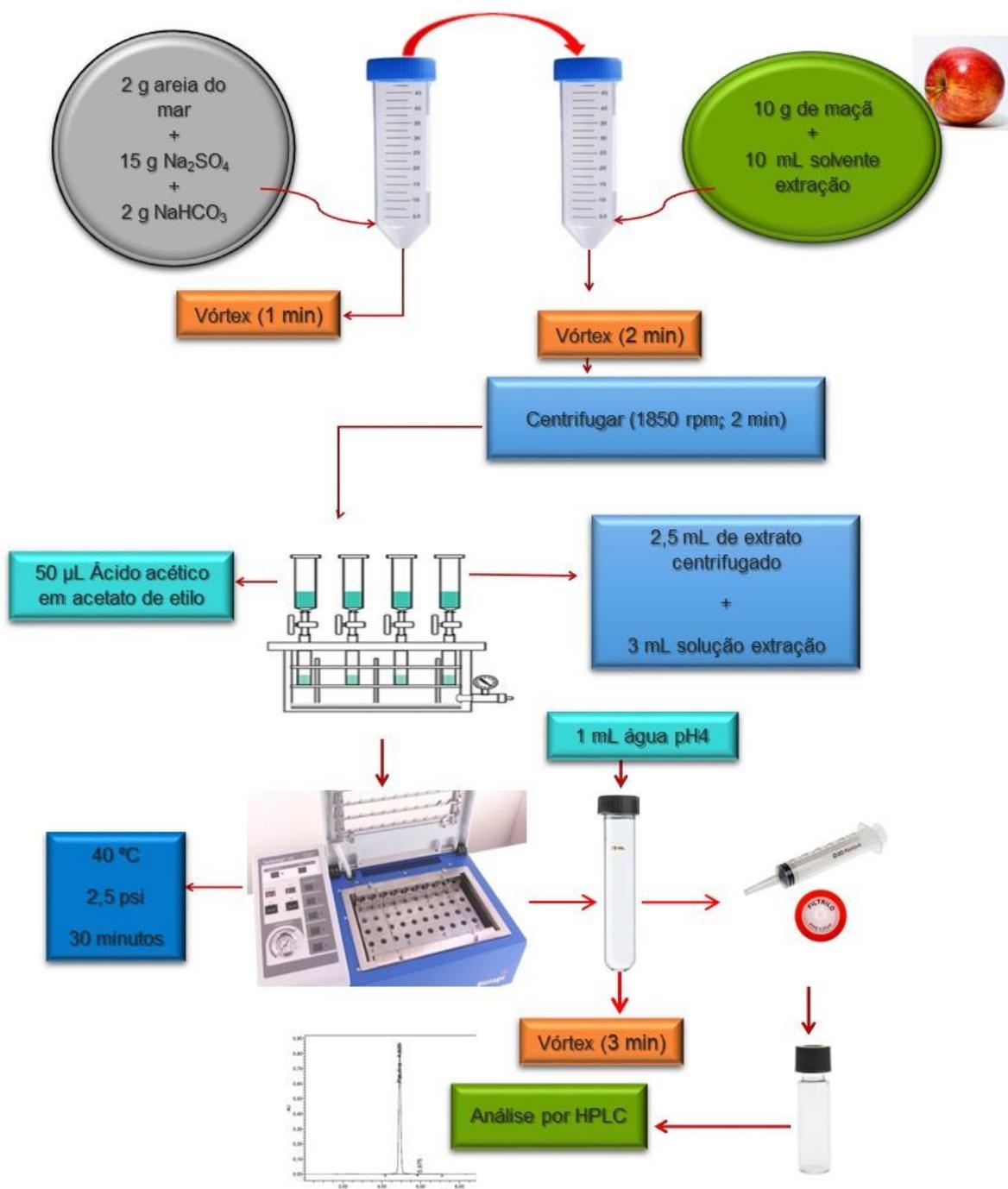


Figura 21 - Esquema do processamento das amostras de maçãs.

Parte B – Isolamento e identificação fúngica

1. Equipamento e material

- Ansa esterilizada
- Balança, OHAUS, Adventurer Pro AV 2101
- Espalhador esterilizado
- Espátula
- Lâminas e lamelas
- Matrizes
- Micropipetas de 1000 e 200 μ L e as respectivas pontas esterilizadas
- Microscópio ótico, Olympus, CX31RBSF
- Placas de Petri com PDA
- Stomaker, Seward, Laboratory Blender Stomacher 400
- Sacos de plástico estéreis
- Tubos de vidro
- Vórtex, Falc, MIX 10

2. Reagentes e meios de cultura

- Água peptonada tamponada
- Meios de cultura para fungos (PDA), preparados em caixas de Petri com 90 mm de diâmetro, esterilizados
- Azul de lactofenol

3. Procedimento da análise micológica nas amostras de maçã

Nas maçãs com um grau de apodrecimento superior a 25%, retirar com o auxílio de um bisturi, a pele da maçã na região podre e cerca de 10g de tecido de maçã apodrecido com uma espátula. Pesar diretamente para um saco de plástico estéril, adicionar à amostra 90 mL de água peptonada, levar essa preparação ao Stomaker durante 60 s no programa normal. Transferir o conteúdo do saco para um matraz.

Retirar 1000 µL da solução preparada e transferir para um tubo com 9 mL de água peptonada tamponada, misturar muito bem esta solução. Seguidamente retirar 1000 µL deste tubo para outro tubo com 9 mL de água peptonada tamponada, para assim ter duas diluições, 10^{-2} e 10^{-3} , respetivamente.

Para cada uma das diluições retirar 100 µL e colocar numa caixa com meio PDA e proceder à técnica de espalhamento. Reservar as caixas de Petri inoculadas com as amostras de maçã à temperatura de 25 - 27 °C, por um período de até 7 dias. Todas as amostras são processadas em duplicado.

A Figura 22 apresenta de forma esquemática o processamento das amostras de maçã para análise micológica.

4. Identificação micológica das amostras de maçã

Nas caixas de Petri que apresentavam colónias fúngicas (seção 3), proceder à repicagem dos fungos diferentes para a sua posterior identificação. Com o auxílio de estilete repicar os fungos e colocar no centro de uma caixa com meio PDA. Reservar as caixas resultantes à temperatura 25-27°C, por um período de até 7 dias até ao desenvolvimento do fungo.

Após o crescimento, registam-se as características macroscópicas das colónias para ajudar à identificação dos fungos contaminantes. Seguidamente procede-se à observação da morfologia microscópica através da técnica da fita-cola ou da cultura dilacerada de acordo com a textura das colónias.

4.1 Técnica da fita-cola

Com um pedaço de fita-cola tocar delicadamente no fungo a ser estudado, colar a fita-cola sobre uma lâmina à qual se adicionou uma gota de azul de lactofenol ou água e, por fim, colocar uma lamela sobre o preparado. Identificar a lâmina e observar ao microscópio.

4.2 Técnica da cultura dilacerada

Com o auxílio de um estilete esterilizado retirar uma pequena porção da colónia, colocar sobre uma lâmina à qual se adicionou uma gota de azul de lactofenol ou água, e colocar uma lamela por cima do preparado e esmagar de modo a aderir a lamela à lâmina. Identificar a lâmina e observar ao microscópio.

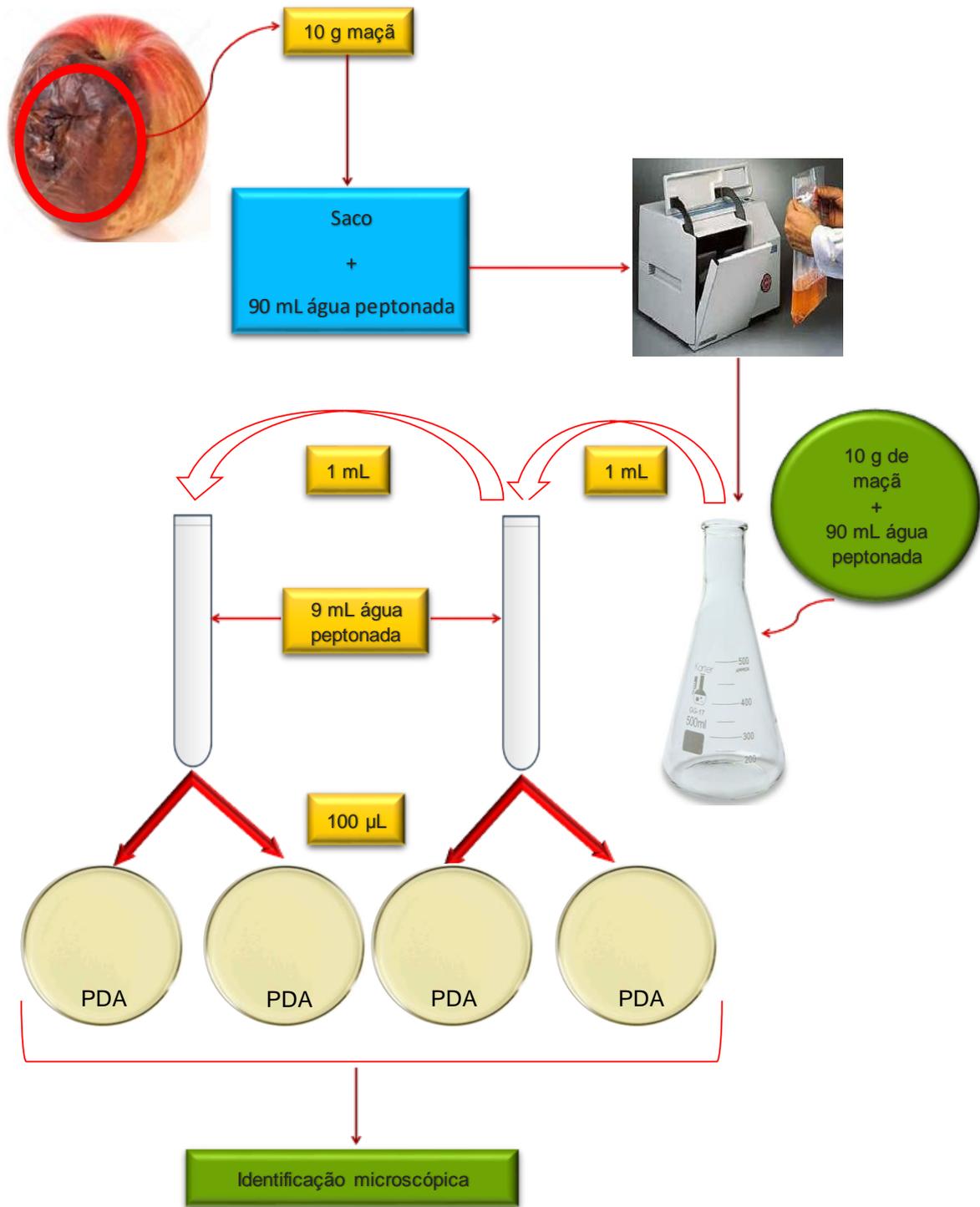


Figura 22 - Esquema do processamento das amostras de maçãs.

Capítulo V – Resultados e discussão



Capítulo V - Resultados e discussão

Os resultados são apresentados pela ordem seguida na parte experimental deste trabalho, nomeadamente, Parte A) análise química das várias variedades de maçãs e Parte B) isolamento e identificação fúngica das maçãs. Como o trabalho experimental iniciou-se pela análise química, a caracterização morfométrica dos frutos está incluída nesta seção.

Parte A – Análise química

1. Caracterização morfométrica dos frutos

A Figura 23, Figura 24 e Figura 25 apresentam a massa, altura e largura das diferentes variedades de maçã, respetivamente.

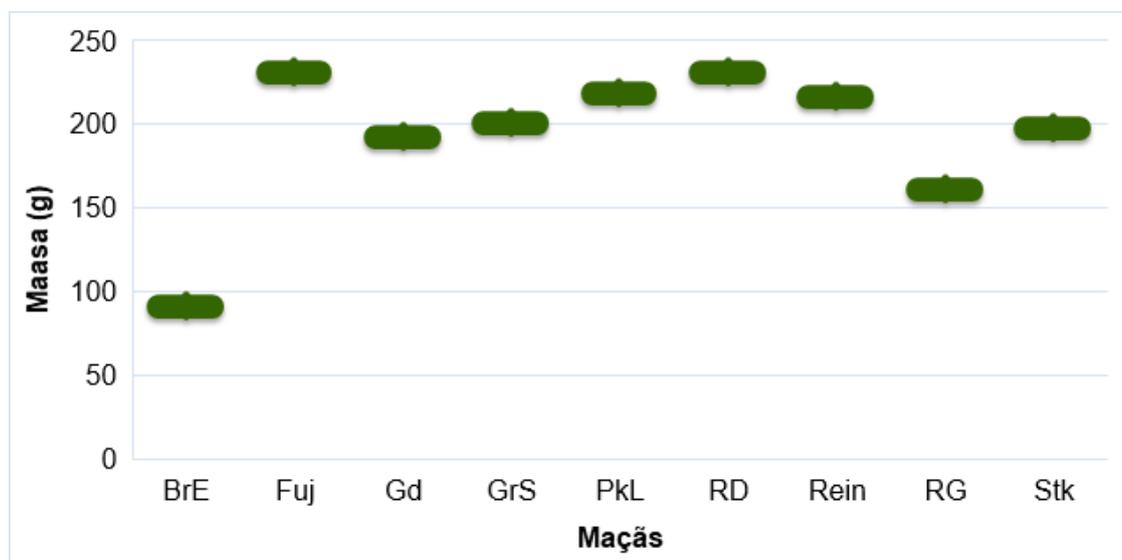


Figura 23 - Massa (g) das várias variedades de maçãs (n = 10).

A massa média das maçãs variou entre 83,9 g (Bravo Esmolfe) e 260 g (Red Delicious), com uma massa mediana de 206 g. Apenas cinco das variedades analisadas apresentaram massa médias superiores a 200 g, nomeadamente Fuji, Granny Smith, Pink Lady, Red Delicious e Reineta. Dentro de cada variedade, a

massa das maçãs foi homogênea, apresentando desvios padrão relativos (DPR) inferiores a 10%. Apenas a massa das maçãs Starking apresentou DPR na ordem dos 20%.

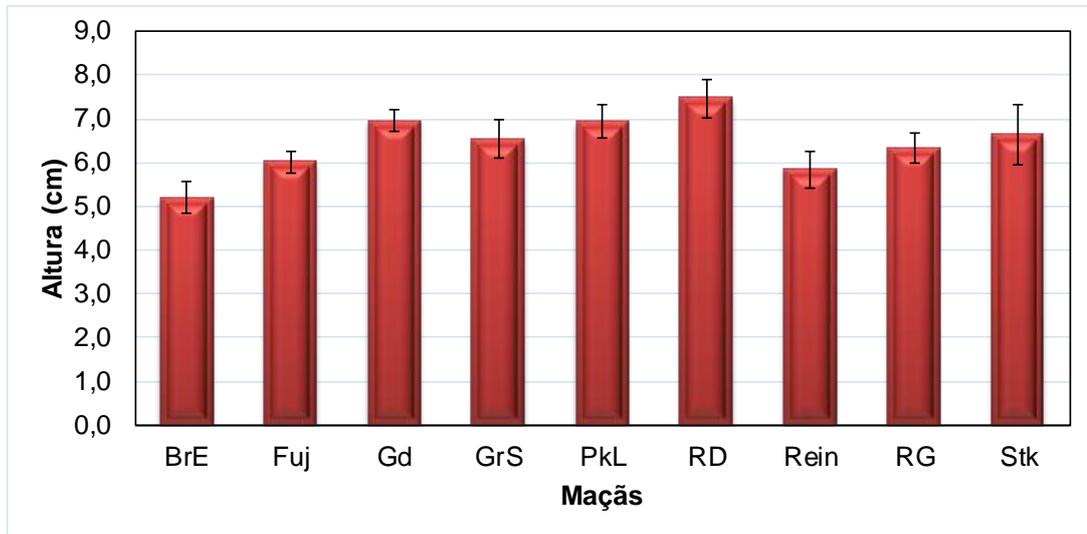


Figura 24 - Altura (cm) das várias variedades de maçãs (n = 10).

A altura das maçãs variou entre 4,7 cm (Bravo Esmolfe) e 8,2 cm (Red Delicious), com uma altura mediana de 6,4 cm. Dentro de cada variedade, a altura das maçãs foi homogênea, apresentando DPR inferiores a 10%.

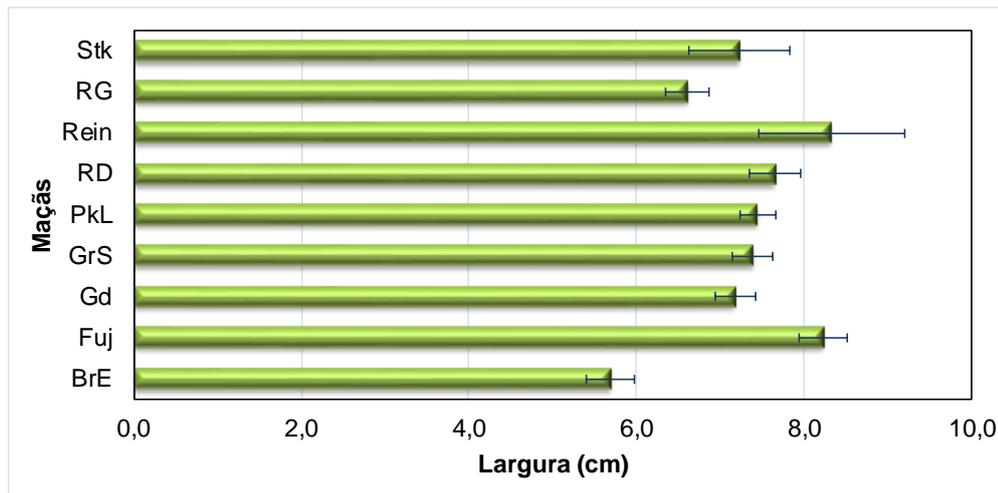


Figura 25 - Largura (cm) das várias variedades de maçãs (n = 10).

A largura das maçãs variou entre 5,3 cm (Bravo Esmolfe) e 10 cm (Reineta), com uma largura mediana de 7,3 cm. Dentro de cada variedade, a largura das maçãs foi homogênea, apresentando DPR inferiores a 10%.

Relativamente à massa e dimensões das maçãs, podemos concluir que as maçãs mais pequenas pertencem à variedade Bravo Esmolfe. Dentro de cada variedade as maçãs foram homogêneas.

2. pH

O pH dos frutos foi determinado diretamente na amostra e no fruto triturado e misturado em partes iguais com água de alta qualidade. A Figura 26 apresenta os resultados obtidos por ambos os métodos.

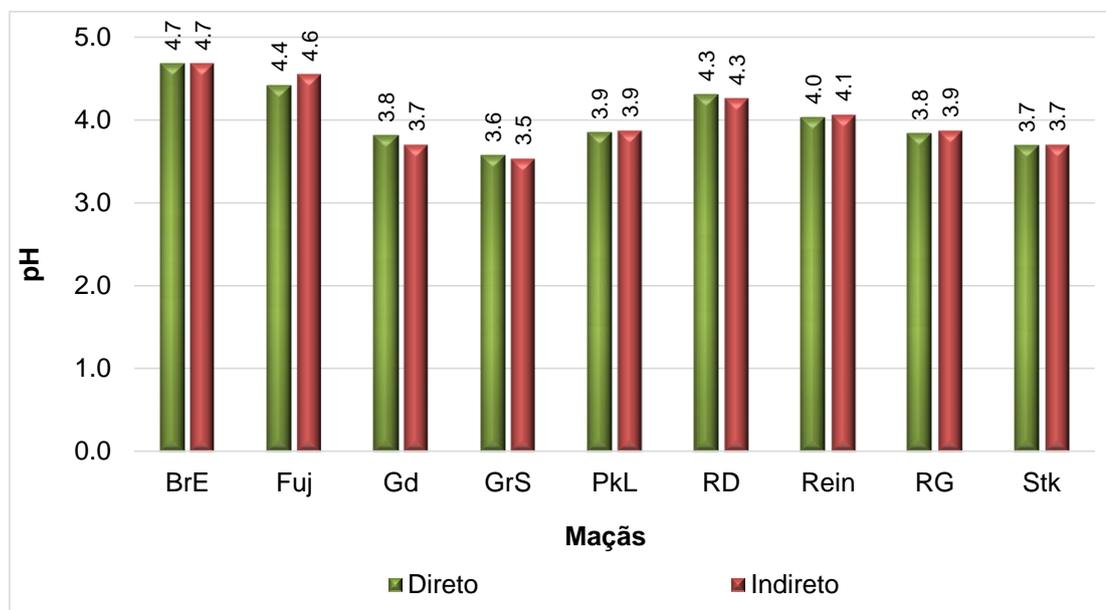


Figura 26 - pH das maçãs determinado por dois métodos, direto e indireto (após homogeneização em partes iguais com água).

O pH (20°C) das maçãs variou entre 3,6 (Granny Smith) e 4,7 (Bravo Esmolfe) com um valor mediano de 3,9. Não há diferenças significativas ($p < 0,05$) no valor de pH determinado por ambos os métodos, o qual também é comprovado pela boa correlação entre os valores de pH obtidos por ambos os métodos ($r^2=0,9753$).

Todas as variedades de maçã apresentam um pH ótimo para a produção de patulina.

3. Resíduo seco

O resíduo seco das várias variedades de maçã apresentou valores entre 12,5% (Granny Smith) e 18,7% (Reineta). O valor mediano deste parâmetro foi de 13,7%. Apenas a variedade Reineta apresentou um valor muito superior às restantes variedades (18,7%). A Figura 27 apresenta os resultados obtidos.

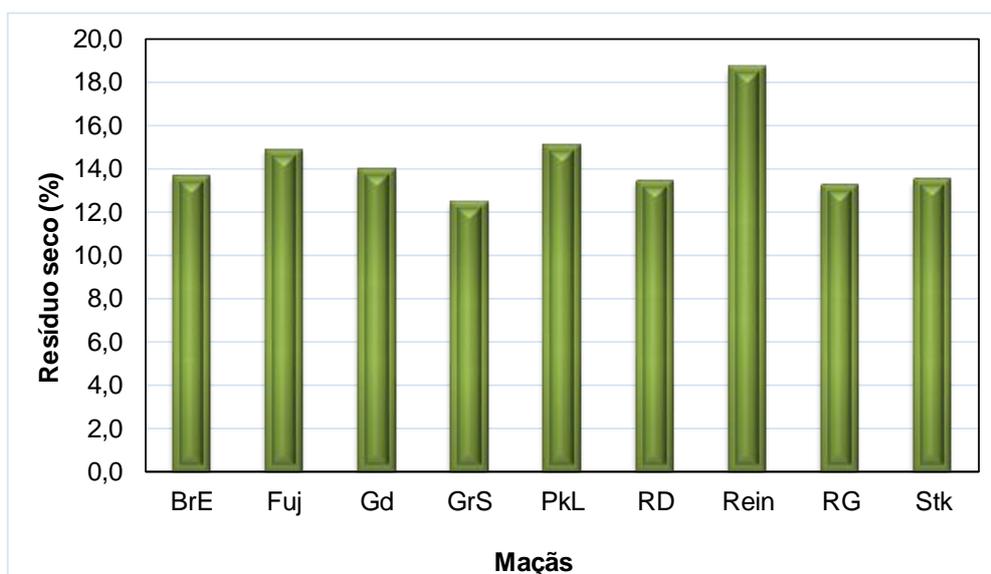


Figura 27 - Perfil do resíduo seco das várias variedades de maçã.

O teor total de água é elevado e semelhante nas várias maçãs, sendo favorável à produção de patulina. No entanto, seria mais correto termos o valor da atividade da água.

4. Cinza

A cinza das várias variedades de maçã apresentou valores entre 0,24% (Red Delicious) e 0,31% (Pink Lady e Royal Gala). O valor mediano deste parâmetro foi de 0,29%. O DPR associado às várias variedades de maçãs foi de 9,1%, o qual é indicativo de grande homogeneidade entre os vários resultados. A Figura 28 apresenta os resultados obtidos.

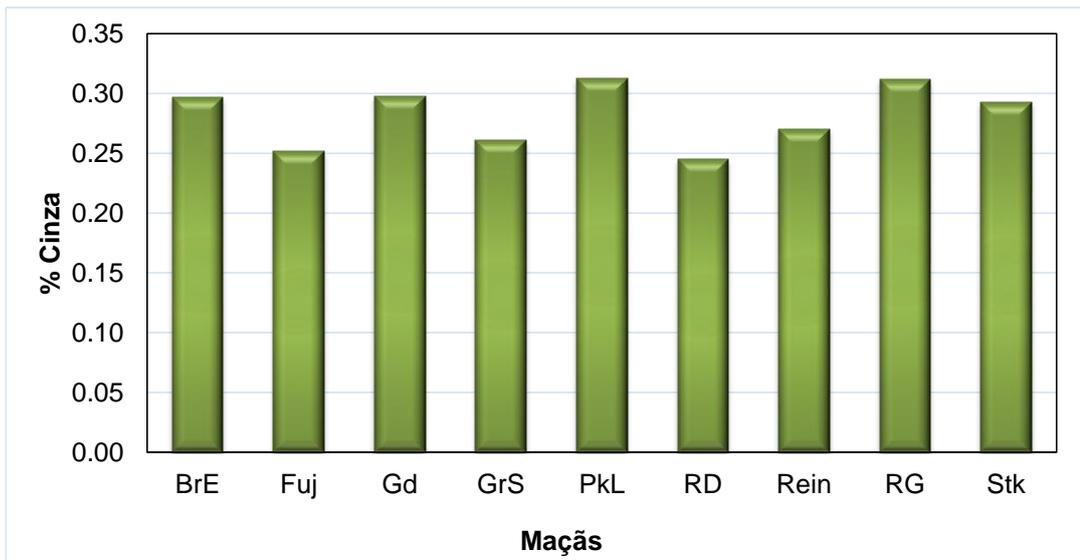


Figura 28 - Perfil em cinzas das várias variedades de maçã.

5. Cálcio e magnésio

A Figura 29 apresenta os resultados de cálcio e magnésio nas nove variedades de maçãs.

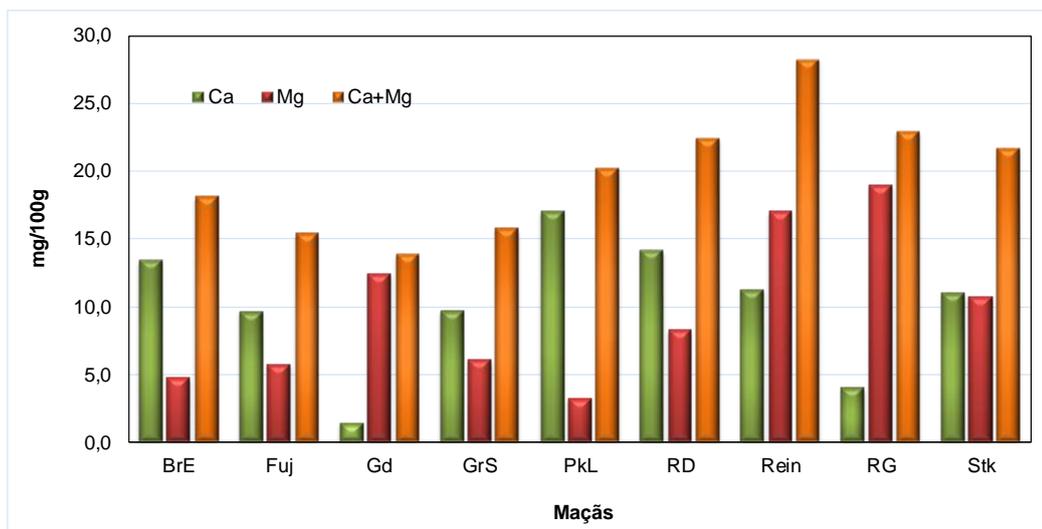


Figura 29 - Perfil em cálcio e magnésio das várias variedades de maçã, expressos em mg/100 g de maçã.

O teor total em cálcio e magnésio variou entre 13,9 mg/100 g de maçã (Golden) e 28,3 mg/100 g de maçã (Reineta), com um valor mediano de 20 mg/100 g de maçã para as nove variedades. No entanto, com exceção da maçã Starking, a proporção entre o cálcio e o magnésio variou com o tipo de maçã. Nas maçãs Bravo Esmolfe, Fuji, Granny Smith, Pink Lady e Red Delicious predomina o cálcio, enquanto nas maçãs Golden, Reineta e Royal Gala predomina o magnésio. O teor em cálcio variou de 1,4 mg Ca/100 g (Golden) a 17 mg Ca/100 g (Pink Lady). O teor em magnésio variou de 3,2 mg Mg/100 g (Pink Lady) a 19 mg Mg/100 g (Royal Gala).

6. Açúcares totais

O teor de açúcares totais das várias variedades de maçã variou entre 7,5% (Bravo Esmolfe) e 12% (Fuji e Reineta). O valor mediano dos açúcares foi de 10%. O DPR associado às várias variedades de maçãs foi de 15%. A Figura 30 apresenta os resultados obtidos.

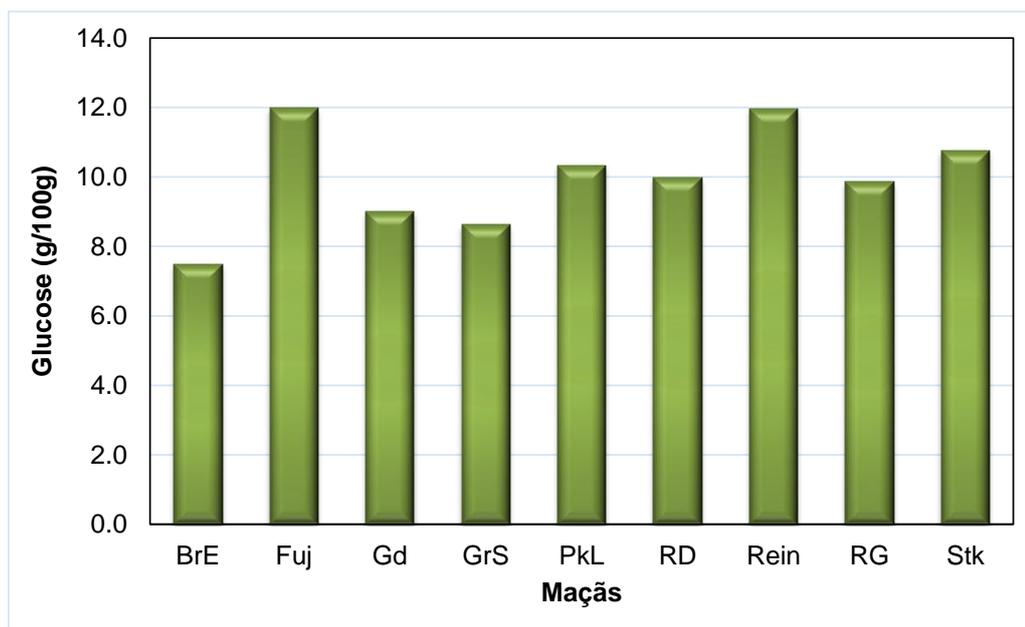


Figura 30 - Perfil em açúcares totais das várias variedades de maçã, expressos em percentagem de glucose.

As maçãs Fuji e Reineta apresentam valores mais elevados de açúcares e portanto, apresentam melhores condições de substrato para a produção de patulina.

7. Vitamina C

Embora a vitamina C tenha sido determinada por dois métodos, volumétrico e espectrofotométrico, apenas o segundo método apresentou resultados representativos das amostras em análise. No método volumétrico, o volume de titulante foi muito baixo (< 1 mL) e, por isso, os resultados obtidos não foram considerados.

A curva de calibração da vitamina C pelo método espectrofotométrico do 2,6-diclorofenol-indofenol é linear, apresentando um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9987, um coeficiente de variação do método (CV_m) de 3,0% e obedece ao critério de aceitação do teste Mandel ($VT < F(0,05; 1; N-3)$).

O teor em Vitamina C variou entre 0,1 mg/100 g de maçã (Granny Smith e Pink Lady) e 2,3 mg/100 g de maçã (Bravo Esmolfe). O valor mediano foi de 1,3 mg/100 g. Há uma grande dispersão nos valores da Vitamina C nas várias variedades de maçã. Fuji, Granny Smith e Pink Lady apresentam baixa concentração de vitamina C, provavelmente por esta vitamina ser facilmente oxidada. A Figura 31 apresenta os resultados obtidos.

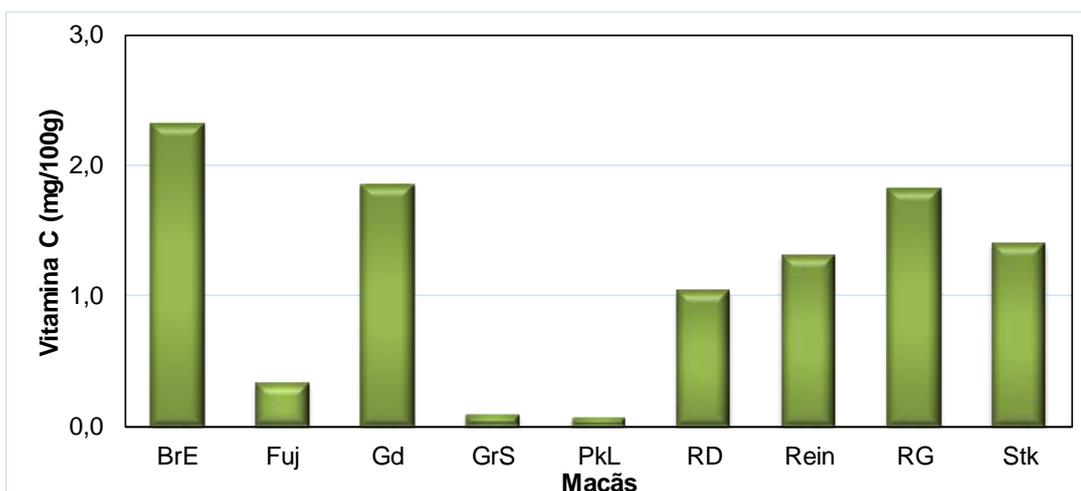


Figura 31 - Perfil em Vitamina C das várias variedades de maçã, expressos em mg/100 g de maçã.

8. Metais

Os metais analisados nas variedades de maçã foram o alumínio (Al), ferro (Fe), chumbo (Pb), níquel (Ni), cádmio (Cd) e crômio (Cr). A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 9 - Concentração dos metais das várias variedades de maçã (n=3)

Maçãs	Al	Fe	Pb	Ni	Cd	Cr
	mg/100 g			µg/100 g		
Bravo Esmolfe	0,20	0,24	0,40	2,0	0,40	4,0
Fuji	0,091	0,17	1,1	1,0	0,020	7,2
Golden	0,87	0,27	1,7	7,9	0,10	6,0
Granny Smith	0,076	0,17	0,30	0,60	0,20	2,2
Pink Lady	1,2	0,34	1,1	3,5	0,20	1,0
Red Delicious	1,3	0,38	2,0	7,5	0,20	1,6
Reineta	1,8	0,52	1,1	7,6	0,10	1,9
Royal Gala	1,9	0,29	1,9	5,5	0,20	1,8
Sartking	0,067	0,21	0,60	1,5	0,30	2,2

O alumínio e o ferro foram os metais mais representativos nas várias variedades de maçãs. O alumínio foi o metal com maior concentração nas várias variedades de maçãs, à exceção das variedades Fuji, Granny Smith e Starking. A concentração em chumbo, níquel, cádmio e crômio é vestigial, com concentrações que variaram dos 0,020 µg Cd/100 g (Fuji) a 7,9 µg Ni/100 g (Golden). Destes quatro metais em concentrações vestigiais, o cádmio é o menos representativo.

9. Avaliação das características das maçãs

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que não há diferenças estatisticamente significativas na composição físico-química das maçãs ($p < 0,05$) quando se avaliam todos os parâmetros. No entanto, há diferenças estatisticamente significativas quando se avalia a composição em metais nas várias variedades de maçã ($p > 0,05$). Mesmo retirando da avaliação os metais majoritários (alumínio e ferro) essas diferenças mantêm-se porque a concentração em cádmio é muito inferior.

10. Análise da patulina

10.1 Estudo da linearidade

A Tabela 10 apresenta os resultados referentes ao estudo da linearidade do método de HPLC-UV para a determinação da patulina. A correlação das áreas da patulina por HPLC em função da concentração não é boa para concentrações inferiores a 2 µg/L. Por esse motivo, a linearidade foi estudada a partir de 2 µg/L.

O método de HPLC-UV apresenta uma boa correlação na gama de concentrações estudada, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,995, é preciso ($CV_m < 5\%$) e é linear ($VT < F$). No entanto, a análise de resíduos e o teste de RIKILT apresentam valores superiores ao critério de aceitação (10%). O LQ (8,8 µg/L) determinado com base no desvio padrão residual da curva ($S_{y/x}$) e no declive (b) é muito superior ao primeiro nível de concentração da patulina, indicando que a reta não está ajustada para o nível de concentrações estudado. Deste modo, o intervalo de concentrações foi dividido em duas gamas de concentrações (gama baixa e gama alta) e aplicaram-se novamente os testes estatísticos (Tabela 11 e 12).

Tabela 10 - Gama de linearidade da patulina por HPLC-UV (gama inicial de concentrações), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Parâmetros da curva, $y = bx + a$	
N	19
Gama de concentração, µg/L	2,40 - 103
Declive (b)	990,6762
Ordenada na origem (a)	20,424
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9994
Coeficiente de variação do método (CV_m), %	2,0
Resíduos, %	[-11,5; 6,41]
Valores normalizados, %	[91,3; 109]
Teste RIKILT, %	[89,4; 107]
Teste Mandel, $VT \leq F(0,05; 1; N-3)$	1,02 < 4,49
LD ($3 \times S_{y/x}/b$), µg/L	2,7
LQ ($10 \times S_{y/x}/b$), µg/L	8,8

Tabela 11 - Gama baixa de linearidade da patulina por HPLC-UV, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Parâmetros da curva, $y = bx + a$	
N	15
Gama de concentração, µg/L	4,0 – 80
Declive (<i>b</i>)	986,7213
Ordenada na origem (<i>a</i>)	176,787
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9998
Coeficiente de variação do método (CV_m), %	1,6
Resíduos, %	[-4,3; 4,8]
Valores normalizados, %	[99,8; 109]
Teste RIKILT, %	[97,0; 106]
Teste Mandel, $VT \leq F(0,05; 1; N-3)$	0,03 < 4,75
LD ($3 \times S_{y/x}/b$), µg/L	1,7
LQ ($10 \times S_{y/x}/b$), µg/L	5,8
Homogeneidade de variâncias $VT \leq F(0,01; N-1; N-1)$	300 > 5,35

Tabela 12 - Gama de trabalho e gama linear (gama alta) da patulina por HPLC-UV, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Parâmetros da curva, $y = bx + a$	
N	12
Gama de concentração, µg/L	20,0 – 100
Declive (<i>b</i>)	988,9227
Ordenada na origem (<i>a</i>)	154,480
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9983
Coeficiente de variação do método (CV_m), %	1,8
Resíduos, %	[-2,6; 2,5]
Valores normalizados, %	[100; 105]
Teste RIKILT, %	[97,0; 103]
Teste Mandel, $VT \leq F(0,05; 1; N-3)$	2,73 < 5,12
LD ($3 \times S_{y/x}/b$), µg/L	3,39
LQ ($10 \times S_{y/x}/b$), µg/L	11,3
Homogeneidade de variâncias $VT \leq F(0,01; N-1; N-1)$	4,16 < 6,9

Embora os valores dos resíduos e do teste RIKILT sejam bons, a gama de linearidade estudada continua a apresentar um LQ superior ao primeiro ponto de calibração, indicando que a reta não está bem ajustada. O teste de homogeneidade de variâncias confirmou este resultado, indicando que o intervalo de concentrações estudado não representa a gama de trabalho. Deste modo, reduziu-se novamente o intervalo de concentrações estudado. A Figura 32 apresenta a gama de trabalho (baixa) e os gráficos representativos dos testes efetuados. A gama de trabalho vai de 10 – 80 µg/L de patulina, correspondente a 4,0 µg/Kg e 32 µg/Kg patulina, respetivamente. Para esta gama de concentrações, o LD e LQ foram de 1,9 µg/L (0,76 µg/kg) e 6,4 µg/L (2,6 µg/kg), respetivamente. Os valores obtidos são coerentes com os obtidos por Barreira e colaboradores (1), os quais obtiveram uma gama de trabalho de 8 – 80 µg/L para o mesmo método.

O método também é linear para o intervalo de concentrações entre 20 µg/L (8,0 µg/kg) e 100 µg/L (40 µg/kg). Este intervalo também representa uma gama de trabalho.

10.2 Precisão e veracidade instrumental

A Tabela 13 apresenta os resultados da repetibilidade e do erro do método de HPLC-UV referentes a sete níveis de concentração.

Tabela 13 - Desvio padrão relativo determinado em condições de repetibilidade e erro do método de HPLC-UV para a determinação da patulina (n=10).

C (µg/L)	DPR, %	Erro, %
4	6,6	16
6	3,6	20
8	3,9	13
10	8,1	13
20	9,3	6,9
80	1,6	7,1
100	4,3	4,7

O método de HPLC-UV é preciso, apresentando desvios padrão relativos inferiores a 10%. A veracidade do método é baixa para os valores da concentração inferiores à gama de trabalho, apresentando desvios padrão relativos superiores a 15%.

Nas gamas de trabalho (10 – 80 µg/L e 20 – 100 µg/L), o método apresenta uma boa veracidade (erro < 15%).

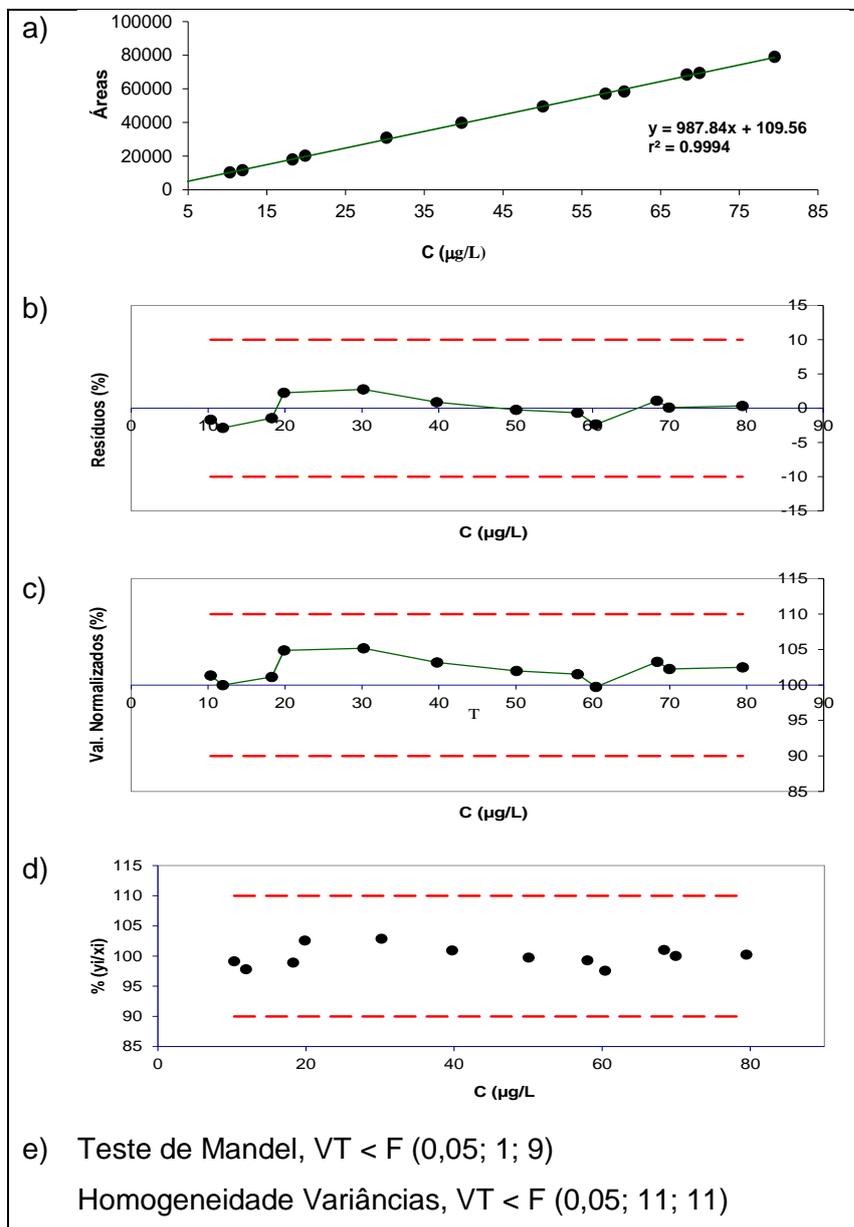


Figura 32 - Gama de trabalho da patulina por HPLC-UV (gama baixa 10 – 80 µg/L): a) curva de calibração; b) análise de resíduos; c) teste de valores normalizados; d) teste de RIKILT; e) dados do teste de Mandel e do teste de homogeneidade de variâncias. (---) Critérios de aceitação.

10.3 Limiares analíticos

O limite de detecção e de quantificação determinados em condições de repetibilidade foram de 2,2 µg/L e 7,3 µg/L, respetivamente. Como a gama de trabalho (gama baixa) do método é de 10 – 80 µg/L, o limite de quantificação foi ajustado ao primeiro ponto de calibração, isto é, 10 µg/L. Para uma toma de amostra de 10 g e considerando os volumes de solvente usados na extração e o fator de concentração no SPE, o limite de detecção e quantificação da patulina por SPE-HPLC-UV é de 1,2 µg/kg e 4,0 µg/kg, respetivamente. Neste cálculo considerou-se uma recuperação de 100%, uma vez que os valores obtidos variaram entre 95% e 102%.

10.4 Análise das amostras

No âmbito deste trabalho, as maçãs devem ter no mínimo um grau de apodrecimento igual ou superior a 25%, de forma a termos massa de amostra suficiente para a análise química (monitorização da patulina) e microbiológica (caracterização dos fungos). Avaliou-se também as maçãs com 50% de apodrecimento e as totalmente podres. As várias variedades de maçã não apodreceram ao mesmo tempo e a percentagem de maçã podre também foi muito variável. Devido aos fins-de-semana, não tivemos maçãs representativas de todos os estados de apodrecimento. Nas maçãs com 25% de apodrecimento não temos maçãs da variedade Bravo Esmolfe e a Pink Lady, com 50% de apodrecimento não temos as variedades Golden e a Red Delicious e totalmente podres não tivemos as variedades Fuji e Golden. A Figura 33 apresenta o perfil de apodrecimento das maçãs. A Tabela 14 apresenta a percentagem de apodrecimento das maçãs e os teores de patulina nas mesmas.

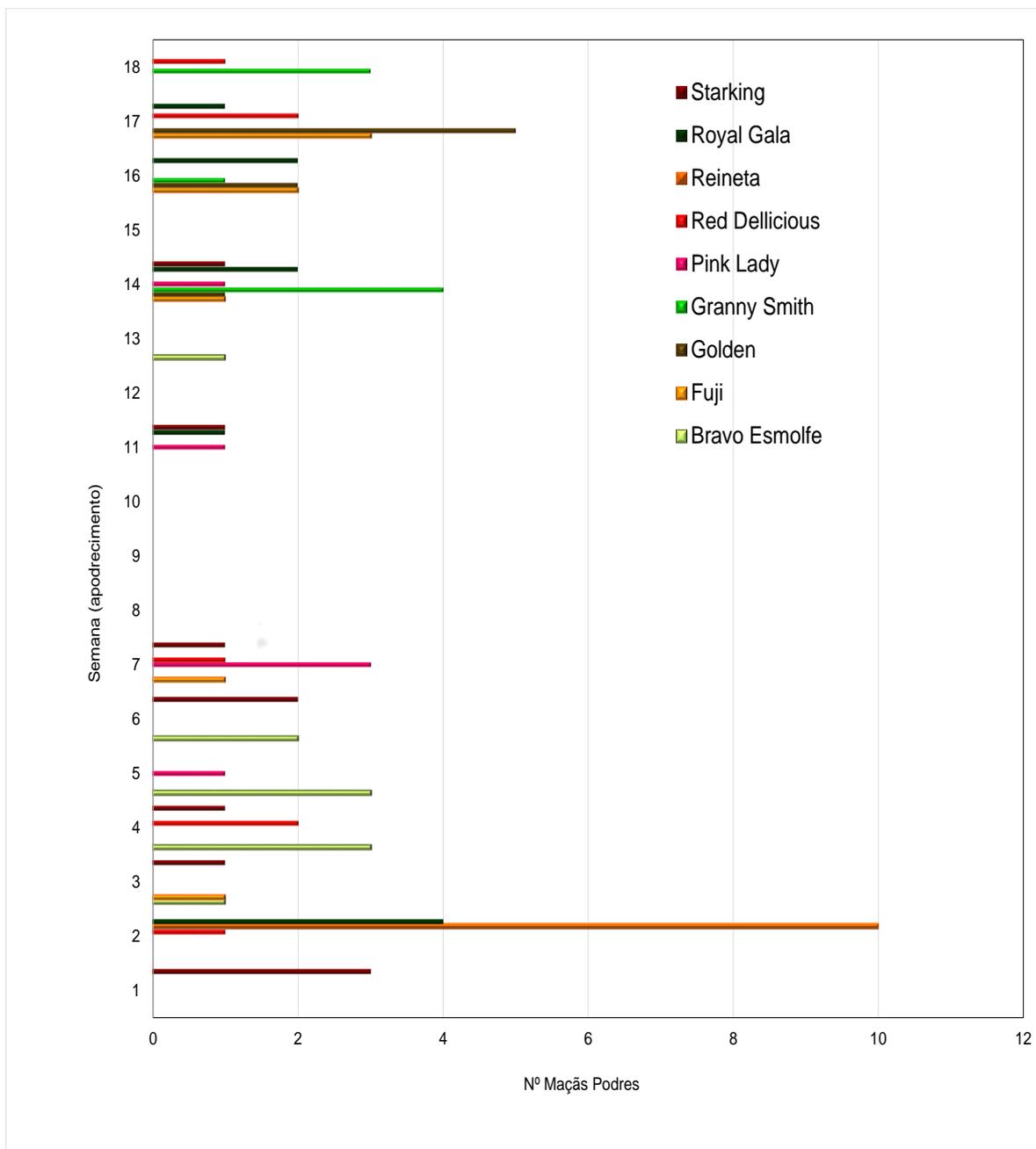


Figura 33 - Perfil de apodrecimento das várias variedades de maçãs durante 18 semanas.

As primeiras maçãs a apodrecer foram a maçã Starking, Fuji e a maçã Bravo Esmolfe. A variedade Granny Smith foi a que apodreceu mais tarde.

Tabela 14 - Concentração mediana em patulina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) nas várias variedades de maçã com diferentes graus de apodrecimento.

Maçã	25 % Apodrecimento					
	n	%	Nº (LD – LQ)/%	%(Pos)	Patulina	
					C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DPR
Bravo Esmolfe	6	16,7	0/0	0/0	-	-
Fuji	4	25,0	3/33	2/22	4,2	0,02
Golden	3	100	1/4	12/44	9,7	0,54
Granny Smith	4	25,0	2/22	7/78	29	0,20
Pink Lady	3	0	0/0	0/0	-	-
Red Delicious	4	50,0	5/28	3/17	4,8	0,68
Reineta	5	20,0	0/0	8/89	15	0,53
Royal Gala	6	33,3	0/0	14/78	16	0,58
Starking	6	16,7	0/0	6/67	27	0,19
Maçã	50% Apodrecimento					
	n	%	Nº (LD – LQ)/%	NºPos /(%)	Patulina	
					C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DPR
Bravo Esmolfe	6	50,0	8/30	8/30	15	0,31
Fuji	4	75,0	2/7	18/67	27	0,42
Golden	3	0	0/0	0/0	-	-
Granny Smith	4	25,0	2/22	5/56	15	0,57
Pink Lady	3	33,3	1/11	0/0	-	-
Red Delicious	4	25,0	0/0	0/0	-	-
Reineta	5	20,0	0/0	12/100	9,1	0,24
Royal Gala	6	16,7	0/0	9/100	18	0,08
Starking	6	33,3	0/0	9/50	24	0,19
Maçã	100% Apodrecimento					
	n	%	Nº (LD – LQ)/%	NºPos /(%)	Patulina	
					C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DPR
Bravo Esmolfe	6	33,3	2/11	8/44	6,0	0,62
Fuji	4	0	0/0	0/0	-	-
Golden	3	0	0/0	0/0	-	-
Granny Smith	4	50,0	4/22	2/11	7,9	0,16
Pink Lady	3	66,7	8/44	2/11	20	1,06
Red Delicious	4	25,0	0/0	12/100	7,6	0,11
Reineta	5	60,0	3/11	8/30	5,6	0,16
Royal Gala	6	50,0	8/30	9/33	24	0,57
Starking	6	50,0	5/19	14/52	19	0,37

De cada variedade de maçã podre são retiradas 3 amostras. Após extração e limpeza por SPE, cada amostra é injetada três vezes no HPLC-UV. Deste modo, o número total de maçãs podres (n) dá origem a 9 análises cromatográficas e conseqüentemente, a 9 resultados de patulina. Estes 9 resultados foram utilizados no cálculo da percentagem de amostras negativas e positivas para cada amostra de maçã.

A variação da concentração de patulina nas várias réplicas de maçã é grande, com desvios padrão relativos entre 1,8% e 68%. Tal como esperado, a patulina não se distribui de forma uniforme na maçã podre, até porque o crescimento e desenvolvimento do fungo também não é uniforme.

O teor em patulina é independente do grau de apodrecimento da maçã, pois há maçãs com 25% de apodrecimento que apresentam maior teor de patulina do que as com 100% de apodrecimento.

Nas maçãs com 25% de apodrecimento, as variedades de maçã que apresentaram maior e menor teor de patulina foram a Granny Smith (29 µg/kg de patulina) e a Fuji (4,2 µg/kg de patulina), respetivamente.

Nas maçãs com 50% de apodrecimento, a maçã Fuji apresentou a maior concentração de patulina (27 µg/kg), em oposição ao teor de patulina na maçã Reineta (9,1 µg/kg de patulina).

Nas maçãs totalmente podres (100%), a maçã Royal Gala apresentou o maior teor de patulina (24 µg/kg). A maçã Reineta foi a variedade com menor teor de patulina (5,6 µg/kg).

Independentemente da variabilidade do teor de patulina nas várias tomas de amostra de maçã da mesma variedade, também se avaliou a dispersão de resultados nas 3 réplicas cromatográficas da mesma amostra. A Tabela 15 apresenta o desvio padrão relativo correspondente a cada variedade de maçã com diferentes percentagens de apodrecimento.

O desvio padrão relativo obtido desta forma é inferior ao desvio padrão relativo obtido no cálculo do desvio padrão relativo da concentração de patulina em cada variedade de maçã.

De forma a avaliarmos a dispersão dos resultados da concentração de patulina em função da variedade de maçã e do seu grau de apodrecimento, avaliou-se a concentração mediana, mínima, máxima e as concentrações representativas dos 25%

e 75% das maçãs analisadas, através da avaliação dos gráficos de diagrama de extremos e quartis ou boxplot (Figura 34).

Tabela 15 - Desvio padrão relativo das diferentes leituras nas várias variedades de maçã com diferentes graus de apodrecimento.

Maçã	DPR		
	25%	50%	100%
Bravo Esmolfe	-	12,9	16,4
Fuji	1,8	16,3	-
Golden	13,4	-	-
Granny Smith	9,1	9,5	16,1
Pink Lady	-	-	10,6
Red Delicious	8,3	-	4,6
Reineta	13,4	5,2	18,1
Royal Gala	19,2	3,7	9,4
Starking	15,8	-	5,7

Embora haja uma grande dispersão nos valores da patulina não só com a variedade de maçã mas também com o grau de apodrecimento, os valores medianos só são significativamente diferentes para as maçãs totalmente podres ($p > 0,05$).

A concentração mínima de patulina nas várias variedades de maçã apresentou uma mediana de 4,0 µg/kg, 7,6 µg/kg e 4,6 µg/kg para as maçãs com 25%, 50% e 100% de apodrecimento, respetivamente.

A concentração máxima de patulina nas várias variedades de maçã apresentou uma mediana de 18 µg/kg, 19 µg/kg e 8,8 µg/kg para as maçãs com 25%, 50% e 100% de apodrecimento, respetivamente.

A concentração mediana de patulina nas várias variedades de maçã foi de 15 µg/kg, 18 µg/kg e 15 µg/kg para as maçãs com 25%, 50% e 100% de apodrecimento, respetivamente.

No primeiro quartil (25% das maçãs), a concentração mediana de patulina nas várias variedades de maçã foi de 13 µg/kg, 13 µg/kg e 6,4 µg/kg para as maçãs com 25%, 50% e 100% de apodrecimento, respetivamente.

No segundo quartil (75% das maçãs), a concentração mediana de patulina nas várias variedades de maçã foi de 15 µg/kg, 16 µg/kg e 8,0 µg/kg para as maçãs com 25%, 50% e 100% de apodrecimento, respectivamente.

Nas maçãs com os três graus de apodrecimento, o teor de patulina é regra geral, menor nas maçãs 100% podres. As maçãs com maior concentração de patulina são as da variedade Starking e Royal Gala.

A maçã Golden foi a variedade com menor número de maçãs podres e cuja concentração mediana de patulina para as maçãs 25% podres foi menor, nomeadamente 9,0 µg/kg.

Independentemente da variedade de maçã, a patulina é um contaminante natural da maçã podre e, por isso, a seleção da fruta para a produção de produtos à base de maçã é crucial. Nesta perspetiva, as variedades Golden e Red Delicious apresentam-se como das maçãs com melhores características.

Figura 34 – Boxplot com o perfil da concentração da patulina nas várias variedades de maçãs com diferentes percentagens de apodrecimento.



Parte B – Isolamento e identificação fúngica

1. Identificação fúngica

Para a análise microbiológica só foram utilizadas maçãs com um grau de apodrecimento superior ou igual a 50%, com exceção das maçãs Golden. Esta variedade de maçãs apresentava um grau de apodrecimento na ordem dos 25-40% no final do período de armazenamento. No total foram analisadas 39 maçãs, embora 3 das maçãs, uma de cada variedade, nunca apresentaram sinais de apodrecimento, nomeadamente, Golden, Pink Lady e Red Delicious.

Alguns dos meios de cultura referentes às 4 réplicas de cada amostra de maçã estavam contaminados e não foi possível caracterizar o fungo. Por esse motivo e para efeitos do tratamento estatístico dos resultados, o número total de maçãs é de 27.

A Figura 35 representa dois exemplos de caixas de Petri com três dos fungos identificados neste estudo.



Figura 35 - Exemplos de alguns fungos identificados.

As espécies fúngicas que foram identificadas nas amostras de maçãs apodrecidas estão presentes na Tabela 16 e a Figura 36 apresenta o perfil de amostras positivas para cada espécie fúngica.

Tabela 16 - Identificação fúngica nas diferentes variedades de maçãs.

Maçãs	n	Fungos
Bravo Esmolfe	3	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium crysogenum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Ulocladium</i> sp.,
Fuji	2	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Cladosporium</i> sp.
Golden	5	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium crysogenum</i> , <i>Byssochlamys</i> sp.
Granny Smith	3	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Ulocladium</i> sp.
Pink Lady	4	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Beauveria</i> sp. *, <i>Aspergillus</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp.
Red Delicious	2	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Acremonium</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Rhizopus</i> <i>stonolifer</i> *
Reineta	2	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium crysogenum</i>
Royal Gala	4	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Phoma glomerata</i> , <i>Candida pelliculosa</i>
Starking	2	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium crysogenum</i>

* fungo identificado de maçã sem apodrecimento

Através das características fenotípicas foi possível identificar 12 diferentes géneros de fungos filamentosos (*Penicillium expansum*, *Penicillium crysogenum*, *Paecilomyces* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* sp., *Beauveria* sp., *Phoma glomerata*, *Acremonium* sp., *Byssochlamys* sp., *Alternaria alternata*, *Ulocladium* sp. *Cladosporium* sp.) e um género leveduriforme (*Rhodotorula rubra*).

Penicillium expansum foi o fungo mais representativo em todas as variedades de maçãs, seguindo-se *Alternaria alternata* e *Cladosporium* sp.

Alternaria alternata foi identificado na Bravo Esmolfe, Pink Lady e Royal Gala e *Cladosporium* sp. desenvolveu-se nas variedades Bravo Esmolfe, Fuji, Pink Lady e Red Delicious.

Das variedades de maçãs que não apodreceram apenas a maçã Golden não apresentou nenhuma espécie fúngica. Isolou-se *Beauveria* sp. na maçã Pink Lady e *Rhizopus stolonifer* na Red Delicious.

Existem variedades de maçã com uma maior variabilidade de espécies fúngicas, tais como a Bravo Esmolfe, Pink Lady, Red Delicious e Royal Gala, embora nestas

variedades os fungos frequentemente encontrados foram *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* e *Cladosporium* sp., à exceção da Red Delicious que não apresentou *Alternaria alternata* e na Royal Gala não se isolou *Cladosporium* sp.

No que se refere ao desenvolvimento das várias espécies fúngicas, o número de amostras positivas variou entre 5% (*Golden/Byssochlamys* sp.) e 100% (*Reineta/Penicillium expansum*). A média e mediana do número de amostras positivas para a totalidade dos fungos nas várias variedades de maçãs foram de 32% e 25%, respetivamente.

Considerando que das espécies mais representadas nas variedades de maçãs, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* e *Cladosporium* sp., estas duas últimas não estão normalmente associadas com a produção de patulina, resumimos os nossos resultados apenas a *Penicillium expansum*, um dos fungos mais frequentemente associado à produção de patulina. Numa tentativa de correlação entre as concentrações de patulina e o desenvolvimento fúngico verificámos que:

- *Penicillium expansum* desenvolveu-se em todas as variedades de maçã, as quais também apresentaram níveis de patulina;
- As variedades de maçã com menor positividade para *Penicillium expansum* (*Pink Lady* e *Red Delicious*) também apresentaram a menor concentração de patulina. A maçã *Pink Lady* não revelou patulina para os 25% e 50% de apodrecimento e a maçã *Red Delicious* para os 50% de apodrecimento;
- As maçãs com maior concentração de patulina (*Sartking* e *Royal Gala*) também representaram as maçãs com maior positividade a *Penicillium expansum*. No entanto, a maçã *Reineta* foi uma das variedades com maior positividade ao *Penicillium expansum* mas menor concentração de patulina, o que sugere que a matriz poderá influenciar a capacidade de o fungo produzir patulina ou então podemos considerar que possa ocorrer uma degradação da micotoxina por microrganismos competidores ou produtores ou ainda que estirpes diferentes de *Penicillium expansum* produzam níveis diferentes de patulina;
- Com exceção de *Penicillium expansum*, as restantes espécies fúngicas estão pouco representadas nas maçãs e, conseqüentemente, a correlação com os teores de patulina é difícil.

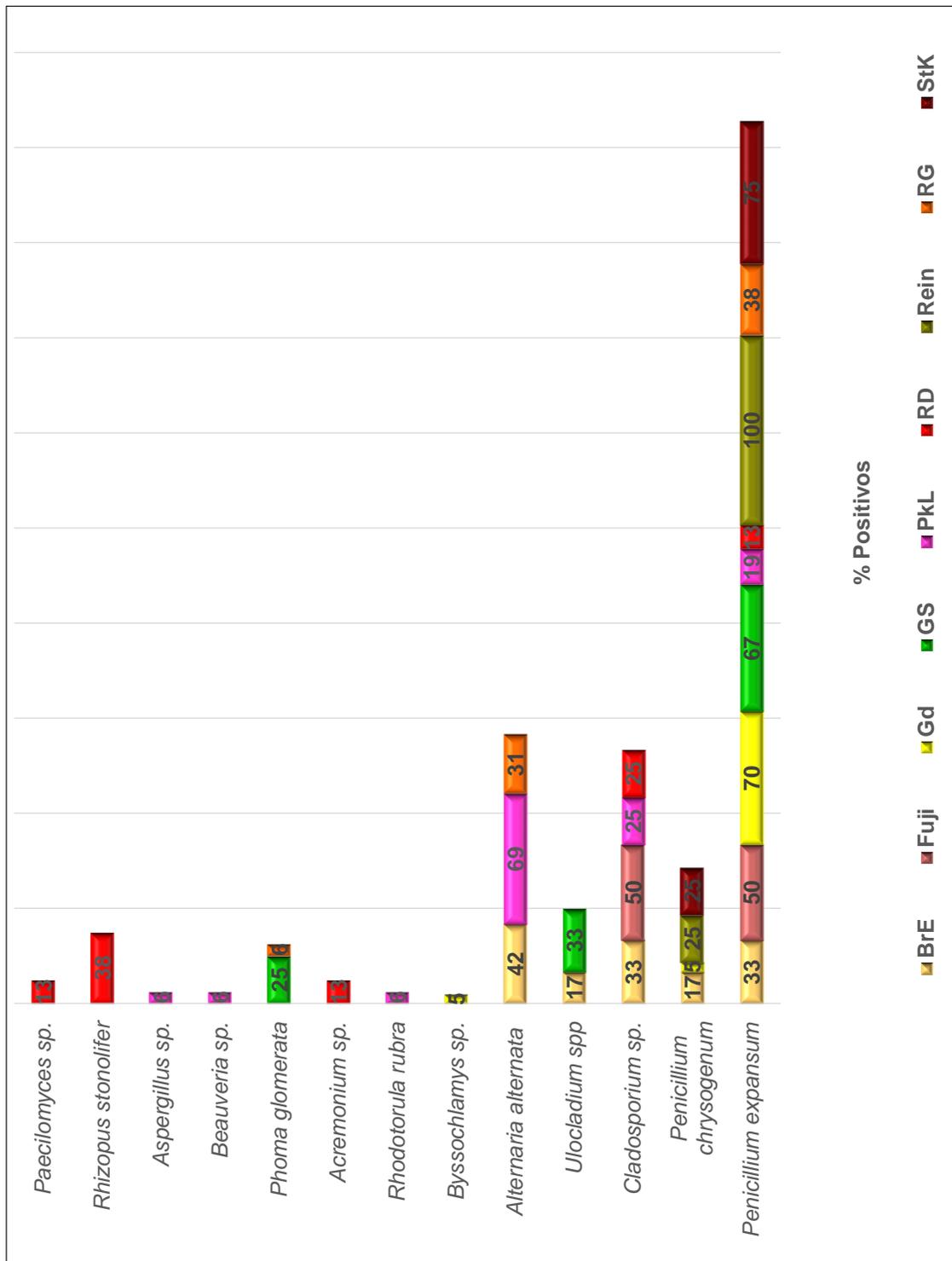


Figura 36 – Caracterização fúngica das várias variedades de maçãs.

Capítulo VI – Conclusões e perspectivas futuras



Capítulo VI – Conclusões e perspectivas futuras

As maçãs em estudo (Bravo Esmolfe, Fuji, Golden, Granny Smith, Royal Gala, Pink Lady, Red Delicious, Reineta e Starking) apresentaram uma massa mediana de 206 g, com uma variação entre 83,9 g (Bravo Esmolfe) e 260 g (Red Delicious). Apenas cinco das variedades analisadas apresentaram massa médias superiores a 200 g, nomeadamente Fuji, Granny Smith, Pink Lady, Red Delicious e Reineta.

Com exceção da variedade Starking, há uma boa homogeneidade da massa dentro de cada variedade de maçã com desvios padrão relativos (DPR) inferiores a 10%. Apenas a massa das maçãs Starking apresentaram DPR na ordem dos 20%.

A análise físico-química das maçãs em estudo revelou uma grande homogeneidade de resultados, relativamente aos parâmetros pH, resíduo seco, cinza, açúcares totais, vitamina C, cálcio, magnésio, alumínio, ferro, chumbo, níquel, cádmio e cromo.

O pH variou entre 3,6 (Granny Smith) e 4,7 (Bravo Esmolfe).

O resíduo seco variou entre 12,5% (Granny Smith) e 18,7% (Reineta), embora só a maçã Reineta tivesse o valor mais elevado. A cinza variou entre 0,24% (Red Delicious) e 0,31% (Pink Lady e Royal Gala).

O teor total em cálcio e magnésio foi mais baixo na maçã Golden (13,9 mg/100 g de maçã) e mais elevado na maçã Reineta (28,3 mg/100 g de maçã). O teor em cálcio foi mais elevado nas variedades Bravo Esmolfe, Fuji, Granny Smith, Pink Lady e Red Delicious, e o teor em magnésio foi mais predominante nas maçãs Golden, Reineta e Royal Gala.

As maçãs apresentaram uma concentração mediana em açúcares totais de 10 g/100 g com um DPR inferior a 15%. As maçãs menos doces foram a Bravo Esmolfe (7,5 g de glucose/100 g de maçã) e as mais doces foram as variedades Fuji e Reineta (12 g de glucose/100 g de maçã).

O teor em vitamina C variou entre 0,1 mg/100 g de maçã (Granny Smith e Pink Lady) e 2,3 mg/100 g de maçã (Bravo Esmolfe).

Dos metais analisados (Al, Fe, Pb, Ni, Cd, Cr), o ferro e o alumínio foram os mais representativos com concentrações entre 0,17 mg Fe/100 g – 0,52 mg Fe/100 g (Fuji/Granny Smith – Reineta) e 76 µg Al/100 g – 1,9 mg Al/100 g (Granny Smith – Reineta), respetivamente.

O método de HPLC-UV para a análise de patulina apresenta duas gamas de trabalho, gama baixa e gama alta. Na gama baixa o método apresentou uma gama de trabalho entre 10 – 80 µg/L de patulina (4,0 µg/Kg e 32 µg/Kg patulina) com um LD e LQ de 1,9 µg/L (0,76 µg/kg) e 6,4 µg/L (2,6 µg/kg), respetivamente. Na gama alta, a gama de trabalho variou entre 20 µg/L (8,0 µg/kg) e 100 µg/L (40 µg/kg), com um LD e LQ de 3,39 µg/L (1,4 µg/kg) e 11,3 µg/L (4,5 µg/kg), respetivamente. O método é preciso e exato para ambas as gamas de trabalho com desvio padrão relativo e erro relativo inferiores a 10% e 15%, respetivamente.

A concentração em patulina não foi uniforme na maçã podre e também foi independente do grau de apodrecimento da maçã. Algumas maçãs com 25% de apodrecimento apresentaram maior teor de patulina do que as com 100% de apodrecimento.

Nas maçãs com 25% de apodrecimento, as variedades que apresentaram maior e menor teor de patulina foram a Granny Smith (29 µg/kg de patulina) e a Fuji (4,2 µg/kg de patulina), respetivamente.

Nas maçãs com 50% de apodrecimento, a variedade Fuji apresentou a maior concentração de patulina (27 µg/kg), em oposição ao teor de patulina na maçã Reineta (9,1 µg/kg de patulina).

Nas maçãs totalmente podres (100%), a maçã Royal Gala apresentou o maior teor de patulina (24 µg/kg). A maçã Reineta foi a variedade com menor teor de patulina (5,6 µg/kg).

Resumindo, as variedades com maiores concentrações de patulina foram Granny Smith, Fuji e Royal Gala.

Relativamente à caracterização micológica, em todas as variedades de maçãs foram isolados *Penicillium expansum*. *Alternaria alternata* e *Cladosporium* sp. foram das espécies fúngicas mais identificadas nas diferentes variedades de maçã.

As maçãs com maior concentração de patulina (Starking e Royal Gala) também representam as maçãs com maior positividade ao *Penicillium expansum*, considerada uma das espécies mais frequentemente associada à produção desta micotoxina. No entanto, a maçã Reineta foi uma das variedades com maior positividade ao *Penicillium expansum* mas menor concentração de patulina, sugerindo que a matriz e as características desta variedade de maçã sejam mais resistentes à produção de patulina.

Com exceção de *Penicillium expansum*, as restantes espécies fúngicas estão pouco representadas nas maçãs e, conseqüentemente, a correlação com os teores de patulina foi difícil.

Em conclusão, a contaminação das maçãs com patulina deve ser considerado como um risco potencial para os planos de segurança e qualidade da cadeia de produção das maçãs, daí que, futuramente, o trabalho deverá ser complementado com um maior número de amostras, quer para a caracterização físico-química quer para a análise microbiológica para reforçar e complementar os resultados obtidos. Os fungos potencialmente produtores de patulina (*Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* e *Cladosporium* sp.) também deverão ser inoculados nas várias variedades de maçã para avaliar qual das variedades reúne as melhores características para a produção desta micotoxina. Poucos estudos referenciam a degradação da patulina pelos fungos produtores ou competidores pelo que será uma avaliação alternativa e complementar no sentido de que outros fatores poderão influenciar a produção e/ou manutenção dos níveis desta micotoxina nas maçãs.

Bibliografia

1. Barreira M, Alvito P, Almeida C. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry*. 2010;121(3):653-8.
2. Turner N, Subrahmanyam S, Piletsky S. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal Chim Acta*. 2009;632(2):168-80.
3. Cunham S, Faria M, Fernandes J. Determination of patulin in apple and quince products by GC–MS using $^{13}\text{C}_{5-7}$ patulin as internal standard. *Food Chemistry*. 2009;115:352-9.
4. Beretta B, Gaiaschi A, Galli CL, Restani P. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit Contam*. 2000;17(5):399-406.
5. Spadaro D, Ciavorella A, Frati S, Garibaldi A, Gullino M. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. *Food Control*. 2007;18(9):1098-102.
6. Sewram V, Nair JJ, Nieuwoudt TW, Leggott NL, Shephard GS. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2000;897(1-2):365-74.
7. Tangni EK, Theys R, Mignolet E, Maudoux M, Michelet JY, Larondelle Y. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Addit Contam*. 2003;20(5):482-9.
8. Moukas A, Panagiotopoulou V, Markaki P. Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Food Chem*. 2008;109(4):860-7.
9. Murillo-Arbizu M, González-Peñas E, Hansen SH, Amézqueta S, Ostergaard J. Development and validation of a microemulsion electrokinetic chromatography method for patulin quantification in commercial apple juice. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(6):2251-7.
10. World Health Organization WHO. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food: patulin. WHO Food Additives Series, No. 35, 377-402 1996 [Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je16.htm>. (Consultado a 06/05/2018)]
11. International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F.crookwellense*. Zearalenone, deoxynivalenol and fusarenone X (group 3). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Summary of data reported and evaluation, volume 56. Lyon: IARC; 1993.
12. Silva SJN, Schuch PZ, Bernardi CR, Vainstein MH, Jablonski A, Bender RJ. Patulin in food: state of the art and analytical trends. *Rev Bras Frutic*. 2007;29(2):1-10.
13. Moake M, Padilla-Zakour O, Worobo R. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2005;4(1):8-21.
14. Desmarchelier A, Mujahid C, Racault L, Perring L, Lancova K. Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2011;59(14):7659-65.
15. Martins M, Gimeno A, Martins H, Bernardo F. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit Contam*. 2002;19(6):568-74.
16. Gaspar E, Lucena A. Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*; 2009. p. 1576-82.

17. Gashlan H. High performance liquid chromatographic determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia. *Scientific Research and Essays*. 2009;4(2):69-72.
18. FDA (United States Food and Drug Administration). *Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition*. 2004 [Available from: <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/juice/ucm072557.htm>. (Consultado a 22/05/2018)]
19. FDA (United States Food and Drug Administration): Compliance policy guide Sec. 510.150 Apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products - adulteration with patulin. 2001 [Available from: <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074427.htm>. (Consultado a 02/06/2018)]
20. Elhariry H, Bahobial AA, Gherbawy Y. Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(4):941-6.
21. World Health Organization WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants (Forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 859, 36-38 Geneva 1995 [Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_859.pdf. (Consultado a 10/05/2018)]
22. Welke J, Hoeltz M, Dottori H, Noll I. Patulin accumulation in apples during storage by *penicillium expansum* and *Penicillium griseofulvum* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42(1):172-80.
23. Rodriguez A, Rodriguez M, Andrade M, Cordoba J. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;155(1-2):10-8.
24. Serra R. Dissertação para obtenção do grau de Doutor, Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A.: Minho: Universidade do Minho; 2005.
25. Paterson R, Archer S, Kozakiewicz Z, Lea A, Locke T, O'Grady E. A gene probe for the patulin metabolic pathway with potential for use in patulin and novel disease control. *Biocontrol Science and Technology*. 2000;10(4):509-12.
26. Mossini S, De Oliveira K, Kemmelmeier C. Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. *Journal of Basic Microbiology*. 2004;44(2):106-13.
27. Lazaretti KES, Beux MR, Pimentel IC, Talamini A, Gabardo J. Comparação entre os meios de cultura para contagem de fungos no controle microbiológico de erva-mate. *CEPPA*. 2000;18(2):163-70.
28. Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, MacDonald S, Crews C. Mycotoxin analysis: an update. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2008;25(2):152-63.
29. Lillard S. Mycotoxin List. 2004 [Available from: <http://www.mold-help.org/content/view/457/>. (Consultado a 06/09/2018)]
30. Fernandes R. Dissertação para obtenção do grau de Mestre, MICOTOXINAS: a situação actual da legislação e metodologias analíticas. Universidade de Aveiro. 2007.
31. Lacasse D. *Introdução à microbiologia alimentar*. 1995.
32. Escoula L, Moré J, Baradat C. The toxins by *Byssoschlamys nivea* Westling. I. Acute toxicity of patulin in adult rats and mice. *Ann Rech Vet*. 1977;8(1):41-9.
33. 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. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;181(3):209-18.

34. Jonsson M, Jestoi M, Nathanail AV, Kokkonen UM, Anttila M, Koivisto P, et al. Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. *Food Chem Toxicol.* 2013;53:27-32.
35. Marin DE, Taranu I, Pascale F, Lionide A, Burlacu R, Bailly JD, et al. Sex-related differences in the immune response of weanling piglets exposed to low doses of fumonisin extract. *Br J Nutr.* 2006;95(6):1185-92.
36. Devriendt B, Gallois M, Verdonck F, Wache Y, Bimczok D, Oswald IP, et al. The food contaminant fumonisin B(1) reduces the maturation of porcine CD11R1(+) intestinal antigen presenting cells and antigen-specific immune responses, leading to a prolonged intestinal ETEC infection. *Vet Res.* 2009;40(4):40.
37. El-Nekeety AA, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra HA, Abdel-Wahhab MA. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicol.* 2007;50(2):256-69.
38. Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C. Mycotoxin detection. *Curr Opin Biotechnol.* 2016;37:120-6.
39. Zain M. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society.* 2011;15(2):129-44.
40. Bennett J, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):497.
41. Smith PJE, Lewis DCW, Anderson DJG. Mycotoxins in human nutrition and health. University of Strathclyde; 1994.
42. Iheshiolor OOM, Esonu BO, Chuwuka OK, Omede AA, Okoli IC, Ogbuewu IP. Effects of Mycotoxins in Animal Nutrition: A Review. *Asian Journal of Animal Sciences.* 2011;5(1):19-33.
43. GRAIN. Mycotoxin impact on animal health. 2017 [Available from: <https://www.grainsa.co.za/mycotoxin-impact-on-animal-health>. (Consultado a 08/10/2018)]
44. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal. and Human Systems: CAST - Council for Agricultural Science and Technology; 2003.
45. Christensen CM. Fungi in cereal grains and their products. 1965:9-14.
46. Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento (CE) Nº 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios, L70/12-34 (2006).
47. Iamanaka B, Oliveira I, Taniwaki M. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife.* 2010;7:138-61.
48. Abbas H, Cartwright R, Xie W, Shier W. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection.* 2006;25(1):1-9.
49. Blesa J, Soriano J, Molto J, Marin R, Manes J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *Journal of Chromatography a.* 2003;1011(1-2):49-54.
50. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Karadal F. A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control.* 2011;22(12):1956-9.
51. Siruguri V, Kumar P, Raghu P, Rao M, Sesikeran B, Toteja G, et al. Aflatoxin contamination in stored rice variety PAU 201 collected from Punjab, India. *Indian Journal of Medical Research.* 2012;136(1):89-97.
52. Ostadrahimi A, Ashrafnejad F, Kazemi A, Sargheini N, Mahdavi R, Farshchian M, et al. Aflatoxin in Raw and Salt-Roasted Nuts (Pistachios, Peanuts and Walnuts) Sold in Markets of Tabriz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2014;7(1).
53. Herzallah S. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry.* 2009;114(3):1141-6.

54. Bircan C, Barringer S, Ulken U, Pehlivan R. Increased aflatoxin contamination of dried figs in a drought year. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*. 2008;25(11):1400-8.
55. Giray B, Girgin G, Engin A, Aydin S, Sahin G. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*. 2007;18(1):23-9.
56. Gonzalez-Penas E, Leache C, de Cerain A, Lizarraga E. Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine. *Food Chemistry*. 2006;97(2):349-54.
57. Blesa J, Berrada H, Soriano J, Molto J, Manes J. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography a*. 2004;1046(1-2):127-31.
58. Fazekas B, Tar A, Zomborszky-Kovacs M. Ochratoxin a contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2002;50(2):177-88.
59. Iha M, Trucksess M, Tournas V. Effect of processing on ochratoxin A content in dried beans. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*. 2009;26(10):1389-95.
60. Magnoli C, Astoreca A, Ponsone M, Fernandez-Juri M, Barberis C, Dalcero A. Ochratoxin A and *Aspergillus section Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Cordoba, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;119(3):213-8.
61. Sakin F, Tekeli I, Yipel M, Kurekci C. Occurrence and health risk assessment of aflatoxins and ochratoxin a in Surk, a Turkish dairy food, as studied by HPLC. *Food Control*. 2018;90:317-23.
62. Asghar M, Ahmed A, Iqbal J. Aflatoxins and ochratoxin A in export quality raisins collected from different areas of Pakistan. *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance*. 2016;9(1):51-8.
63. Bircan C. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(8):1996-2001.
64. Faberi A, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Lagana A. Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQ(linear ion trap) mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005;19(2):275-82.
65. Gokmen V, Acar J, Sarioglu K. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. *Anal Chim Acta*. 2005;543(1-2):64-9.
66. Boonzaaijer G, Bobeldijk I, van Osenbruggen W. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control*. 2005;16(7):587-91.
67. Cunha S, Faria M, Pereira V, Oliveira T, Lima A, Pinto E. Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control*. 2014;44:185-90.
68. Assuncao R, Martins C, Dupont D, Alvito P. Patulin and ochratoxin A co-occurrence and their bioaccessibility in processed cereal-based foods: A contribution for Portuguese children risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;96:205-14.
69. Zouaoui N, Sbaili N, Bacha H, Abid-Essefi S. Occurrence of patulin in various fruit juice marketed in Tunisia. *Food Control*. 2015;51:356-60.
70. Van de Perre E, Jacxsens L, Van Der Hauwaert W, Haesaert I, De Meulenaer B. Screening for the presence of patulin in molded fresh produce and evaluation of its stability in the production of tomato products. *J Agric Food Chem*. 2014;62(1):304-9.
71. Hewitt T, Flack C, Kolodziejczyk J, Chacon A, D'Ovidio K. Occurrence of zearalenone in fresh corn and corn products collected from local Hispanic markets in San Diego County, CA. *Food Control*. 2012;26(2):300-4.

72. Holda K, Glogowski R. A survey of Deoxynivalenol and Zearalenone content in commercial dry foods for growing dogs. 2014;53:111–7.
73. Ramirez M, Chulze S, Magan N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;106(3):291-6.
74. Milanez T, Valente-Soares L, Baptista G. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. *Food Control*. 2006;17(4):293-8.
75. Barthel J, Gottschalk C, Rapp M, Berger M, Bauer J, Meyer K. Occurrence of type A, B and D trichothecenes in barley and barley products from the Bavarian market. *Mycotoxin Res*. 2012;28(2):97-106.
76. Hietaniemi V, Kontturi M, Ramo S, Eurola M, Kangas A, Niskanen M, et al. Contents of trichothecenes in oats during official variety, organic cultivation and nitrogen fertilization trials in Finland. *Agricultural and Food Science*. 2004;13(1-2):54-67.
77. Kabak B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009;89(4):549-54.
78. Wambui J, Karuri E, Ojiambo J, Njage P. Application of Probabilistic Modeling to Quantify the Reduction Levels of Hepatocellular Carcinoma Risk Attributable to Chronic Aflatoxins Exposure. *Nutrition and Cancer-an International Journal*. 2017;69(1):1-13.
79. Bhat R, Shetty P, Rao P, Rao V. A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*. 1997;35(3):249-55.
80. Bhat R, Ramakrishna Y, Beedu S, Munshi K. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mold-damaged wheat products in kashmir valley, India. *Lancet*. 1989;1(8628):35-7.
81. Creppy E, Chiarappa P, Baudrimont P, Moukha S, Carratu M. Synergistic effects of fumonisin B-1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? *Toxicology*. 2004;201(1-3):115-23.
82. Turner P, Collinson A, Cheung Y, Gong Y, Hall A, Prentice A, et al. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *International Journal of Epidemiology*. 2007;36(5):1119-25.
83. Meko F, Hardie L, Evans S, Wild C. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. *Food and Chemical Toxicology*. 2001;39(8):827-36.
84. Abdulrazzaq Y, Osman N, Ibrahim A. Fetal exposure to aflatoxins in the United Arab Emirates. *Annals of Tropical Paediatrics*. 2002;22(1):3-9.
85. Schmale D, Munkvold G. *Mycotoxins in Crops*. The Plant Health Instructor. 2009.
86. Supriya C, Girish BP, Reddy PS. Aflatoxin B1-Induced Reproductive Toxicity in Male Rats: Possible Mechanism of Action. *Int J Toxicol*. 2014;33(3):155-61.
87. Tung HT, Cook FW, Wyatt RD, Hamilton PB. The anemia caused by aflatoxin. *Poult Sci*. 1975;54(6):1962-9.
88. Jiang Y, Jolly PE, Ellis WO, Wang JS, Phillips TD, Williams JH. Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. *Int Immunol*. 2005;17(6):807-14.
89. Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*. 2005;16(7):593-9.
90. Sudakin DL. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicol Lett*. 2003;143(2):97-107.
91. Swanson S, Helaszek C, Buck W, Rood H, Haschek W. The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*. 1988;26(10):823-9.

92. Maresca M, Mahfoud R, Garmy N, Fantini J. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *Journal of Nutrition*. 2002;132(9):2723-31.
93. Albarenque S, Shinozuka J, Iwamoto S, Nakayama H, Doi K. T-2 toxin-induced acute skin lesions in Wistar-derived hypotrichotic WBN/ILA-Ht rats. *Histology and Histopathology*. 1999;14(2):337-42.
94. Thuvander A, Wikman C, Gadhasson I. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: Individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. *Food and Chemical Toxicology*. 1999;37(6):639-48.
95. Smith M, Madec S, Troadec S, Coton E, Hymery N. Effects of fusariotoxin co-exposure on THP-1 human immune cells. *Cell Biology and Toxicology*. 2018;34(3):191-205.
96. Lautraite S, Rio B, Guinard J, Parent-Massin D. *In vitro* effects of diacetoxyscirpenol (DAS) on human and rat granulo-monocytic progenitors. *Mycopathologia*. 1997;140(1):59-64.
97. Rio B, Lautraite S, Parent-Massin D. *In vitro* toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors. *Hum Exp Toxicol*. 1997;16(11):673-9.
98. Bin-Umer MA, McLaughlin JE, Basu D, McCormick S, Tumer NE. Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation--implication for the mechanism of toxicity. *Toxins (Basel)*. 2011;3(12):1484-501.
99. Bensassi F, El Golli-Bennour E, Abid-Essefi S, Bouaziz C, Hajlaoui MR, Bacha H. Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. *Toxicology*. 2009;264(1-2):104-9.
100. JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives. Evaluation of Certain Mycotoxins in Food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives. Report Series N° 906. 2001.
101. Kellerman TS, Marasas WF, Thiel PG, Gelderblom WC, Cawood M, Coetzer JA. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *Onderstepoort J Vet Res*. 1990;57(4):269-75.
102. Marasas W, Kellerman T, Gelderblom W, Coetzer J, Thiel P, Vanderlugt J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin-b1 isolated from fusarium-moniliforme. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1988;55(4):197-203.
103. Colvin B, Harrison L. Fumonisin-induced pulmonary-edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia*. 1992;117(1-2):79-82.
104. Gelderblom W, Jaskiewicz K, Marasas W, Thiel P, Horak R, Vlegaar R, et al. Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by fusarium-moniliforme. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54(7):1806-11.
105. Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y. Fumonisin occurrence in corn from high-risk and low-risk areas for human esophageal cancer in china. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994;60(5):1626-9.
106. Andretta I, Lovatto PA, Hauschild L, Dilkin P, Garcia GG, Lanferdini E, et al. Alimentação de leitões pré-púberes com dietas contendo zearalenona. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008;60:1227-33.
107. Gao X, Xiao Z, Li C, Zhang J, Zhu L, Sun L, et al. Prenatal exposure to zearalenone disrupts reproductive potential and development via hormone-related genes in male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;116:11-9.
108. Prodanov – Radulovic JZ, Dosen RD, Stojanov IM, Pusic IM, Zivkov – Balos, M. M, et al. Influence of mycotoxin zearalenone on the swine reproductive failure. *Scientific Veterinary Institute “Novi Sad”*. 2013;124:121—9.
109. Rutigliano L, Valentini L, Martino NA, Pizzi F, Zanghì A, Dell'Aquila ME, et al. Ochratoxin A at low concentrations inhibits in vitro growth of canine umbilical cord matrix mesenchymal stem cells through oxidative chromatin and DNA damage. *Reprod Toxicol*. 2015;57:121-9.

110. Gan F, Zhou Y, Hou L, Qian G, Chen X, Huang K. Ochratoxin A induces nephrotoxicity and immunotoxicity through different MAPK signaling pathways in PK15 cells and porcine primary splenocytes. *Chemosphere*. 2017;182:630-7.
111. Alvarez-Erviti L, Leache C, González-Peñas E, de Cerain AL. Alterations induced in vitro by ochratoxin A in rat lymphoid cells. *Hum Exp Toxicol*. 2005;24(9):459-66.
112. Limbeck E, Vanselow J, Hofmann J, Schlosser A, Mally A. Linking site-specific loss of histone acetylation to repression of gene expression by the mycotoxin ochratoxin A. *Archives of Toxicology*. 2018;92(2):995-1014.
113. Donmez-Altuntas H, Hamurcu Z, Imamoglu N, Liman B. Effects of ochratoxin A on micronucleus frequency in human lymphocytes. *Nahrung-Food*. 2003;47(1):33-5.
114. Palma N, Cinelli S, Saporá O, Wilson S, Dogliotti E. Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*. 2007;20(7):1031-7.
115. Chopra M, Link P, Michels C, Schrenk D. Characterization of ochratoxin A-induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Cell Biol Toxicol*. 2010;26(3):239-54.
116. Gagliano N, Donne ID, Torri C, Migliori M, Grizzi F, Milzani A, et al. Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: a morphological, biochemical and molecular study. *Toxicology*. 2006;225(2-3):214-24.
117. Qi X, Yu T, Zhu L, Gao J, He X, Huang K, et al. Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014;280(3):543-9.
118. Beuchat L. Influence of water activity on growth, metabolic-activities and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection*. 1983;46(2):135-&.
119. Baxter M, Illston G. Temperature relationships of fungi isolated at low-temperatures from soils and other substrates. *Mycopathologia*. 1980;72(1):21-5.
120. Desrosier NW, Singh RP. Food preservation: *Encyclopædia Britannica*; [Available from: <https://www.britannica.com/topic/food-preservation/Fungi>. (Consultado a 01/06/2018)]
121. Ecophysiology of ochratoxigenic moulds [Available from: <https://docplayer.net/56616147-Ecophysiology-of-ochratoxigenic-moulds.html>. (Consultado a 02/07/2018)]
122. Pitt JI, Hocking AD. *The Ecology of Fungal Food Spoilage*: Springer, Boston, MA; 1997.
123. Duarte-Vogel S, Villamil-Jimenez LC. Micotoxinas en la Salud Pública. Bogotá: Rev. salud pública; May 2006.
124. Soares C, Abrunhosa L, Venâncio A. Fungos produtores de micotoxinas. *Portuguese Society for Microbiology Magazine*. Julho 2013.
125. CanStockPhoto. *Penicillium* Banco de Ilustrações 2008 [Available from: <https://www.canstockphoto.pt/ilustracao/penicillium.html>. (Consultado a 21/09/2018)]
126. Masterfile. Computer illustration of conidia (asexual spores) from a *Fusarium* sp. fungus. Some *Fusarium* fungi are pathogenes of plants and humans. 2018 [Available from: <https://www.masterfile.com/search/en/fusarium>. (Consultado a 21/09/2018)]
127. Li X, Li H, Zhang Q. Determination of trace patulin in apple-based food matrices. *Food Chem*. 2017;233:290-301.
128. Atkinson N. Antibacterial substances produced by moulds, 2. The antibacterial substances produced by some common penicillia. *Journal of the Australasian Society for Immunology*. 1943;21(1):15-6.
129. Atkinson N. Antibacterial substances produced by moulds, 1. Penicidin, a product of the growth of a *Penicillium*. *Journal of the Australasian Society for Immunology*. 1943;20(4):287-8.

130. Nunes da Silva S, Zilles Schuch P, Ronise Bernardi C, Henning Vainstein M, Jablonski A, João Bender R. Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends. *Revista Brasileira de Fruticultura*; Aug. 2007. Contract No.: 2.
131. Dailey R, Brouwer E, Blaschka A, Reynaldo E, Green S, Monlux W, et al. Intermediate-duration toxicity study of patulin in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1977;2(3):713-25.
132. Escoula L, Thomsen M, Bourdiol D, Pipy B, Peuriere S, Roubinet F. Patulin immunotoxicology - effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune-system of mice and rabbits. *International Journal of Immunopharmacology*. 1988;10(8):983-9.
133. Mckinley E, Carlton W. Patulin mycotoxicosis in the syrian-hamster. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1980;18(2):173-&.
134. Broom W. The pharmacology of patulin. *Brit J of Exp Pathol*. 1944;25:195-207.
135. Moulé Y, Hatey F. Mechanism of the *in vitro* inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from *Byssochlamys nivea*. *FEBS Lett*. 1977;74(1):121-5.
136. Smith EE, Duffus EA, Small MH. Effects of patulin on postimplantation rat embryos. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1993;25(2):267-70.
137. Al-Hazmi MA. Patulin in apple juice and its risk assessments on albino mice. *Toxicol Ind Health*. 2014;30(6):534-45.
138. International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some naturally occurring and syntetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation, volume 40. Lyon.1986 [Available from: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol40/patulin.html>.]
139. Sigma-Aldrich. Patulin 2017 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1639?lang=pt®ion=P> T. (Consultado a 03/05/2018)]
140. Lupescu A, Jilani K, Zbidah M, Lang F. Patulin-Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2013;32(2):291-9.
141. Barreira MJ. Dissertação para obtenção do grau de Mestre, ocorrência da patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças: otimização e validação do método de análise por SPE-HPLC-UV: Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia; 2009.
142. Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento (CE) 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios, L364/5-24 (2006).
143. Pádua R, Junior M. Aspectos toxicológicos e ocorrência de patulina em suco de maçã. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. 2005;26(4):535-42.
144. Pereira CF. Dissertação para obtenção do grau de Mestre, Avaliação da exposição à patulina de um grupo de crianças através do consumo de alimentos infantis à base de maçã - estudo piloto. Faculdade de Ciências: Universidade de Lisboa; 2013.
145. MacDonald S, Long M, Gilbert J, Felgueiras I. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. *JAOAC Int*. 2000;83(6):1387-94.
146. Sant'Ana A. Avaliação Quantitativa do risco da patulina em suco de maçã. Faculdade de Engenharia de Alimentos: Universidade Estadual de Campinas; 2007.
147. Puel O, Galtier P, Oswald I. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*. 2010;2(4):613-31.
148. Tannous J, Keller N, Atoui A, El Khoury A, Lteif R, Oswald I, et al. Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58(12):2082-98.

149. Neway J, Gaucher G. Intrinsic limitations on the continued production of the antibiotic patulin by *Penicillium-urticae*. Canadian Journal of Microbiology. 1981;27(2):206-15.
150. Gaucher GM. m-Hydroxybenzyl-alcohol dehydrogenase. Methods Enzymol. 1975;43:540-8.
151. Murphy G, Lynen F. Patulin biosynthesis - metabolism of m-hydroxybenzyl alcohol and m-hydroxybenzaldehyde by particulate preparations from *Penicillium-patum*. European Journal of Biochemistry. 1975;58(2):467-75.
152. Wright SAI. Patulin in food. Current Opinion in Food Science. 2015;5:105-9.
153. Karaca H, Nas S. Aflatoxins, patulin and ergosterol contents of dried figs in Turkey. Food Additives and Contaminants. 2006;23(5):502-8.
154. Sylos C, Amaya D. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. Food Addit Contam. 1999;16(2):71-4.
155. Frank H, Orth R, Figge A. Patulin in foods of vegetable origin .2. Several kinds of fruit and vegetables and fruit and vegetable products. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung. 1977;163(2):111-4.
156. Iqbal S, Malik S, Asi M, Selamat J, Malik N. Natural occurrence of patulin in different fruits, juices and smoothies and evaluation of dietary intake in Punjab, Pakistan. Food Control. 2018;84:370-4.
157. Pattono D, Grosso A, Stocco P, Pazzi M, Zeppa G. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. Food Control. 2013;33(1):54-7.
158. Vansteelandt M, Kerzaon I, Blanchet E, Tankoua O, Du Pont T, Joubert Y, et al. Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. Fungal Biology. 2012;116(9):954-61.
159. Spadaro D, Garibaldi A, Gullino M. Occurrence of patulin and its dietary intake through pear, peach, and apricot juices in Italy. Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance. 2008;1(2):134-9.
160. Funes G, Resnik S. Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. Food Control. 2009;20(3):277-80.
161. Ji X, Li R, Yang H, Qi P, Xiao Y, Qian M. Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China. Food Control. 2017;78:100-7.
162. Gashlan H. High performance liquid chromatographic determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia. Faculty of Science: King Abdulaziz University; Jan. 2009.
163. Celli M, Coelho A, Wosiacki G, Garcia-Cruz C. Patulina: incidência e controle em derivados de maçã. Semina: Ciências Agrárias; 2009. Contract No.: 1.
164. Baert K, Devlieghere F, Flyps H, Oosterlinck M, Ahmed MM, Rajković A, et al. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. International Journal of Food Microbiology. 2007;119(3):170-81.
165. Tannous J, Atoui A, El Khoury A, Francis Z, Oswald I, Puel O, et al. A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. Food Science & Nutrition. 2016;4(4):611-22.
166. Hefnawy MA, Abou-Zeid AM. Differential adaptation of membranes of two osmotolerant fungi, *Aspergillus chevalieri* and *Penicillium expansum* to high sucrose concentrations. Acta Microbiol Pol. 2003;52(1):53-64.
167. rural v. Podredumbre azul Moho azul de los frutales de pepita (blue mold) 2018 [Available from: <https://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/aa-enfermedades/penicillium-expansum-01.htm>. (Consultado a 16/08/2018)]
168. Stinson EE, Osman SF, Huhtanen CN, Bills DD. Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. Appl Environ Microbiol. 1978;36(4):620-2.

169. Scott PM, Fuleki T, Harwig J. Patulin content of juice and wine produced from moldy grapes. *J Agric Food Chem.* 1977;25(2):434-7.
170. Ough C, Corison C. Measurement of patulin in grapes and wines. *Journal of Food Science.* 1980;45(3):476-8.
171. Kawashima L, Soares L, de Massaguer P. The development of an analytical method for two mycotoxins, patulin and verruculogen, and survey of their presence in commercial tomato pulp. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2002;33(3):269-73.
172. Frank H. Occurrence of patulin in fruit and vegetables. *Annales de la Nutrition et de l'alimentation.* 1977;31(4-6):459-65.
173. Stott W, Bullerman L. Influence of carbohydrate and nitrogen-source on patulin production by *Penicillium-patulum*. *Applied Microbiology.* 1975;30(5):850-4.
174. Roland J, Beuchat L. Biomass and patulin production by *Byssochlamys-nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂ and temperature. *Journal of Food Science.* 1984;49(2):402-6.
175. Rice S. Patulin production by *Byssochlamys* spp in canned grape juice. *Journal of Food Science.* 1980;45(3):485-&.
176. Salomao B, Aragao G, Churey J, Padilla-Zakour O, Worobo R. Influence of Storage Temperature and Apple Variety on Patulin Production by *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection.* 2009;72(5):1030-6.
177. Cheraghali A, Mohammadi H, Amirahmadi M, Yazdanpanah H, Abouhossain G, Zamanian F, et al. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. *Food Control.* 2005;16(2):165-7.
178. Sarubbi F, Formisano G, Auriemma G, Arrichiello A, Palomba R. Patulin in homogenized fruit's and tomato products. *Food Control.* 2016;59:420-3.
179. Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ Toxicol [Internet].* 2002; 17(3):[211-8 pp.].
180. Tsai W, Lo Y, Wu M, Li C, Kuo Y, Lai Y, et al. Mycotoxin Patulin Suppresses Innate Immune Responses by Mitochondrial Dysfunction and p62/Sequestosome-1-dependent Mitophagy. *Journal of Biological Chemistry.* 2016;291(37):19299-311.
181. Song E, Su C, Fu J, Xia X, Yang S, Xiao C, et al. Selenium supplementation shows protective effects against patulin-induced brain damage in mice via increases in GSH-related enzyme activity and expression. *Life Sciences.* 2014;109(1):37-43.
182. de Melo F, de Oliveira I, Greggio S, Dacosta J, Guecheva T, Saffi J, et al. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology.* 2012;50(10):3548-55.
183. Assuncao R, Alvito P, Kleiveland C, Lea T. Characterization of *in vitro* effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. *Toxicology Letters.* 2016;250:47-56.
184. Kawauchiya T, Takumi R, Kudo Y, Takamori A, Sasagawa T, Takahashi K, et al. Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells. *Toxicology Letters.* 2011;205(2):196-202.
185. Ayed-Boussema I, Pascussi J, Rjiba K, Maurel P, Bacha H, Hassen W. The mycotoxin, patulin, increases the expression of PXR and AhR and their target cytochrome P450s in primary cultured human hepatocytes. *Drug and Chemical Toxicology.* 2012;35(3):241-50.
186. Zhang B, Peng X, Li G, Xu Y, Xia X, Wang Q. Oxidative stress is involved in Patulin induced apoptosis in HEK293 cells. *Toxicon.* 2015;94:1-7.
187. Schumacher DM, Metzler M, Lehmann L. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Arch Toxicol.* 2005;79(2):110-21.

188. Liu BH, Wu TS, Yu FY, Wang CH. Mycotoxin patulin activates the p38 kinase and JNK signaling pathways in human embryonic kidney cells. *Toxicol Sci.* 2006;89(2):423-30.
189. Rychlik M. Rapid degradation of the mycotoxin patulin in man quantified by stable isotope dilution assays. *Food Addit Contam.* 2003;20(9):829-37.
190. Codex Alimentarius Commission CAC. Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients and other beverages. CAC/RCP, 50: 1-6.; 2003.
191. Zhou T, Chu C, Liu W, Schaneider K. Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie.* 2001;23(3):246-52.
192. Quaglia M, Ederli L, Pasqualini S, Zizzerini A. Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 2011;59(3):307-15.
193. Zhu Y, Koutchma T, Warriner K, Zhou T. Reduction of Patulin in Apple Juice Products by UV Light of Different Wavelengths in the UVC Range. *Journal of Food Protection.* 2014;77(6):963-71.
194. Janotova L, Cizkova H, Pivonka J, Voldrich M. Effect of processing of apple puree on patulin content. *Food Control.* 2011;22(6):977-81.
195. Baert K, Devlieghere F, Amiri A, De Meulenaer B. Evaluation of strategies for reducing patulin contamination of apple juice using a farm to fork risk assessment model. *International Journal of Food Microbiology.* 2012;154(3):119-29.
196. Bandoh S, Takeuchi M, Ohsawa K, Higashihara K, Kawamoto Y, Goto T. Patulin distribution in decayed apple and its reduction. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2009;63(4):379-82.
197. Bissessur J, Permaul K, Odhav B. Reduction of patulin during apple juice clarification. *J Food Prot.* 2001;64(8):1216-9.
198. Park DL, Njapau H, Boutrif E, Park DL. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *FAO Food and Nutrition Division.* 1999.
199. Acar J, Gokmen V, Taydas E. The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology.* 1998;207(4):328-31.
200. Jackson L, Beacham-Bowden T, Keller S, Adhikari C, Taylor K, Chirtel S, et al. Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider. *J Food Prot.* 2003;66(4):618-24.
201. Sitton J, Patterson M. Effect of high-carbon dioxide and low-oxygen controlled atmospheres on postharvest decays of apples. *Plant Disease.* 1992;76(10):992-5.
202. Moodley R, Govinden R, Odhav B. The effect of modified atmospheres and packaging on patulin production in apples. *J Food Prot.* 2002;65(5):867-71.
203. Draughon F, Ayres J. Insecticide inhibition of growth and patulin production in *Penicillium-expansum*, *Penicillium-urticae*, *Aspergillus-clavatus*, *Aspergillus-terreus*, and *Byssochlamys-nivea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1980;28(6):1115-7.
204. Conway W, Janisiewicz W, Klein J, Sams C. Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. *Hortscience.* 1999;34(4):700-4.
205. Sydenham E, Vismar H, Marasas W, Brown N, Schlechter M, Vanderwesthuizen L, et al. Reduction of patulin in apple juice samples - influence of initial processing. *Food Control.* 1995;6(4):195-200.
206. Tsao R, Zhou T. Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2000;48(11):5231-5.

207. Tabata S, Iida K, Suzuki J, Kimura K, Ibe A, Saito K. A quantification and confirmation method of patulin in apple juice by GC/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 2004;45(5):245-9.
208. Katerere D, Stockenstrom S, Balducci G, Shephard G. Determination of patulin in apple juice: Comparative evaluation of four analytical methods. *J AOAC Int*. 2007;90(1):162-6.
209. Rovira R, Ribera F, Sanchis V, Canela R. Improvements in the quantitation of patulin in apple juice by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993;41(2):214-6.
210. Prieta J, Moreno M, Diaz S, Suarez G, Dominguez L. Survey of patulin in apple juice and childrens apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. *J Agric Food Chem*. 1994;42(8):1701-3.
211. Trucksess M, Tang Y. Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. *Journal of Aoac International*. 1999;82(5):1109-13.
212. Scott P. Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1974;57(3):621-5.
213. Almeida CMM, Lopes MM. Fungi Isolated from Traditional and Exotic Apple Varieties from Portugal and Patulin Production. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*. 2015;5.
214. Edwards S, O'Callaghan J, Dobson A. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research*. 2002;106:1005-25.
215. Bhatti S, Jha G. Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. *Plant Cell Rep*. 2010;29(11):1215-25.
216. Franco P. Dissertação para obtenção do grau de Mestre, Características Físico-químicas, Propriedades Funcionais e Perfil de Compostos Fenólicos de 17 Variedades de Maçãs Portuguesas. Faculdade de Ciências e Tecnologia: Universidade Nova de Lisboa; Julho 2014.
217. Pinheiro R, Fernandes H, Tojal A, Silva A, Ribeiro C. Maçã (*Malus domestica* Borkh.) – do pomar à refrigeração. 2ª ed. IX Simpósio Ibérico de Maturação e Pós Colheita: Actas Portuguesas de Horticultura.
218. Maçã. Gabinete de Planeamento e Políticas: Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas; 2007.
219. Estatísticas Agrícolas 2017. Instituto Nacional de Estatística, I.P; 2018. p. 72.
220. INE (Instituto Nacional de Estatística). Produções record de tomate para a indústria e de maçã. Novembro 2015.
221. FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Crops 2018 [Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Consultado a 20/07/2018)]
222. FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Food Balance Sheets 2017 [Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>. (Consultado a 20/07/2018)]
223. FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Compare Data 2017 [Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>. (Consultado a 20/07/2018)]
224. INE (Instituto Nacional de Estatística). Base de dados. Consumo humano de frutos per capita (kg/ hab.) por Espécie frutícola (Balanços de mercado) 2018 [Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000163&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt. (Consultado a 25/07/2018)]
225. Clube Maçã de Alcobaça. O ciclo produtivo da maçã 2017 [Available from: <http://www.maca.pt/Page/13411/Processo-Produtivo.aspx>. (Consultado a 06/09/2018)]

226. Classe frutas. Maçã 2017 [Available from: <http://www.frutasclasse.com/index.php/pt/produtos/maca>. (Consultado a 10/07/2018)]
227. WAPA (The World Apple and Pear Association). Apple Varieties 2017 [Available from: http://www.wapa-association.org/asp/list_1.asp?cat_id=58. (Consultado a 11/07/2018)]
228. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Codex Standard for apples (Codex Stan 299-2010). 2010. p. 6.
229. APMA (Associação dos Produtores de Maçã de Alcobaça). Produtos Tradicionais Portugueses, Maçã de Alcobaça IGP 2018 [Available from: <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/frutos-frescos/738-maca-de-alcobaca-igp>. (Consultado a 25/07/2018)]
230. Feliciano R, Antunes C, Ramos A, Serra A, Figueira M, Duarte C, et al. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1- Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods*. 2010;2(1):35-45.
231. INETI (Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia). Estudo de caracterização nutricional e de fitonutrientes em variedades de maçã do Oeste. Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares (DTIA). 2007.
232. INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge). Composição de alimentos 2017 [Available from: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?2795>. (Consultado a 28/08/2018)]
233. Almeida DPF, Pintado M, Malcata FX. Valor nutritivo e composição fitoquímica de variedades de maçã de Alcobaça. Centro de Biotecnologia e Química Fina, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto. 2008.
234. Li Y, Schellhorn H. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition*. 2007;137(10):2171-84.
235. Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkanen H, et al. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(4):1365-402.
236. Macfarlane S, Macfarlane G, Cummings J. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006;24(5):701-14.
237. Root WH, Barrett DM. *Processing Fruits Science and Technology* Second Edition. University of California; 2005.
238. Diao E, Wang J, Li X, Wang X, Gao D. Patulin degradation in apple juice using ozone detoxification equipment and its effects on quality. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018;42(7).
239. Iha M, Sabino M. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. *Food Control*. 2008;19(4):417-22.
240. Yurdun T, Omurtag G, Ersoy O. Incidence of patulin in apple juices marketed in Turkey. *J Food Prot*. 2001;64(11):1851-3.
241. Watanabe M, Shimizu H. Detection of patulin in apple juices marketed in the Tohoku District, Japan. *J Food Prot*. 2005;68(3):610-2.
242. Leggott N, Shephard G. Patulin in South African commercial apple products. *Food Control*. 2001;12(2):73-6.
243. Baert K, De Meulenaer B, Kamala A, Kasase C, Devlieghere F. Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. *J Food Prot*. 2006;69(6):1371-8.
244. Lovett J, Thompson R, Boutin B. Trimming As a means of removing patulin from fungus-rotted apples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1975;58(5):909-11.
245. Sant'Ana A, Rosenthal A, de Massaguer P. The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Res Int*. 2008;41(5):441-53.

246. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control.: FAO Food and Nutrition Paper; 2003.
247. AIJN European Fruit Juice Association. How juice is being made? 2017 [Available from: <http://www.aijn.org/publications/facts-and-figures/how-juice-is-being-made/>. (Consultado a 15/10/2018)]
248. Okull D, LaBorde L. Activity of electrolyzed oxidizing water against *Penicillium expansum* in suspension and on wounded apples. Journal of Food Science. 2004;69(1):M23-M7.
249. Sands DC, McIntyre JL, Walton GS. Use of activated charcoal for the removal of patulin from cider. Appl Environ Microbiol. 1976;32(3):388-91.
250. Scott P, Somers E. Estability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1968;16(3):483-&.
251. Kryger R. Volatility of patulin in apple juice. J Agric Food Chem. 2001;49(8):4141-3.
252. Almeida C, Eduardo ME. Aulas laboratoriais de Bromatologia e Tecnologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2017.
253. 3030 NP. Frutos, Produtos Hortícolas e seus derivados. Determinação do teor de ácido ascórbico. Processos correntes. 1985.