



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO RISCO DA PATULINA EM SUCO DE MAÇÃ.

ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA.
BACHAREL EM QUÍMICA INDUSTRIAL.

PROFA. DRA. PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER.
ORIENTADORA.
DR AMAURI ROSENTHAL.
CO-ORIENTADOR.

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS.**

CAMPINAS – SP.

2007.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sa82a	<p>Sant'Ana, Anderson de Souza Avaliação quantitativa do risco da patulina em suco de maçã/ Anderson de Souza Sant'Ana. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer Co-orientador: Amauri Rosenthal Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos</p> <p>1. Patulina. 2. <i>Byssochlamys</i>. 3. Avaliação quantitativa de risco. 4. Suco de maçã. 5. Micotoxinas. I. Massaguer, Pilar Rodriguez de. II. Rosenthal, Amauri. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.</p> <p>(cars/fea)</p>
-------	---

Titulo em inglês: Quantitative risk assessment of patulin in apple juice

Palavras-chave em inglês (Keywords): Patulin, *Byssochlamys*, Quantitative risk assessment,
Apple juice, Mycotoxins

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer

Marcelo Alexandre Prado

Wilmer Edgard Luera Peña

Marta Hiromi Taniwaki

Data da defesa: 10/10/2007

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer
Orientadora - Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
Membro - Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Wilmer Edgard Luera Peña
Membro - Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Marta Hiromi Taniwaki
Membro - Instituto de Tecnologia de Alimentos

“No momento em que realmente nos decidimos, então o universo começa a agir também. Todo tipo de coisa começa a ocorrer, coisas que não ocorreriam normalmente, mas que acontecem porque você tomou a decisão. Uma série de eventos flui dessa decisão, levantando a nosso favor todo tipo de imprevistos, encontros e assistência material que nenhuma pessoa no mundo poderia planejar que ocorresse na sua vida. Seja lá o que você possa fazer, ou tenha o sonho de fazer: comece. O arrojo tem dentro de si inteligência, poder e mágica. Então comece agora!”

Johann Wolfgang von Goethe.

“A revolução em que acredito é aquela ensinada por Nosso Senhor Jesus Cristo que começa pela corrigenda de cada um, na base do fazamos aos outros aquilo que desejamos que os outros nos façam”.

Francisco Cândido Xavier.

"É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota".

Theodore Roosevelt.

"Tudo o que Jesus falou no Sermão da Montanha foi ao coração, ao sentimento. Não disse nada ao raciocínio, porque é pela inteligência que caímos. Ele não disse: Bem-aventurados os inteligentes. Chegou mesmo, certa vez, a dar graças ao Pai por ter ocultado os segredos do céu aos sábios e inteligentes. Quem cai pelo amor, o próprio motivo da queda faz que se reerga, mas quem cai pela inteligência não se sente caído".

Francisco Cândido Xavier.

Dedico esta conquista principalmente à minha “mãe” (Zélia), minha irmã (Lílian Carla) pelos incentivos constantes e à minha grande amiga Denise R.P. Azeredo por ter me acompanhado e me dado os primeiros e fundamentais ensinamentos de microbiologia de alimentos e da vida profissional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

...neste espaço são lembradas pessoas que muito contribuíram para a realização de um grande sonho...

A Deus e à espiritualidade amiga sempre, antes e depois de tudo e de todos!

À prof^a. Pilar R. Massaguer pela oportunidade, orientação, ensinamentos sobre a ciência, persistência e pelas longas reuniões sobre tudo concernente à dissertação: prévia de experimentos, metodologia, resultados, que muito me fizeram evoluir.

Aos membros da banca, professores: Dr. Marcelo A. Prado, Dr. Wilmer E.L. Peña e Dra. Marta H. Taniwaki pela colaboração com as sugestões e por disponibilizarem uma parte importante de seu tempo para correção dos bonecos em um tempo muito pequeno. Agradeço-lhes grandemente a atenção!

À minha mãe pelo incentivo nos momentos em que mais precisei e quando mais temia. Por toda preocupação e amor. Ao meu pai que mesmo ausente fisicamente, sempre esteve comigo fortemente em atitudes, palavras e sentimentos. Aos meus pais por terem me proporcionado e também à minha irmã a oportunidade de conviver num ambiente familiar de respeito, carinho, amor e sonhos, apesar das dificuldades;

À minha irmã pela força que sempre me passou através de suas orações e por sua infinita calma e palavras que tanto me ajudaram em momentos impensáveis e imprevisíveis da minha vida;

Ao Cadú (Carlos Eduardo), meu sobrinho, que muitas vezes por seu sorriso e palavras me renovou e renova as energias e me dá forças para seguir em frente e continuar acreditando nas coisas boas da vida;

A minha grande amiga Denise Perdomo, por ter sido desde o início (na época do curso técnico de alimentos), alguém muito presente e marcante em momentos muito especiais da minha vida. Pelos intermináveis gestos e palavras de carinho e ânimo que muito me incentivaram e me levaram a crescer profissionalmente e principalmente pessoalmente. Agradeço também a seu esposo Alexandre Gomes, pelo apoio para minha vinda para Unicamp;

À Judy (Judith R. Hajdenwurcel) pelo incentivo permanente desde as épocas do Senai, pela carta de recomendação ao mestrado, por ser parte da idéia do trabalho

através do projeto de Sucos e Drinks, pelos auxílios durante a realização do trabalho e pela amizade;

A profa. Anita Tibana pelo incentivo na época do Senai, pela paciência para me atender quando das dúvidas na época do APPCC e pela carta de recomendação ao mestrado;

À minha madrinha (Luíza), padrinho (Pedro) e meus tios, tias, primos e primas pela força, atenção, preocupação e torcida durante todos estes anos;

À Jamile Maureen, uma grande amiga, por seu carinho e atenção, por todo incentivo e momentos divertidos mesmo pelo fone desde a época da Arisco;

À Luz Paucar, pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas durante o almoço e por sempre ouvir minha inquietações;

A Ana Paula Boleti, alguém que me foi muito especial. Mesmo após os desencontros da vida, continuamos por perto!

Ao amigo Adriano G. Cruz pelas conversas sobre ciência e futuro, pela amizade e companheirismo que se firmaram ainda mais neste período na Unicamp.

À Luciana Esper pela grande amizade, carinho, preocupação e atenção! Obrigado por tentar me fazer sair mais (durante um tempo você até conseguiu! Era quase todo dia!). Agradeço-lhe de coração todas as longas conversas ao telefone, durante as saídas, por ter me dado às mãos tantas vezes, ter me ouvido e ajudado tantas outras vezes com minhas pirações certas e incertas! Você é alguém muito especial pra mim!

À amiga Karen S. Pereira pelas diversas vezes em que ouviu minhas inquietações, pelas conversas sobre ciência e futuro, pelos conselhos e incentivos para seguir o caminho, além da comilança no final de 2006. Ainda estamos tentando nos recuperar! Rsss!

À Vanessa Silva pela amizade que cruzou divisas e fronteiras, mas permaneceu! Pela força imprescindível num momento que MUITO precisei! Só você sabe!

À Lilinha (Lilian Alvarez) pela amizade, presença e pela torcida de sempre, durante todos os momentos importantes da minha vida. Extenso ao Aurélio, Dona Ana, Laís e Luís Antônio;

À Verônica, pela amizade que pudemos criar durante o convívio no laboratório, às palavras de apoio e força quando foram necessárias, às risadas e histórias engraçadas

que acontecem nesta vida e às conversas sobre futuro pessoal e profissional. Você também foi uma pessoa que ajudou muito quando não tinha mais condições de pensar! Agradeço-te muito pelo carinho e pela ajuda!

À Ana Cláudia Spinelli pela época em que estivemos juntos no laboratório, por sua alegria e pelos momentos bastante hilários e por outros nem tanto, que aqui passamos; por sua calma e paciência. À Ana e ao Zédu pela amizade, conversas paralelas e sem dúvida pelas diversas porpetagens fortes!

À Alê Mãe, pela ajudas no início dos experimentos com fungos termoresistentes, com o Statistica, pela leitura das partes iniciais da dissertação, pelas sugestões, pelas palavras carinhosas nos momentos difíceis, pela ajuda quando precisei e pela amizade nestes anos;

À Eliane Beliato (Li) pela importantíssima contribuição a todos nós no laboratório de Termobacteriologia, pelas poucas, mas engraçadas conversas e claro pelos bolos das sextas-feiras e coxinhas!

À Alê Filha, por ser companheira de sofrimento como disse a Pilar, pelas inúmeras conversas sobre o nosso sofrimento: “agora vai dar certo!” e lógico pelas caronas!

Ao Sal e ao Márcio pela ajuda imprescindível nos experimentos do UHT e mais ainda nos CIP´s intermináveis! Rsss! Valeu mesmo pela força!

À Aninha “Tsukahara”, a mais recente do laboratório, mas que sempre ajudou na realização dos experimentos, principalmente nos do UHT. À Érica que tornava tudo engraçado mesmo não estando, pelo tempo que conosco estive! À Cristiana Pacheco, pelos ensinamentos sobre a unidade UHT.

À Alline Artigiani pela amizade e pelas poucas mais produtivas conversas sobre ciência e futuro!

À Marina Copetti pelo sorriso e carinho desde que nos conhecemos em toxiinfecções... Obrigado por tudo, viu?!

Aos meus amigos de infância/adolescência que fizeram e sempre farão parte da minha vida e com os quais sempre pude contar, aprender e crescer! Muitos momentos maneiros se foram, hoje são lembrados e muitos ainda virão! Em especial à Aline - “MADA”, Fabinho, Flávio (do Clube das ciências químicas, físicas e biológicas!), Clébinho

- GAG, Daniel, Welinton, “Vinha” (Flávia), Cibele, Eduardo, Fabiana Anacleto e Simone Pedro;

A galera das repúblicas em que morei! Na primeira rep e no primeiro ano, ao Wesley, que se tornou um grande amigo, Breno, Alexandre (Bira), Nander, Daniel. Valeu pelas conversas em grupo até altas horas. Foi muito maneiro! No segundo ano ao Éder, Mário, Raniere e Deivid! Na segunda rep, galera muito gente fina! Agradeço ao Deivid (Nerd!) pela amizade, pelos almoços e jantas, pelas corridas e pelos papos com algumas vezes opiniões divergentes, mas importantes! Valeu por tudo Milimin! Ao Fernando “Petista” pelos papos de política e Fórmula 1. Ao Ékler pelas “catitas” providenciais e pelas conversas sobre a vida! Ao Ricardo e Luís Paulo pelos e-mails (foi mal aí, heim?! Rsss!). Ao Chinês que tentava me impedir de dormir de tanto que falava! Ao Denis “Psdebista”, ao Marcelo, Frank e Salomão pela convivência, além dos agregados (as).

A todos os meus ex-alunos (e amigos) do Senai. Em especial, à “presença distante” e incentivo durante estes anos do mestrado: “Susu” (Suellen), Gabriela Mueller, Luciano, Filipe, Olavo, Adriana, Ana Carolina, Bruno, Andréia Santos, Patrícia Capato, “Dorita” (Dora), “Mineirinho” (Edmilson), Gilcinéia, Luciana da Silva, Nelcimar, Sabrina, Suzana e Shênia. Agradeço-lhes pelo carinho, amizade e pelas conversas!

À Maria Eliza (“Furinga”), Ingrid, Aline, Maria (se lembrem da estátua!) e Iára, pelos momentos hilários durante a faculdade, por dividirem o estresse do provão, pela amizade que ficou e pelo apoio constante durante a época do mestrado. A Ana Sílvia pela amizade que nasceu após dividirmos a tensão do resultado da seleção do mestrado, em outubro de 2004. A amiga Catarina Del Cistia (da época da faculdade) também pela força!

Aos meus amigos da FEA (Marina, Milena, Thaís Belo, Rosana, Francisco Fábio, Rafael-FEQ, Rafael Cadena, Eduardo, Cláudio, Lílian Mariutti, Lílian Stranghetti, Vanessa Pires, Isa, Guilherme Cava, Taciane, Andréia Fonseca, Carol, Sérgio, Ana Patrícia, Mariana Macchinone, Liz, Manu, Mateus, Gabriela e Poliana) pela amizade e momentos compartilhados;

Aos professores (as) das disciplinas durante o mestrado, pelo conhecimento transmitido: Pilar R. Massaguer, Pedro E. Felício, Lireny A.G.Gonçalves, Adriana Z. Mercadante, Gláucia M. Pastore, Hélia H. Sato, José L. Pereira, Jaime A.-Farfán, Flávio L. Schimdt, Walkíria H. Viotto e Helena T.Godoy.

Aos funcionários do DCA (Jardete, Marquinhos, Dona Laura, Norma, Bia, Dora, Priscila e Emerson), do DTA (Adauto, Ana Lourdes, Ana Maria, Bete, Alice, Judite, Renata), do DEPAN (Eliane e Carla) pela valiosa ajuda com algo relacionado à parte experimental e aos funcionários da Biblioteca (Maria do Carmo, Geraldo, Maria Remédios, Creuza e Cláudia) pela disponibilidade e auxílio nas consultas bibliográficas, Comut e etc.. Aos funcionários da secretária de pós-graduação (Cosme e Marcão) pelo pronto atendimento.

Aos meus amigos da época do Senai-Vassouras com quem partilhei bons anos de minha vida e que me deixaram muitas lembranças boas e também aprendizados: Amélia, Carla, Janita, Vítor Mello, Vítor Meleiro, Wallace, Samer, Themis, Samara, Pablo, Cida, Vera Nogueira, Vera de Paula, Sandra, Cacá, Tiana, Grazielle, Imar, Nédio, Renata, Rosana, Gisela, Marisa, Marita, Isabela, Caio, Márcia, Paula, Priscila, Andréa, Glorinha, Lúcia, Solange, Álvaro, Denilson, Eliane Monsores, Paulo Henrique, Fabrinni, Cris Waismann, Alessandra e Eliane.

Aos meus amigos e professores da Academia Equilíbrio pelos bons momentos de descontração e amizade.

Ao Guilherme Caloba e aos professores José de Carvalho (Estatística), Francisco Louzada Neto (UfsCar) e Ferraudo (Unesp – Jaboticabal) pela paciência e disponibilidade em atender meus inúmeros telefonemas e e-mails e pelos auxílios **imprescindíveis** na parte estatística e do modelo de risco.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com o trabalho ou que me incentivaram, agradeço!

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES

Ao Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade para realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida;

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPEX) da Pró-reitoria de pós-graduação da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho (Processos FAEPEX: 282/06 e 129/07);

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA pelo auxílio concedido ao projeto *“Melhoria da Qualidade de Sucos de frutas tropicais mediante o controle de contaminantes e uso do processo de alta pressão”* através do PRODETAB (Processo 042-01/01);

Às empresas Fischer S.A. – Comércio, Indústria e Agricultura, Yakult S.A. Indústria e Comércio, Sucos Del Valle do Brasil e a Sucos Mais pela doação das amostras de sucos utilizadas no presente estudo;

Ao *L’institut national de la Recherche Agronomique* (INRA-França) pela caracterização genética das cepas fúngicas utilizadas no estudo;

À Dra Áurea Maria Lage de Moraes do Instituto Oswaldo Cruz (Fundação Oswaldo Cruz) pela identificação da cepa isolada no presente estudo;

À Denise Castellot (Palisade Corporation) por gentilmente ter cedido uma vaga para minha participação no treinamento do software @Risk no Rio de Janeiro.

Muito obrigado!

ANDERSON.

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	xxv
RESUMO.....	xxviii
CAPÍTULO 1.....	32
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	32
CAPÍTULO 2.....	35
2. OBJETIVOS GERAIS.....	35
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
CAPÍTULO 3.....	37
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
3.1. Produção e Comércio da Maçã no Brasil e no Mundo:.....	37
3.2. A Maçã e os Seus Principais Cultivares:.....	40
3.3. Classificação das Maçãs:.....	42
3.4. A Podridão Azul e a Qualidade das Maçãs:.....	44
3.5. Produção e Comércio do Suco de Maçã no Brasil e no Mundo:.....	47
3.6. O Suco de Maçã:.....	48
3.7. O Processo de Fabricação do Suco de Maçã:.....	50
3.8. Microbiologia das Maçãs e do Suco de Maçã:.....	56
3.9. Fungos Filamentosos Termoresistentes em Alimentos:.....	58
3.10. <i>Byssochlamys</i> spp:.....	67
3.10.1. <i>Características Macroscópicas e Microscópicas e Controle da Identidade de B.fulva e B.nivea:</i>	68
3.10.2. <i>Principais Parâmetros que Afetam o Crescimento de Byssochlamys:</i>	71
3.10.3. <i>Ultraestrutura e Composição dos Conídios e Ascósporos de Byssochlamys:</i>	73
3.10.4. <i>Estudos de Resistência Térmica de Byssochlamys:</i>	75
3.11. Micotoxinas:.....	77
3.11.1. <i>Características Químicas da Patulina:</i>	79
3.11.2. <i>Produção da Patulina:</i>	81

3.11.2.1. <i>Fungos Produtores de Patulina e Condições que Afetam a Produção da Micotoxina:</i>	81
3.11.2.2. <i>Biossíntese da Patulina:</i>	86
3.11.3. <i>Efeitos Tóxicos da Patulina:</i>	89
3.11.4. <i>Limites Aceitáveis de Patulina em Maçãs e Derivados:</i>	92
3.11.5. <i>Métodos para Detecção da Patulina:</i>	95
3.11.6. <i>Ocorrência de Patulina em Maçãs e Derivados:</i>	109
3.11.7. <i>Efeito das Etapas do Processo do Suco de Maçã sobre Patulina:</i>	116
3.12. <i>Microbiologia Preditiva:</i>	145
3.12.1. <i>Modelos Preditivos para Estudo e Avaliação da Segurança dos Alimentos:</i>	149
3.13. <i>Segurança dos Alimentos:</i>	152
3.14. <i>Análise de Riscos:</i>	154
3.14.1. <i>Interação entre os Elementos da Análise de Riscos:</i>	160
3.14.2. <i>Importância e Limitações da Análise de Riscos:</i>	161
3.15. <i>Modelagem de Monte Carlo e as Distribuições Estatísticas para Avaliação de Riscos:</i>	162
3.16. <i>Aplicações da Análise de Risco:</i>	172
CAPÍTULO 4.....	183
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	183
4.1. <i>Material:</i>	183
4.1.1. <i>Sucos de Maçã:</i>	183
4.1.2. <i>Microrganismos:</i>	185
4.1.3. <i>Embalagens:</i>	186
4.2. <i>Métodos:</i>	188
4.2.1. <i>Determinação do pH e °Brix das amostras de suco pronto para beber, sucos concentrados e sucos inoculados com as cepas de B.fulva e B.nivea:</i>	188

4.2.2. Enumeração de bolores termoresistentes:.....	188
4.2.3. Determinação da patulina nos sucos prontos para beber e nos sucos concentrados:.....	190
4.2.4 Preparo das suspensões de ascósporos de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> :.....	192
4.2.5. Padronização e contagem das suspensões de ascósporos dos <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> :.....	194
4.2.6. Determinação da temperatura e tempo ótimos de ativação dos ascósporos de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> :.....	194
4.2.7. Avaliação da capacidade de produção de patulina pelas cepas de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> :.....	195
4.2.8. Determinação de patulina nos sucos de maçã:.....	198
4.2.8.1 Confirmação do pico cromatográfico da patulina:.....	199
4.2.9. Determinação da cepa de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> mais termoresistente:.....	200
4.2.10. Determinação da resistência térmica em tubos TDT da cepa de <i>Byssochlamys</i> spp produtora de patulina mais termoresistente:.....	202
4.2.11. Determinação do efeito da pasteurização em sistema contínuo sobre os ascósporos de <i>Byssochlamys</i> spp produtor de patulina mais termoresistente:.....	206
4.2.12. Determinação da probabilidade de crescimento de <i>B.fulva</i> IOC 4518 e do efeito da carga de ascósporos e temperatura de estocagem na produção de patulina em suco clarificado de maçã:.....	215
4.2.13. Avaliação Quantitativa do Risco da Patulina em Suco de Maçã:.....	219
4.2.13.1. Descrição geral do modelo:.....	219
4.2.13.2. Seleção das distribuições estatísticas e dos limites de patulina para etapa do processamento do suco de maçã:.....	222
4.2.13.3. Simulação do modelo:.....	234
4.2.14. Análise estatística:.....	234
CAPÍTULO 5.....	235
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	235
5.1. Determinação do pH e °Brix das amostras de suco pronto para beber e sucos concentrados:.....	235
5.2. Enumeração de bolores termoresistentes:.....	237

5.3. Determinação de patulina nos sucos prontos para beber e nos sucos concentrados:.....	241
5.4. Controle de identidade das cepas de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> utilizadas no estudo:.....	244
5.5. Preparo, padronização e contagem em câmara de Neubauer das suspensões de ascósporos/ascos de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> :.....	246
5.6. Determinação da temperatura e tempo ótimos de ativação de ascósporos/ascos de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> :.....	248
5.7. Determinação da capacidade de produção de patulina pelas cepas de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> :.....	252
5.7.1. <i>Produção da patulina por Byssochlamys spp</i> :.....	252
5.7.2- <i>Confirmação do pico cromatográfico da patulina produzida por B.fulva IOC 4518</i> :.....	264
5.8. Determinação da cepa de <i>B.fulva</i> e <i>B.nivea</i> mais termoresistente:.....	269
5.9. Determinação da resistência térmica da cepa de <i>Byssochlamys spp</i> produtora de patulina e mais termoresistente:.....	271
5.10. Efeito da pasteurização em sistema contínuo sobre os ascósporos de <i>Byssochlamys spp</i> produtor de patulina (<i>B.fulva IOC 4518</i>):.....	279
5.11. Determinação da probabilidade de crescimento de <i>B.fulva IOC 4518</i> e do efeito da carga de ascósporos e temperatura de estocagem na produção de patulina durante a estocagem do suco clarificado de maçã:.....	293
5.11.1. <i>Determinação da probabilidade de crescimento de B.fulva IOC 4518 em função da carga de ascósporos e da temperatura durante a estocagem do suco clarificado de maçã</i> :.....	293
5.11.2. <i>Determinação do efeito da carga de ascósporos e temperatura durante a estocagem do suco clarificado de maçã na produção de patulina por B.fulva IOC 4518</i> :.....	303
5.12. Avaliação Quantitativa do Risco da Patulina em Suco de Maçã:.....	309
CAPÍTULO 6.....	332
6. CONCLUSÕES.....	332
CAPÍTULO 7.....	336
7. REFERÊNCIAS.....	336
CAPÍTULO 8.....	371
8. APÊNDICES.....	371
8.1. Apêndice 1: Meios de cultura e reagentes.....	371

8.2. Apêndice 2: Propriedades termo-físicas do suco clarificado de maçã.....	373
8.3. Apêndice 3: Temperatura dos meios de aquecimento e resfriamento da unidade Microthermics Model 25DH.....	373

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Condições Indicadas para Estocagem Refrigerada de alguns cultivares de Maçãs.....	52
Tabela 2: Condições Indicadas para Estocagem sob Atmosfera Controlada de algumas variedades de Maçãs.....	53
Tabela 3: Caracterização físico-química dos sucos concentrados de maçã.....	183
Tabela 4: Composição de ingredientes dos diferentes lotes de suco pasteurizado de maçã pronto para beber de acordo com as embalagens.....	184
Tabela 5: Cepas de <i>Byssochlamys spp</i> utilizadas e sua origem.....	185
Tabela 6: Valores de temperatura (°C) e tempo (minutos) aplicados para determinação da cepa mais termoresistente.....	202
Tabela 7: Processos de pasteurização do suco de maçã aplicados.....	207
Tabela 8: Dimensões de cada seção e das conexões da unidade UHT/HTST Microthermics utilizada para realização dos experimentos.....	211
Tabela 9: Fórmulas das distribuições probabilísticas utilizadas no modelo geral de riscos para patulina e suco de maçã.....	225
Tabela 10: Coeficientes angulares e lineares obtidos para produção de patulina por <i>B.fulva</i> IOC 4518 inoculado em suco de maçã com diferentes cargas de esporos de (10^0 e $10^1/100$ mL) e temperatura (21°C e 30°C).....	231
Tabela 11: Diferentes cenários rodados no ambiente do @Risk para modelagem de risco da patulina em suco de maçã.....	232
Tabela 12: Valores de pH e °Brix obtidos a partir das amostras de suco de maçã: pronto para beber, suco concentrado clarificado e não clarificado.....	236
Tabela 13: Descrição das características macroscópicas e microscópicas de <i>A.carneus</i> IOC 4519 isolado de suco de maçã.....	238
Tabela 14: Diâmetro das colônias de <i>A.carneus</i> IOC 4519 em ágar suco de maçã em diferentes valores de temperatura (°C).....	241
Tabela 15: Características macro e microscópicas observadas na diferenciação de <i>B.fulva</i> IOC 4518 e <i>B.nivea</i> ATCC 24008 e FR 4421.....	244
Tabela 16: Contagem direta de ascósporos/ascos (Câmara de Neubauer) das suspensões de <i>B.nivea</i> FRR 4421, <i>B.fulva</i> IOC 4518 e <i>B.nivea</i> ATCC 24008.....	248

Tabela 17: Contagem por plaqueamento em MEA das suspensões de <i>B.nivea</i> FRR 4421, <i>B.fulva</i> IOC 4518 e <i>B.nivea</i> ATCC 24008.....	251
Tabela 18: Determinação da cepa de <i>B.nivea</i> / <i>B.fulva</i> produtora de patulina mais termoresistente.....	270
Tabela 19: Valores de “k”, D* (min), equação da reta e R ² às temperaturas de 85°C, 90°C, 92°C e 95°C e valor de Z* (°C) para <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã.....	276
Tabela 20: Valores de F (min) para processamento de suco clarificado de maçã à 95°C, 98°C e 105°C considerando-se <i>B.fulva</i> IOC 4518 como alvo e taxa de defeitos de 1 embalagem em 10 ⁴ produzidas.....	277
Tabela 21: Valores médios de temperatura de entrada e saída, J de cada seção durante os processos de pasteurização de suco clarificado de maçã sobre ascósporos de <i>B.fulva</i> IOC 4518.....	281
Tabela 22: Valores de F _{95°C} , número de reduções calculado e obtidos experimentalmente durante os processos de pasteurização de suco clarificado de maçã sobre ascósporos de <i>B.fulva</i> IOC 4518.....	284
Tabela 23: Variação do número de reduções decimais experimentalmente observados (γ_e) de <i>B.fulva</i> IOC 4518 inoculado no suco de maçã clarificado (processo A).....	290
Tabela 24: Porcentagem de garrafas apresentando defeito (crescimento micelial) para cada processo (A, B e C) após incubação à 30°C por 30 dias.....	291
Tabela 25: Produção de patulina por <i>B.fulva</i> IOC 4518 sobreviventes ao processo térmico A (equivalente ao industrial) após 12 dias de estocagem à 30°C.....	292
Tabela 26: Tempo para crescimento de <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã em função da carga de esporos e temperatura durante a estocagem.....	294
Tabela 27: Valores de P _(t) calculados e os ajustados pelo modelo preditivo para <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã em função da temperatura e carga de esporos durante a estocagem por 12 dias.....	295
Tabela 28: Valores dos fatores Bias, Exatidão e R ² obtidos para cada condição de temperatura de estocagem versus carga de esporos para o modelo de tempo para crescimento de <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã.....	296
Tabela 29: Valores de P _{max} , κ e τ para <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã estocado à 21°C e 30°C, inoculado com 10 ⁰ e 10 ¹ esporos/100 mL.....	301

Tabela 30: Sumário dos resultados dos cenários da avaliação quantitativa de risco para patulina em suco de maçã simulados com @Risk.....310

Tabela 31: Porcentagem de contribuição da etapa de estocagem pós-pasteurização do suco para o limite de 50ppb de patulina no produto final ser ultrapassado.....327

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Processo de Fabricação do Suco de Maçã.....	51
Figura 02: Ultra-estrutura dos conídios de <i>B.fulva</i>	73
Figura 03: Ultra-estrutura dos ascos e ascósporos de <i>B.fulva</i>	74
Figura 04: Estrutura Química da Patulina.....	79
Figura 05: Rota Biossintética da Patulina.....	88
Figura 06: Formato das Distribuições Beta (A), Binomial (B) e Poisson (C).	168
Figura 07: Formato das Distribuições Exponencial (A), Gama (B) e LogNormal (C).....	169
Figura 08: Formato das Distribuições Normal (A), Triangular (B) e Uniforme (C).....	170
Figura 09: Formato da Distribuição Weibull (A) e Pert (B).....	171
Figura 10: Unidade <i>Microthermics</i> UHT/HTST Lab-25-DH (A) e câmara de fluxo laminar classe 100 <i>Microthermics</i> (B).....	208
Figura 11: Modelo Esquemático da Avaliação Quantitativa de Risco para Patulina em Suco de Maçã.....	221
Figura 12: Exemplo da Planilha de Excel apresentando o modelo simulado no @Risk para determinação dos parâmetros mínimo, mais provável e máximo de redução da patulina durante a pasteurização do suco de maçã.....	229
Figura 13: Exemplo de planilha do modelo de risco para patulina e suco de maçã com 10 ⁰ esporos/100 mL de sobreviventes à pasteurização.....	233
Figura 14: Crescimento de <i>A.carneus</i> em meios de cultura para identificação de fungos.....	239
Figura 15: Perfil cromatográfico para análise de patulina (HPLC com detector de UV, $\lambda=276\text{nm}$).	243
Figura 16: Perfil cromatográfico (HPLC) mostrando o pico do padrão de patulina obtido usando-se detector de UV ($\lambda=276\text{nm}$).....	243
Figura 17: Seqüência do fragmento ITS para a cepa <i>B.fulva</i> IOC 4518.....	245
Figura 18: Seqüência do fragmento ITS para a cepa <i>B.nivea</i> FRR 4421.....	246
Figura 19: Suspensões de <i>Byssochlamys</i> spp mostrando a presença de ascos e ascósporos.....	247
Figura 20: Curva tentativa de ativação de ascósporos de <i>B.fulva</i> IOC 4518, <i>B.nivea</i> ATCC 24008 e <i>B.nivea</i> FRR 4421 à 80°C.....	249

Figura 21: Curva de ativação de ascósporos de <i>B.fulva</i> IOC 4518, <i>B.nivea</i> ATCC 24008 e <i>B.nivea</i> FRR 4421 à 75°C.....	250
Figura 22: Produção de patulina por <i>Byssochlamys spp</i> em diferentes tipos de suco de maçã em embalagens PET e cartonada à 21°C.....	260
Figura 23: Produção de patulina por <i>Byssochlamys spp</i> em diferentes tipos de suco de maçã em embalagens PET e cartonada à 30°C.....	260
Figura 24: Produção de biomassa por <i>Byssochlamys spp</i> em diferentes tipos de suco de maçã em embalagens PET e cartonada à 21°C.....	260
Figura 25: Produção de biomassa por <i>Byssochlamys spp</i> em diferentes tipos de suco de maçã em embalagens PET e cartonada à 30°C.....	260
Figura 26: Variação na porcentagem de Sólidos Solúveis (°Brix) em diferentes sucos inoculados com <i>Byssochlamys spp</i> e incubados à 21°C.....	261
Figura 27: Variação de pH em diferentes sucos inoculados com <i>Byssochlamys spp</i> e incubados à 21°C.....	261
Figura 28: Variação na porcentagem de Sólidos Solúveis (°Brix) em diferentes sucos inoculados com <i>Byssochlamys spp</i> e incubados à 30°C.....	262
Figura 29: Variação de pH em diferentes sucos inoculados com <i>Byssochlamys spp</i> e incubados à 30°C.....	262
Figura 30: Perfil cromatográfico (HPLC) da amostra controle de suco de maçã obtido usando-se detector de UV ($\lambda=276\text{nm}$).....	263
Figura 31: Perfil cromatográfico (HPLC) mostrando o pico do padrão de patulina obtido usando-se detector de UV ($\lambda=276\text{nm}$).....	263
Figura 32: Perfil cromatográfico (HPLC) mostrando o pico de patulina (211 $\mu\text{g/Kg}$) obtido usando-se detector de UV ($\lambda=276\text{nm}$) para a amostra de suco clarificado de maçã em garrafa PET inoculado com <i>B.fulva</i> IOC 4518 após 14 de incubação à 30°C.....	264
Figura 33: Análise espectral 3D da patulina através do programa HP com software ChemStation [®] e varredura de arranjo de diodos (DAD).....	265
Figura 34: Perfil cromatográfico do padrão de patulina (1,2 $\mu\text{g/mL}$) ($\lambda=270\text{nm}$ – DAD).....	266
Figura 35: Perfil cromatográfico da amostra 14592 ($\lambda=270\text{nm}$ – DAD).....	266
Figura 36: Perfil cromatográfico do padrão de patulina (1,2 $\mu\text{g/mL}$) ($\lambda=276\text{nm}$ – DAD).....	266
Figura 37: Perfil cromatográfico da amostra 14592 ($\lambda=276\text{nm}$ – DAD).....	267
Figura 38: Perfil cromatográfico do padrão de patulina (1,2 $\mu\text{g/mL}$) ($\lambda=280\text{nm}$ – DAD).....	267
Figura 39: Perfil cromatográfico da amostra 14592 ($\lambda=280\text{nm}$ – DAD).....	267

Figura 40: Perfil cromatográfico do padrão de patulina (1,2µg/mL) ($\lambda=280\text{nm}$ – UV).....	268
Figura 41: Perfil cromatográfico da amostra 14592 ($\lambda=280\text{nm}$ – UV).....	268
Figura 42: Curvas experimentais de sobreviventes de <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C.....	273
Figura 43: Determinação do valor de “a” para <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã à 85°C.....	274
Figura 44: Curvas de sobreviventes linearizadas de <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C.....	275
Figura 45: Curva de resistência térmica de <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix.....	277
Figura 46: História térmica dos processos térmicos.....	280
Figura 47: Probabilidades de crescimento de <i>B.fulva</i> IOC 4518 em suco clarificado de maçã estocado à 21°C (A) e 30°C (B) com carga de esporos sobreviventes de $10^0/100\text{mL}$ e à 21°C (C) e 30°C (D) com carga de esporos sobreviventes de $10^1/100\text{mL}$	297
Figura 48: Produção de patulina à 21°C e 30°C por <i>B.fulva</i> IOC 4518 inoculado em suco clarificado de maçã com carga de 10^0 esporos/100 mL.....	304
Figura 49: Produção de patulina à 21°C e 30°C por <i>B.fulva</i> IOC 4518 inoculado em suco clarificado de maçã com carga de 10^1 esporos/100 mL.....	304
Figura 50: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 1, 2 e 3 (sem sobreviventes no suco).....	316
Figura 51: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 4, 5 e 6 com 12 dias de estocagem.....	316
Figura 52: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 7, 8 e 9 com 12 dias de estocagem.....	317
Figura 53: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 10, 11 e 12 com 12 dias de estocagem.....	317
Figura 54: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 13, 14 e 15 com 12 dias de estocagem.....	318
Figura 55: Ajuste da distribuição Lognormal, BetaGeneral e InversaGaussiana aos dados de concentração final de patulina dos cenários 10, 11 e 12, respectivamente.....	318
Figura 56: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 1, 2 e 3.....	321
Figura 57: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 4, 5 e 6.....	321
Figura 58: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 7, 8 e 9.....	321

Figura 59: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 10, 11 e 12.....322

Figura 60: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 13, 14 e 15.....322

ABSTRACT

QUANTITATIVE RISK ASSESSMENT OF PATULIN IN APPLE JUICE

Patulin is a mycotoxin produced by some species from *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssochlamys* ssp genera. *Penicillium expansum* are known by their potential to produce patulin in apples, while *Byssochlamys nivea* and *B.fulva* are recognized by its potential to produce this micotoxin in pasteurized apple juice. Several acute and chronic effects to human health have been attributed to patulin.

This study has quantitatively assessed the risk of levels of patulin to exceed the level established by The World Health Organization – WHO (50ppb) and also was determined the probability of patulin being produced by heat-resistant mold which survived the apple juice pasteurization. Therefore, the following items have been analyzed: i) it was evaluated the occurrence of heat resistant mold and patulin in samples belonging to 5 different lots of apple juice from a factory located in the southeast of Brazil; ii) the ability of patulin production by the strains of *B.fulva* (IOC 4518) and *B.nivea* (ATCC 24008 and FRR 4421) in apple juice stored at 21°C and 30°C (these are average year temperature in the tropical and subtropical regions of Brazil); iii) it was determined which of the three patulin producer strains, *B. fulva* and/or *B.nivea*, was the most heat resistant in apple juice; iv) it was determined the heat resistance (D and Z values) of the most heat resistant patulin producer strain of *Byssochlamys* using thermal death tubes (TDT); v) the effect of the continuous pasteurization system (UHT), simulating the industrial conditions, has been established over the most heat resistant and patulin producer strain of

Byssoschlamys spp; vi) the probability of producing patulin by the most heat resistant strain in clarified apple juice stored at 21°C and 30°C with a survival level post pasteurization process of 10^0 e 10^1 spores/100 mL, has also been established. vii) it has been quantitatively assessed the risk of patulin in clarified apple juice using Monte Carlo simulation, with @Risk software for students (version 4.5). The simulation was carried out with 10000 iterations.

The results showed that the occurrence of heat resistant mold in the apple juice samples examined was low ($<10^0$ esporos/100mL), with the strain *Aspergillus carneus* – IOC 4519 isolated not confirming their heat resistance. The three mold strains studied (*B.nivea* FRR 4421, *B.nivea* ATCC 24008 and *B.fulva* IOC 4518) were able to produce patulin in concentrations that were dependent of spore inocula in apple juice, storage temperature and package type. *B.fulva* IOC 4518 was determined as the most heat resistant strain, surviving to heat shock at 95°C/5 min. D* values at 85°C, 90°C, 92°C and 95°C of 64,58 min; 16,68 min; 6,31 min and 3,10 min, respectively were obtained, while z value was of 7.4°C. The apple juice pasteurization process applied in a *Microthermics* pilot plant showed variability related to the number of decimal reductions caused by the equivalent process when temperature variations were near 1°C. Higher growth probabilities for *B.fulva* IOC 4518 and higher extension of spoilage of apple juice are related to the increase of survival spore level and to storage temperature pos-pasteurization. The patulin production by *B.fulva* IOC 4518 was mainly influenced by storage temperature when survival spores level is elevated (10^1 spores/100mL), with the higher quantities of this mycotoxin being produced at 30°C than 21°C. The risk

assessment model for the apple juice and patulin showed that fruit reception is always the step that more impacted to higher levels of patulin being found in apple juices. However, storage step after pasteurization, when there are heat resistant survivors was responsible for the higher final concentrations, when the storage time increased. Fruit washing, juice filtration and fruit selection, respectively, are the main responsible steps to reduce patulin levels during apple juice processing, while juice pasteurization due to high heat resistance of patulin practically does not presents effects on mycotoxin reduction in the final product. After 10000 iterations, among the 15 scenarios evaluated, only in the scenario number 1 (without mold survival to pasteurization and with low level of patulin concentration in fruits), 2 (without mold survival to pasteurization and with medium level of patulin concentration in fruits), 4 ($10^0/100\text{mL}$ of *B.fulva* IOC 4518 spores survival to pasteurization, with storage temperature at 21°C and low level of patulin in fruits) and 7 ($10^0/100\text{mL}$ of *B.fulva* IOC 4518 spores survival to pasteurization, with storage temperature at 30°C and low level of patulin in fruits) the limit of 50ppb of patulin would not be exceeded for any of iterations, considering medium and maximum values of the final quantity of this mycotoxin. The final distribution of patulin concentration in apple juice best fitted to Betageneral, Lognormal and Inverse Gaussian depending on the concentration on fruit reception, with the mean and the most part of data skewed to the left.

Key-words: Patulin, *Byssochlamys*, quantitative risk assessment, apple juice, mycotoxins.

RESUMO

A patulina é uma micotoxina produzida por fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*. *Penicillium expansum* se destaca por ser potencial produtor de patulina nas maçãs, enquanto *Byssochlamys nivea* e *B.fulva* se destacam pela potencial produção desta micotoxina em sucos de maçãs pasteurizados. À patulina tem sido atribuídos diversos efeitos agudos e crônicos adversos à saúde humana.

No presente estudo determinou-se quantitativamente o risco dos níveis de patulina no suco de maçã ultrapassar o limite de 50ppb estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e a probabilidade de produção da patulina por bolores termoresistentes sobreviventes à pasteurização do produto. Para isto, i) avaliou-se a ocorrência de bolores termoresistentes e patulina em amostras pertencentes à 5 diferentes lotes de suco de maçã provenientes de uma unidade produtora localizada no sudeste do Brasil; ii) avaliou-se a capacidade de produção da patulina por cepas de *B.fulva* (IOC 4518) e *B.nivea* (ATCC 24008 e FRR 4421) em suco de maçã armazenado à 21°C e à 30°C (consideradas temperaturas médias anuais das regiões tropicais e subtropicais do Brasil); iii) determinou-se a cepa *Byssochlamys* produtora de patulina mais termoresistente dentre as três estudadas, em suco de maçã; iv) determinou-se a resistência térmica através do método dos tubos TDT (*thermal death tubes*) da cepa mais termoresistente; v) Estabeleceu-se o efeito da pasteurização em sistema contínuo (UHT), simulando as condições industriais, sobre a cepa de *Byssochlamys* spp mais termoresistente produtora de patulina; vi) determinou-se a probabilidade de produção de patulina pela cepa mais termoresistente produtora de patulina em suco clarificado de maçã

xxviii

variando-se a temperatura de estocagem (21°C e 30°C), com carga remanescente pós-processo de 10^0 e 10^1 esporos / 100 mL e vii) determinou-se quantitativamente o risco da patulina em suco clarificado de maçã a partir de 15 cenários que relacionados a diferentes cargas de esporos sobreviventes e temperatura de estocagem do suco pós-pasteurização, utilizando-se a modelagem de Monte Carlo, feita através do software @RISK versão 4.5 *for students* com 1 simulação e 10000 iterações.

Os resultados revelaram que a ocorrência de bolores termoresistentes nas amostras de suco de maçã é baixa (<10⁰esporos/100mL), com a cepa isolada de (*Aspergillus carneus* – IOC 4519) não sendo confirmada como um bolor termoresistente. As três cepas estudadas (*B.nivea* FRR 4421, *B.nivea* ATCC 24008 e *B.fulva* IOC 4518) foram capazes de produzir a patulina em concentrações que dependeram da carga de esporos inoculada no suco de maçã, temperatura de estocagem e material de embalagem. *B.fulva* IOC 4518 foi determinada como a cepa mais termoresistente, sobrevivendo ao choque térmico de 95°C por 5 min. Valores D* à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C iguais a 64,58 min; 16,68 min; 6,31 min e 3,10 min, respectivamente foram obtidos, enquanto o valor Z foi igual a 7,4°C. O processo de pasteurização do suco de maçã na unidade *Microthermics* mostrou que há variabilidade com relação ao número de reduções causadas pelo processo equivalente ao industrial quando variações na temperatura de processo da ordem de até 1°C são observadas. Maiores probabilidades de crescimento de *B.fulva* IOC 4518 e maior extensão da deterioração no suco de maçã estão relacionadas ao aumento da carga de esporos sobreviventes e temperatura de estocagem pós-processo. A produção de patulina por *B.fulva* IOC 4518 é influenciada principalmente pela temperatura de

estocagem quando a carga de sobreviventes é elevada (10^1 esporos/100mL), com maiores quantidades da micotoxina sendo produzidas à 30°C do que à 21°C. Através do modelo de risco para o suco de maçã e patulina pôde-se concluir que a etapa de recepção é sempre a que mais impactou para que níveis elevados de patulina estejam presentes nos sucos de maçã. Mas, a etapa de estocagem após a pasteurização quando há bolores termoresistentes sobreviventes, foi a responsável pelas maiores concentrações finais de patulina, à medida que se aumentava o tempo de estocagem. As etapas de lavagem, filtração e seleção das frutas, respectivamente, são as responsáveis pela redução nos níveis de patulina durante o processamento do suco, enquanto a pasteurização em virtude da elevada resistência térmica desta micotoxina praticamente não apresenta efeito algum para redução dos níveis da micotoxina no produto final. Após 10000 iterações, dentre os 15 cenários avaliados, somente nos de número 1 (sem sobreviventes à pasteurização e concentração de patulina na matéria-prima na faixa baixa), 2 (sem sobreviventes à pasteurização e concentração de patulina na matéria-prima na faixa média), 4 (10^0 esporos/100mL de *B. fulva* IOC 4518 sobreviventes à pasteurização, com temperatura de estocagem de 21°C e concentração de patulina na matéria-prima na faixa baixa) e 7 (10^0 esporos/100mL de *B. fulva* IOC 4518 sobreviventes à pasteurização, com temperatura de estocagem de 30°C e concentração de patulina na matéria-prima na faixa baixa) o limite de 50ppb de patulina não seria ultrapassado para nenhuma das iterações, considerando-se valores médios e máximos da concentração final desta micotoxina. A distribuição da concentração de patulina no produto final se ajustou às distribuições do tipo Betageneral, Lognormal e Inversa Gaussiana dependendo

da concentração de patulina na recepção das frutas, com a média e a maior parte dos dados se concentrando à esquerda.

Palavras-chave: Patulina, *Byssochlamys*, avaliação quantitativa de risco, suco de maçã, micotoxinas.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

A maçã (*Malus domestica*) é a fruta de clima temperado mais importante comercializada como fruta fresca tanto no mercado internacional quanto no brasileiro. Como 98% da produção desta fruta se concentram na região Sul do Brasil (MELLO, 2004) e pelo fato das variedades *Fuji*, *Gala* e *Golden Delicious*, as mais plantadas no Brasil, terem boas propriedades de frigidificação, permite-se que o mercado consumidor seja abastecido durante os meses subseqüentes ao final da colheita (entressafra) (WOSIACKI et al., 1987). No entanto, para isto, face ao nível de exigência do consumidor brasileiro, há adoção de um procedimento agroindustrial de beneficiamento rigoroso que desqualifica cerca de 30% da produção, compreendendo as denominadas maçãs industriais e o descarte propriamente dito (NOGUEIRA, PHOLMAN e WOSIACKI, 2004), sendo as maçãs industriais utilizadas para o processamento de sucos, sidra e vinagre.

Há muito tempo se sabe que algumas espécies de *Penicillium*, particularmente *P.expansum*, são comuns agentes deteriorantes de frutas estocadas, como maçãs e pêras (HARWING et al., 1973) causando a deterioração conhecida como “podridão azul” e sendo capaz de produzir patulina sob temperaturas de refrigeração (4°C) (TANIWAKI, BLEINROTH e DE MARTIN, 1989), uma micotoxina que representa um perigo potencial à saúde humana por seus efeitos agudos e crônicos (HASAN, 2000).

Nos processos industriais, a seleção pode ser considerada uma etapa capaz de reduzir os níveis de patulina no produto final, por impedir a entrada de frutas com altos níveis de contaminação por esta micotoxina (SYDENHAM *et al.*, 1995). No entanto, o corte de partes das frutas apodrecidas, pode não ser suficiente para exclusão da patulina da fruta, já que a toxina pode migrar para partes sãs e prevalecer durante o processamento (TANIWAKI *et al.*, 1992). Como esta micotoxina não é eliminada durante o processo de fabricação do suco de maçã, se elevados níveis estão presentes nas matérias-primas, elevados níveis poderão estar presentes nos produtos finais, dentre eles, o suco de maçã (HARRISON, 1989).

Diversos estudos foram realizados com o intuito de controlar ou reduzir a presença de patulina nos sucos de maçã nas etapas pré-processamento do suco ou durante a produção. No entanto, conforme focado por Moake, Padilla-Zakour e Worobo (2005), inexistem trabalhos cujos objetivos tenham sido avaliar a capacidade de sobrevivência à pasteurização de espécies fúngicas, como algumas de *Byssochlamys spp*, e produção de patulina durante a estocagem e comercialização dos sucos de frutas, ou seja, produção desta micotoxina nas etapas pós-processamento. Se isto for confirmado, as medidas de controle deverão não somente considerar a redução da patulina por si só, mas também a inibição do crescimento e produção da patulina no suco embalado.

Pela combinação de fatores como carga de ascósporos de fungos termoresistentes presentes na matéria-prima (suco concentrado) e temperatura de estocagem e comercialização do suco pronto para beber, pode-se avaliar a probabilidade de sobrevivência à pasteurização, crescimento e produção da patulina por espécies pertencentes ao gênero *Byssochlamys spp*, utilizando-se modelos

preditivos de inativação térmica e probabilísticos para determinação do risco de produção desta micotoxina no suco de maçã.

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS GERAIS

- Determinar quantitativamente o risco do nível de patulina ultrapassar o limite recomendado internacionalmente (50 µg/L) no suco clarificado de maçã utilizando-se a modelagem de Monte Carlo feita através do software @RISK, desde a matéria-prima até o produto final, considerando diferentes cenários de riscos;
- Determinar a probabilidade de produção da patulina por bolores termoresistentes (*B.fulva* e/ou *B.nivea*), capazes de sobreviverem ao processo de pasteurização aplicado ao suco de maçã, durante a estocagem e distribuição, considerando-se duas condições possíveis de temperatura (21°C e 30°C) de estocagem.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da ocorrência de bolores termoresistentes e patulina em amostras pertencentes à 5 diferentes lotes de suco de maçã provenientes de uma unidade produtora localizada no sudeste do Brasil;
- Avaliação e confirmação da capacidade de produção da patulina por cepas de *B.fulva* e *B.nivea* em suco de maçã armazenado à 21°C e à 30°C;

- Determinação da cepa *B. fulva* e/ou *B.nivea* produtora de patulina mais termoresistente em suco de maçã;

- Determinação dos parâmetros cinéticos de inativação térmica através do método dos tubos TDT da cepa mais termoresistente produtora de patulina;

- Estabelecimento do efeito da pasteurização em sistema contínuo (UHT), simulando as condições industriais, sobre a cepa de *B.fulva* e/ou *B.nivea* mais termoresistente produtora de patulina;

- Determinação da probabilidade de produção de patulina pela cepa mais termoresistente produtora de patulina em suco clarificado de maçã variando-se a temperatura de estocagem (21°C e 30°C), com carga remanescente pós-processo de 10^0 e 10^1 esporos / 100 mL;

- Avaliação quantitativa do risco da patulina em suco clarificado de maçã utilizando-se a modelagem de Monte Carlo, feita através do software @RISK.

CAPÍTULO 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção e Comércio da Maçã no Brasil e no Mundo:

A produção mundial de maçã (*Malus domestica*, Borkh.), no triênio 2003-2005, ficou em torno de 60 milhões de toneladas, mesmo valor observado no triênio 1999-2001. A China é atualmente o maior produtor mundial (39,1%), sendo seguida pelos Estados Unidos da América (7,3%), pela Turquia (4,1%), Irã (4,0%) e Polônia (3,9%). O Brasil com uma produção média de 886 mil toneladas (t) da fruta ocupou o 13^o lugar em importância no período 2003-2005 (PEREZ, 2006).

O cultivo da macieira é recente no Brasil e se estabeleceu por meio de grandes empresas atraídas por incentivos de políticas públicas. A produção brasileira de maçã está concentrada na Região Sul, que é responsável por 98% da produção nacional. A produção que era de apenas 1.528 t em 1974, passou a 842.256 t de maçã na safra 2002/2003. Deste total, 475.095 t foram provenientes do Estado de Santa Catarina e 375.095 t do estado do Rio Grande do Sul. A área plantada que era de 931ha em 1972, passou a 31.701ha em 2003, sendo as maiores áreas de plantio por ordem decrescente estando localizadas respectivamente, em Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo (MELLO, 2004). Apesar disto, segundo Perez (2006), a oferta crescente a preços decrescentes de frutas produzidas nas zonas irrigadas no Nordeste brasileiro vem proporcionado forte concorrência às frutas do Sul e Sudeste, limitando sua expansão de demanda e produção.

O Brasil, maior produtor mundial de laranjas, exportadas sob a forma de sucos concentrados, se direciona a ocupar também um lugar de destaque no cenário mundial com relação a frutas de clima temperado, em especial com a maçã (WOSIACKI, 1989). A safra brasileira de maçãs de 2007, será cerca de 25% maior que a de 2006, com uma colheita de 821 toneladas. A maior parte (65%) da produção brasileira é destinada ao consumo interno, para o comércio “in natura”, enquanto os outros 20% vão para a industrialização, principalmente de sucos concentrados, sendo o principal importador deste, os Estados Unidos que absorve 90% do total, com o restante sendo absorvido pelo mercado europeu (WILKE, 2007). A comercialização de maçãs no Brasil apresenta alguns aspectos curiosos: no início da safra, frutas de qualidade inferior são destinadas a cidades menores e à população de menor poder aquisitivo, os quais são receptivos a produtos de menor qualidade. Frutas de alta qualidade são refrigeradas e estocadas sob atmosfera controlada ou refrigeração convencional até se obterem os melhores preços de mercado, quando são então comercializadas continuamente durante o ano. Estas maçãs de qualidade superior são destinadas a mercados altamente exigentes (WOSIACKI, DEMIATE e CHERUBIN, 1995).

Ao se considerar compra e venda da fruta, constata-se que as exportações mundiais tiveram uma variação positiva de 37,5% (aumento de 3,8 para 5,3 milhões de toneladas), comparando-se os valores médios dos períodos 1989-1993 e 1999-2000. Os quatro países classificados como os maiores exportadores da fruta entre 1989-1993 mantiveram sua posição entre 1999-2000, a saber: França (16,0% e 14,9%, respectivamente), Estados Unidos (13,3% e 12,3%), Itália (9,0% e 10,9%) e Chile (9,5% e 9,2%). O Brasil, assim como a China, teve grande expansão da produção de maçã,

no período considerado, com seu papel no comércio internacional aumentado de 0,4% para 1,2%, graças ao incremento de 339,44% em suas quantidades exportadas, entre 1989-1993 e 1999-2000 (GONÇALVEZ *et al.*, 1996). Já as importações mundiais de maçã evoluíram de cerca de 3,9 milhões de toneladas, em 1989-1993, para 4,8 milhões em 1999-2000 (variação de 22,25%), com Alemanha, Reino Unido, Holanda e Bélgica sendo os quatro maiores importadores mundiais. Os principais países que tiveram participação crescente nas importações da fruta foram: Espanha (3,7% e 4,6%), Rússia (2,0% e 3,8%), México (1,1% e 3,4%) e China (2,4% e 3,4%). O Brasil, em função do seu processo de substituição de importações, reduziu de 106.565 toneladas, em 1989-1993, para 55.206 toneladas, em 1999-2000, suas compras de maçã no mercado internacional, reduzindo sua participação de 2,7% para apenas 1,2% do total.

Além de crescer significativamente, durante a década de 90, as exportações brasileiras de maçã também se diversificaram. Se em 1991 o Brasil exportou 97% dessa fruta para Holanda (58,5%) e Reino Unido (38,5%), restando apenas 3,0% para outros destinos, em 2001, 35% da quantidade exportada destinou-se a outros países, como: Holanda (54,82% das exportações brasileiras), Reino Unido (10,51%), Alemanha (8,05%), Bélgica (6,92%), Irlanda (4,99%), Espanha (4,09%) e mais Noruega, Portugal, Itália, França e Suécia (com participações entre 0,96% e 2,43%) e outros (GONÇALVEZ *et al.*, 1996).

O consumo alimentar domiciliar per capita anual de maçã, no Brasil, aumentou 34% de 1987 a 1996, passando de 2,176kg para 2,907kg (PEREZ, 2006) e atingindo 4,6 Kg per capita em 2003, sendo um consumo considerado ainda baixo ao se comparar com países como Áustria (32,8 Kg), Turquia (71,7 Kg) e Bélgica (28,7 Kg).

Países do Mercosul como Argentina e Chile, apresentam um consumo mais elevado do que o Brasil, tendo respectivamente um consumo de 11 Kg e 6,5 Kg per capita (MELLO, 2004).

3.2. A Maçã e os Seus Principais Cultivares:

A Maçã (*Malus domestica*, Borkh.) pertence à família *Rosaceae* e tem sua origem na Europa e Ásia. A macieira é uma árvore que chega a 10 metros de altura, com tronco de casca parda e lisa e copa arredondada, flores brancas ou róseas, aromáticas. O fruto apresenta-se globoso ou deprimido com uma profunda depressão no ponto de inserção da haste que o prende aos ramos; de coloração vermelha ou verde, podendo apresentar pequenas manchas esverdeadas ou amareladas, tem seu período de safra entre fevereiro a abril. O cultivo da maçã exige clima temperado, solo sílico-argiloso e profundo (TODA FRUTA, 2003), sendo a fruta de clima temperado mais importante comercializada e cultivada como fruta fresca tanto no mercado internacional quanto no brasileiro (MELLO, 2004). As macieiras de um ou outro cultivar são cultivadas ao redor do mundo, mas estão principalmente concentradas no hemisfério norte. Em torno de 95% de todas as maçãs cultivadas, com algumas exceções devido a presença de microclimas isolados, são encontradas entre 35°N e 50°N e entre 30°S e 45°S de latitude (ROOT e BARRET, 2003).

Apesar de existirem centenas de cultivares diferentes, cinco deles, respondem pela maior parte da produção mundial: *Red Delicious*, *Golden Delicious*, Gala, Fuji e *Granny Smith* (ROOT e BARRET, 2005). No Brasil, a produção é dominada por três cultivares: Gala, Fuji e *Golden Delicious*. A cultivar Gala é a primeira a ser colhida, em

fevereiro, representando 46% da produção total; a Fuji, cuja colheita se dá em abril, é a mais resistente a conservação sob refrigeração, participando com 45% da produção e a *Golden Delicious*, colhida em março, representa 6% da produção total, sendo os 3% restantes compostos por outros cultivares (MELLO, 2004).

De acordo com Tsumeta e Havagge (1985) citado por Wosiacki *et al.* (1987), as cultivares de maior importância no Brasil apresentam as seguintes características:

FUJI: Fruto de tamanho médio a grande, porém, a cultivar apresenta acentuada diferença de calibre entre os frutos inseridos nos diversos tipos de ramos frutíferos. Esta característica acentua-se em regiões de clima quente. Sua forma é arredondada. Porém, por condições climáticas, no Estado do Paraná, apresenta-se achatada. A epiderme é de cor vermelha, ligeiramente rajada, fundo amarelado. A polpa é de cor amarela, suculenta, crocante, doce e muito firme. A sua capacidade de conservação é muito boa;

GALA: Fruto de tamanho médio a pequeno: uniforme. A forma é arredondada, e nos frutos de maior tamanho, tendendo a ser cilindro-cônicos. Epiderme de coloração vermelha. Ligeiramente estriada, de fundo amarelo e lenticelas pequenas. Têm surgido mutações de cor vermelha intensa. Polpa de coloração amarela, firme, crocante, suculenta, doce e medianamente perfumada. A capacidade de conservação é regular, com tendência ao murchamento dos frutos nas condições de ambiente natural;

GOLDEN DELICIOUS: Fruto de tamanho médio a grande, uniforme, forma cilindro-cônica. A epiderme é fina, de cor amarelo-esverdeada, com alta susceptibilidade ao “*russetting*” (ruivamento). A polpa é branca, levemente creme, macia, doce e suculenta. Comercialmente, tem encontrado certa restrição, tendo em

vista que a cor amarela da epiderme não é da preferência dos consumidores brasileiros. Ocorre o rápido amolecimento da polpa, em regiões de temperatura elevada, ocasião que os defeitos acentuam-se.

De acordo com Treptow, Queiroz e Antunes (1995) os cultivares Gala, *Golden Delicious* e Fuji apresentam uma acidez total titulável (% de ácido málico), em torno de 0,34%, 0,29% e 0,21%; um teor de sólidos solúveis em torno de 12,86, 16,73 e 13,73°Brix e pH em torno de 3,58, 3,75 e 3,81 respectivamente. Para finalidades industriais, as maçãs podem ser classificadas pelo ratio dos açúcares totais e acidez titulável e quanto mais baixa esta razão, mais interessante a variedade passa a ser visando processos industriais, pois refletem altos teores de ácido málico (CZELUSNIAK *et al.*, 2003). O valor 20/25 pode ser usado com certa parcimônia como limite para a discriminação dos cultivares industriais, mais ácidos, dos meramente comerciais, mais doces (WOSIACKI, PHOLMAN e NOGUEIRA, 2004).

3.3. Classificação das Maçãs:

As maçãs podem ser classificadas em comerciais ou industriais, de acordo com seu uso pretendido. As maçãs comerciais são cultivadas com o intuito de serem consumidas frescas e, portanto, devem atender a padrões rígidos de qualidade. Segundo Chagas (1994), as maçãs são classificadas baseando-se em três parâmetros de qualidade definidos: cor (“esverdeadas” ou “avermelhadas”), tamanho (divididas em 10 categorias baseando-se na dimensão horizontal das frutas, o qual pode variar de 100 mm – classe “A” – à 50 mm – classe “J”) e presença de defeitos (“extra”, “especial” e “comercial”, de acordo com imperfeições no tamanho, forma e cor e presença ou não

do pedúnculo) (WOSIACKI, NOGUEIRA e SILVA, 2000). No Brasil, pomares com finalidades industriais praticamente não existem e as frutas chamadas industriais são resultantes de um eficiente processo de seleção e classificação das frutas comerciais. Até 30% da safra das maçãs beneficiadas para venda e consumo *in natura* se caracterizam como descarte comercial. Deste percentual, 1/3 corresponde a frutas com doenças ou apodrecidas, total ou parcialmente, que necessariamente devem ser expurgadas de qualquer processo agroindustrial. Os 20% de frutas que não se prestam à comercialização, principalmente pelo exigente mercado brasileiro, são as maçãs atualmente denominadas de industriais. Há alguns anos eram denominadas de “quebra de safra”, e compreendem as frutas com defeitos relacionados a peso, tamanho, formato, cicatrizes, distribuição de coloração da casca, entre outros, que inibem o processo de compra no varejo. Essas frutas, conquanto inadequadas para o comércio, mantêm suas propriedades intrínsecas com relação aos indicadores de qualidade como teores de açúcar, ácidos e de compostos fenólicos, podendo ser interessantes para o uso industrial, na fabricação de suco, vinagre, sidra e demais produtos derivados da maçã. Se para o mercado consumidor da fruta *in natura*, as maçãs devem ter características como boa aparência e boa aceitação com relação aos aspectos sensoriais, como sabor agridoce e características de adstringência, as frutas industriais devem ser classificadas por suas características físico-químicas, como elevados teores de açúcar, de ácidos e de compostos fenólicos (SANTOS *et al.*, 2005).

Como a maior parte das maçãs são destinadas para o mercado de frutas frescas, o volume disponível para o processamento de derivados, depende da demanda do mercado de frutas frescas e da qualidade da safra de maçã da época. Como resultado,

aquelas maçãs a serem processadas são selecionadas e estocadas da mesma maneira que as frutas destinadas ao mercado de frutas frescas. Algumas vezes, no início da safra, as frutas podem ser estocadas à atmosfera ambiente, sem a utilização de refrigeração. Este tipo de estocagem é de curto tempo e limitada às plantas com capacidade imediata de processamento (ROOT e BARRET, 2005). Este fato pode levar a utilização de maçãs mais susceptíveis à deterioração (cicatrizes externas) ou contaminadas internamente e não aceitas pelo controle de qualidade, o que pode comprometer as suas qualidades físico-química, sensorial, microbiológica e micotoxicológica.

3.4. A Podridão Azul e a Qualidade das Maçãs:

Antes e após a colheita, as maçãs são susceptíveis a diversas doenças e/ou desordens causadas por variados agentes que podem levar a redução da produtividade, utilização condicional ou perda total das frutas. As doenças podem ser associadas às folhas, árvores ou frutos, podendo ser causadas por fungos e bactérias; as desordens podem ser causadas por fatores ambientais (por exemplo, injúria pelo frio); as injúrias podem ser causadas pela aplicação imprópria de nutrientes ou pesticidas ou pela falta de algum nutriente específico (CLARKE, 2003). Independente dos agentes causadores das desordens e injúrias, os frutos se tornam mais susceptíveis ao ataque de fungos. Dentre as doenças associadas à maçã, a podridão azul ("*blue rot*"), causada por *P.expansum*, é o mais comum e usualmente o mais destrutivo de todas as podridões que afetam frutas como maçãs, pêras e marmelos, seja durante o transporte, estocagem ou no mercado, não sendo importante como uma

doença de pomar. A podridão azul é raramente encontrada nas frutas quando estas estão nas árvores, a não ser que tenham sido atacadas por insetos, granizo ou outros agentes produtores de lesões superficiais. Sob clima muito úmido, a doença normalmente ocorre em frutas caídas no solo (PIERSON, CEPONIS e McCOLLOCH, 1971). A doença também desperta grande preocupação pelo fato deste fungo ser o principal produtor da patulina. A podridão azul aparece como áreas moles, claro-amarronzadas e úmidas que começam ao redor das injúrias ou lenticelas na superfície da fruta. As frutas infectadas têm odor e gosto mofados e quando a umidade relativa é alta, massas cinzas-azuladas de esporos aparecem na superfície das frutas. Estes esporos são importantes na disseminação da doença, pois são muito resistentes à secagem e podem sobreviver na superfície dos equipamentos de colheita e embalagem, na água usada para descarregamento dos bins ou caixas de frutas, soluções de encharque pós-colheita e nos canais de água usados para transportar as frutas. Sob condições favoráveis, a fruta inteira pode apodrecer em 2 semanas quando afetada pela podridão azul (TRAVIS e RYTTER, 2003).

O solo é o principal reservatório dos esporos dos fungos, que podem sobreviver de estação para estação nas caixas de colheita, bins contaminados e nas paredes das câmaras de estocagem. O ciclo da doença é mantido pelas injúrias causadas nas frutas, especialmente durante as operações de colheita e manuseio, que são os pontos primários de entrada do fungo. A invasão das lenticelas das frutas que estão muito maduras no momento da colheita ou frutas que são estocadas por longos períodos, são também causas da manutenção do ciclo da doença (TRAVIS e RYTTER, 2003). A manipulação cuidadosa das frutas, sanitização das instalações (incluindo bins, caixas

de transporte e paredes das câmaras frigoríficas), pronto resfriamento das frutas a temperaturas de estocagem sob refrigeração e a colheita das frutas nas condições ótimas de maturidade são medidas para o controle da podridão azul. A redução da carga de esporos é de grande importância e pode ser obtida pela rígida higienização das instalações e pela lavagem das frutas com fungicidas, devendo, no entanto, levar-se em conta que são somente tratamentos suplementares à manipulação cuidadosa, rápido resfriamento das frutas e sanitização das instalações (PIERSON, CEPONI e McCOLLOCH, 1971; TRAVIS e RYTTER, 2003). O controle da podridão azul e de outras doenças e injúrias que comprometem a qualidade das maçãs nos diversos estágios de produção tem sido a preocupação de produtores ao redor de todo o mundo. O Brasil, após a implementação da Produção Integrada de Maçã (PIM), atingiu um novo patamar de produção com foco na melhoria da qualidade, na segurança alimentar e na preservação ambiental, atendendo as exigências de um consumidor mais consciente. O programa começou a ser elaborado em 1996, pela Embrapa Uva e Vinho diante da constatação da crescente exigência dos mercados consumidores por produtos mais “limpos” e por sistemas de produção menos agressivos ao ambiente (MELLO, 2004). Apesar de ter como principal foco e objetivo o controle da utilização de agroquímicos (GIRARDI e BENDER, 2003), o PIM também estabelece algumas normas para colheita (boas práticas agrícolas) e pós-colheita (maturação das frutas, condições de tempo, temperatura, umidade relativa, atmosfera durante o armazenamento frigorificado – apresentadas no item 1.6.1) com o intuito de garantir a conservação e qualidade da fruta.

3.5. Produção e Comércio do Suco de Maçã no Brasil e no Mundo:

O mercado de sucos de frutas prontos para beber vem apresentando crescimento anual médio acima de 10%. O aumento do consumo destes produtos se deve à busca por alimentos mais saudáveis e pelo aumento do poder aquisitivo da população, sendo os maiores índices de penetração observados nos domicílios com nível sócio-econômico médio e baixo (ACNIELSEN do BRASIL, 2006). O mercado brasileiro de sucos de frutas pronto para beber é dominado por quatro principais empresas que respondem por aproximadamente 40% do mercado (VALOR ECONÔMICO, 2006). Os sabores mais consumidos no Brasil são o suco de laranja, manga, uva, maracujá e pêsego. No exterior, o suco de laranja é o mais consumido (equivalendo a 39,9% do mercado), seguido do suco de maçã, com consumo correspondente a 25,4% do mercado (REFRIBRASIL, 2006). Estima-se que a ingestão em g / pessoa / dia de suco de maçã no Brasil seja em torno de 0,7, enquanto em países como Finlândia, Suécia e Noruega este valor chega a 7,4 (GEMS/WHO, 2003). Em números, em 2006, cerca de 35 milhões de litros de bebidas à base de maçã foram produzidas no Brasil, englobando sucos e néctares (27%) e bebidas de soja (69%) (GOMES, 2007, comunicação pessoal¹).

No que concerne ao suco concentrado de maçã, a produção mundial atingiu um patamar de aproximadamente 1,26 milhões de toneladas métricas no período 2005 / 2006. Os três maiores produtores mundiais são a China, Polônia e Estados Unidos, respectivamente. Enquanto a China é o maior exportad¹or do produto, os Estados Unidos e Alemanha são os maiores imp¹ortadores (FAS/USDA, 2006). No Brasil, o suco

¹ Rodrigo Gomes (comunicação pessoal), 2007.

de maçã que não registrava exportações no início dos anos 90, passou a ser a partir de 1995 o segundo item de exportação no grupo dos sucos, superando as exportações de suco de uva (BNDES, 2000). Em 2004 as exportações deste produto corresponderam a aproximadamente 30 mil toneladas e em 2005, este valor foi de 34 mil toneladas (MAPA, 2005; TODA FRUTA, 2006). Com relação à acidez do suco, dois diferentes tipos são fabricados a nível mundial: o suco de menor acidez e o de maior acidez, o qual tem maior demanda de mercado pela preferência dos consumidores. O suco de menor acidez tem um preço no mercado externo mais depreciado frente ao suco de mais alta acidez (BRAUN, 2003). Como no Brasil, o suco produzido corresponde aquele de menor acidez, é comum na prática industrial, ocorrer à mistura de sucos de baixa e alta acidez para fabricação dos sucos prontos para beber.

3.6. O Suco de Maçã:

O *Codex Alimentarius* define “suco de fruta” como o líquido não fermentado, mas fermentescível, obtido da parte comestível da fruta sã, apropriadamente madura e fresca ou da fruta mantida em condição adequada por meios disponíveis, incluindo tratamentos pós-colheita aplicados de acordo com as diretrizes do *Codex Alimentarius Commission*. Os sucos de frutas podem ser obtidos de diferentes maneiras: suco de fruta diretamente extraído da fruta, suco da fruta reconstituído de um suco concentrado, suco de fruta concentrado, suco de fruta extraído por água, purê de fruta para uso na fabricação de sucos ou néctares, purê concentrado para uso na fabricação de néctares ou sucos da fruta, néctar da fruta (CODEX, 2005).

A maçã é uma das frutas que oferecem as mais promissoras perspectivas para a industrialização, uma vez que apresenta características favoráveis e dela podem ser obtidos muitos produtos de boa aceitação. Diversos produtos são obtidos a partir da maçã, como suco, sidra, vinagre e alimentos infantis (“*baby foods*”). Dentre estes, todavia, o suco de maçã, é o produto derivado mais popular e apresenta grande importância comercial para alguns países, além de ser fonte de diversos componentes como antioxidantes (LU e FOO, 2000) ditos benéficos à saúde humana.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000 (BRASIL, 2000) define o suco de maçã como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da maçã (*Malus domestica*), através de processo tecnológico adequado. A bebida deve possuir cor branca a translúcida, sabor próprio e aroma próprio. Com relação à composição físico-química, o suco de maçã deve ter um teor de sólidos solúveis (°Brix, a 20°C) mínimo de 10,5; acidez total expressa em ácido málico mínima de 0,15 g / 100 g; açúcares totais naturais da maçã máxima de 13,5 g / 100 g e acidez volátil em ácido acético máxima de 0,04 g / 100g.

O suco de maçã pode ser processado e comercializado em muitas formas. O suco fresco ou “*sweet cider*” é considerado ser o produto da fruta sã, madura e que foi prensada e engarrafada ou embalada sem a utilização de nenhuma forma de preservação, a não ser a refrigeração. Este tipo de suco é muito comum nos Estados Unidos da América e é normalmente comercializado em pequenas lojas ou mercado à beira das estradas e não muito distante dos locais de produção. Ao redor do mundo, o suco de maçã fermentado é conhecido como “sidra” e é normalmente fermentado à

gravidade específica menor ou igual à 1. O suco de maçã estável durante sua vida de prateleira, tem sido tratado por diferentes métodos de conservação e pode estar presente sobre diferentes estilos: suco clarificado, suco não clarificado, suco concentrado congelado (clarificado ou não, com aproximadamente 42°Brix) e suco concentrado de alto² teor de sólidos solúveis (70°Brix), é normalmente clarificado. Nos Estados Unidos, o tipo mais popular do suco de maçã é o clarificado (ROOT e BARRET, 2005), enquanto no Japão é o suco não clarificado o mais preferido (SECOM, 2006). No Brasil, apesar do consumo ser ainda pequeno, em torno de 3 litros per capita (WOSIACKI, 2006; comunicação pessoal²), a grande maioria das empresas produtoras, fabricam o suco não clarificado.

3.7. O Processo de Fabricação do Suco de Maçã:

O suco pasteurizado de maçã pronto para beber pode ser obtido ou a partir das frutas recém processadas ou a partir da reconstituição do suco concentrado até o teor de sólidos solúveis desejado. Na *Figura 01* é apresentado o fluxograma do processo de produção e uma descrição básica das etapas de fabricação é feita a seguir. Após serem colhidas manualmente ou mecanicamente, as maçãs são transportadas em bins ou caixas para a indústria ou são destinadas para o armazenamento. A estocagem pode ser feita de três maneiras: sob refrigeração, atmosfera controlada e a chamada estocagem aberta (*deck storage*), a qual deve se restringir àquelas indústrias com capacidade para rápido processamento das frutas.

² Gilvan Wosiacki: comunicação pessoal, 2006.

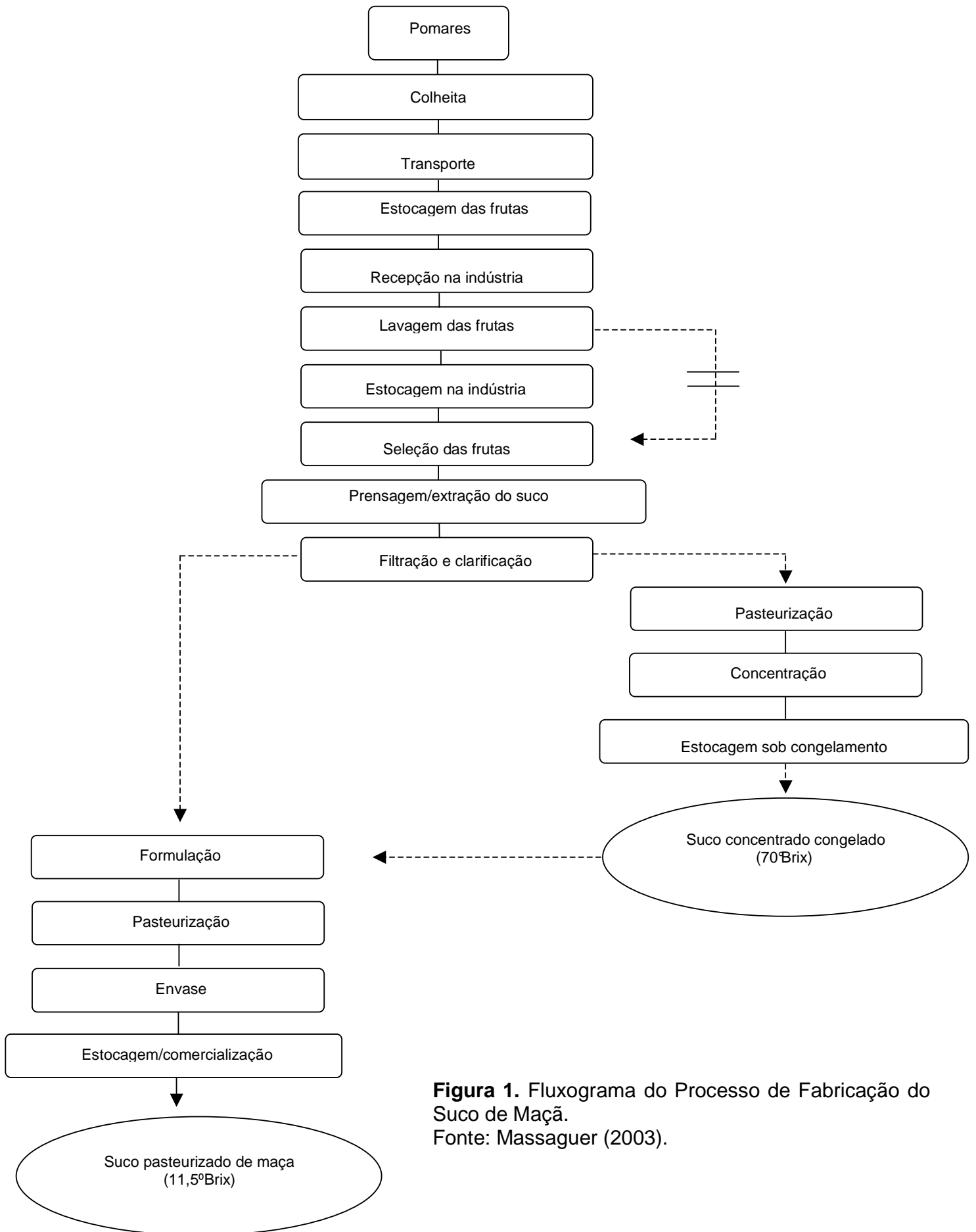


Figura 1. Fluxograma do Processo de Fabricação do Suco de Maçã.
 Fonte: Massaguer (2003).

A estocagem das frutas deve ser feita em até 18 h após a colheita, sendo as condições variáveis de acordo com a variedade (CODEX, 2003b). Nas *Tabelas 1 e 2* são apresentadas algumas condições indicadas para o armazenamento das maçãs variedades Gala, Fuji e Golden Delicious (as mais importantes economicamente no Brasil), sob refrigeração e sob atmosfera controlada. Antes da entrada das frutas nas câmaras, é comum utilizar-se agentes antioxidantes (como difenilamina), para prevenir problemas fisiológicos e fungicidas, para prevenir o crescimento de bolores durante a estocagem das frutas (SWINDEMAN, 2002).

Tabela 1: Condições Indicadas para Estocagem Refrigerada de alguns cultivares de Maçãs*.

Cultivares	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Período de Armazenamento (meses)
Gala (todos os cultivares)	0	94 a 96	4 a 5
Fuji	-1 a 0	92 a 96	6 a 7
Golden Delicious	0	94 a 96	5 a 6
Red Delicious	0	95	3
Granny Smith	0	95	3-4

*De acordo com Girardi e Bender (2003), Faragher (2000) e Watkins, Kupferman e Rosenberger (2002).

Tabela 2: Condições Indicadas para Estocagem sob Atmosfera Controlada de algumas variedades de Maçãs*.

Cultivar	Temperatura (°C)	Nível ótimo de O ₂ (%)	Nível ótimo de CO ₂ (%)	Umidade Relativa (%)	Período de Armazenamento (Meses)
Fuji	1	2.0	0.5	92	12
Gala (todos os cultivares)	0-0.5	1.5	1.5	92 a 95	8
Golden Delicious	-0.5 a 2.0	1.0 a 2.5	1.0 a 4.5	> 92	6 a 10
Red Delicious	-0.5 a 0.5	1 a 2.5	1 a 4.5	90 a 95	6 a 10
Granny Smith	-0.5 a 1	1 a 2	0.5 a 2	90 a 95	6 a 11

*Adaptado de Girardi and Bender (2003) and Kupferman (2001).

Após a estocagem, as frutas são transportadas para a indústria onde o conteúdo dos bins ou caixas é descarregado em tanques de água (onde há a flotação das frutas infectadas por fungos, que são removidas) e transportado para as esteiras de lavagem. As frutas são lavadas com o auxílio de jatos de água para a remoção de resíduos de solo e materiais estranhos (ROOT e BARRET, 2005), sendo em alguns casos, utilizadas também escovas para remover partes apodrecidas e sujidades mais aderidas.

Caso ocorra uma breve estocagem na indústria produtora do suco até que as frutas possam ser processadas, esta deve ser feita pelo menor período possível, num tempo não maior que 24 h após sua retirada da refrigeração (CODEX, 2003b).

Na etapa de seleção, as frutas apresentando-se lesionadas ou apodrecidas podem ser inteiramente descartadas ou então ter aproveitamento condicional, através do corte das porções comprometidas (ROOT e BARRET, 2005). Antes da prensagem, as maçãs são moídas para redução do tamanho da matéria-prima, de tal maneira que a pressão na operação seguinte possa ser efetiva. A diminuição de tamanho tem como pressuposto fundamental a manutenção da estrutura tissular, a fim de que quando o material seja prensado, o suco possa percolar através da massa ralada que passa a ser um coadjuvante do processo de extração de um produto claro e límpido. Na etapa de prensagem, a máxima quantidade de sólidos solúveis é retirada da massa ralada, através do uso de prensas verticais, horizontais ou de prensas em esteiras (WOSIACKI e NOGUEIRA, 2005), sendo comum a adição de ácido ascórbico neste momento para prevenir o escurecimento enzimático (RUTLEDGE, 1996).

A clarificação inclui o tratamento enzimático de despectinização e o acabamento, com a retirada dos compostos que prejudicam a boa aparência do produto final (WOSIACKI e NOGUEIRA, 2005). As preparações enzimáticas são adicionadas para quebrar parcial ou totalmente substâncias responsáveis pela turbidez no suco, como pectina, amido, gomas, proteínas, polifenóis, cátions metálicos e lipídeos (RUTLEDGE, 1996). O refino ou acabamento pode ser feito com materiais como gelatina, sílica sol, caolim, carvão ativo, ácido péctico, polivinilpirrolidona e bentonita (WOSIACKI e NOGUEIRA, 2005), que são misturados no suco para retirada dos materiais em suspensão provenientes da atividade enzimática, sendo a clarificação finalizada pela

filtração, feita com o auxílio de agentes filtrantes, como terra diatomácea ou mais recentemente pelo uso da ultrafiltração (WOSIACKI e NOGUEIRA, 2005; ROOT e BARRET, 2005).

Para estocagem durante os meses de entressafra e para comercialização, o suco é concentrado por evaporação ou crio-concentração, preferivelmente a 70-71°Brix e devido à sua sensibilidade ao calor, evaporadores de múltiplo-efeito, com recuperação do aroma, são os mais comumente usados. Embora a baixa acidez e baixa atividade de água do suco concentrado permitam sua manutenção à temperatura ambiente (ROOT e BARRET, 2005), para manutenção da qualidade, o suco é normalmente mantido sob congelamento durante a estocagem e comercialização.

Seja feito a partir do suco recém extraído ou do suco concentrado, a etapa de formulação é utilizada para a fabricação dos néctares, os quais têm em sua formulação uma mistura de suco, açúcar e água (CODEX, 2005), além antioxidantes, como ácido ascórbico e acidulantes, como ácido cítrico (BRASIL, 1988). No caso da fabricação do suco de maçã, o suco concentrado é diluído com água e o aroma de maçã adicionado na mistura final para evitar perdas por evaporação (LEA, 1990). Posteriormente, o suco é desaerado para prevenir o escurecimento devido à reação do O₂ dissolvido com o ácido ascórbico (RUTLEDGE, 1996), sendo comumente pasteurizados em temperaturas entre 90-98°C por poucos segundos. Após o resfriamento, o suco pode ser envasado em embalagens de papel cartonado ou garrafas plásticas ou de vidro, sendo estas estocadas e comercializadas usualmente à temperatura ambiente.

3.8. Microbiologia das Maças e do Suco de Maçã:

A grande preocupação na indústria de sucos ao longo dos anos vinham sendo os microrganismos acidófilos esporulados ou não, como os bolores e leveduras, bactérias lácticas, bolores termoresistentes, *Clostridium pasteurianum* e *Alicyclobacillus spp*, (este último mais recentemente), que podem ser capazes de sobreviver às condições de pasteurização adotadas para o tratamento térmico dos sucos. Alguns destes microrganismos podem também recontaminar o produto após a pasteurização, causando grandes perdas econômicas. Não obstante, em virtude de sua natureza ácida (pH em torno de 3,7), o suco de maçã foi historicamente considerado seguro do ponto de vista microbiológico, já que não havia relatos de contaminação e surtos causados por microrganismos patogênicos. Todavia, a ocorrência de surtos associados aos sucos de frutas com patógenos como *Salmonella spp*, *Escherichia coli* 0157:H7 ou parasitos como *Cryptosporidium parvum* representou uma mudança no padrão dos alimentos veiculadores destes patógenos (SIVAPALASINGAM *et al.*, 2004) e no enfoque dos estudos sobre a microbiologia dos sucos, trazendo o desafio de se avaliar a capacidade de sobrevivência dos microrganismos prejudiciais à saúde em ambientes ácidos e não somente mais na sua capacidade de multiplicação.

A microbiologia das maçãs pode diferir de acordo com a área geográfica, condições climáticas, tratamentos com pesticidas, cultivar e até mesmo em partes diferentes de uma única fruta. Cada etapa incluindo colheita, condições de estocagem e operações de processamento, não somente influenciam o número e tipos de microrganismos, mas a ação requerida para preservação do suco (DOORES, 1983).

As maçãs podem ter sua microbiota derivada de duas fontes: primária e secundária. A microbiota primária ou população residente consiste em microrganismos que geralmente aderem a sua parede celular à superfície das frutas através de forças interativas com a superfície da planta. Esta microbiota é composta principalmente por espécies acidófilas como bactérias acéticas (*Acetobacter* e *Gluconobacter spp*), bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus spp*) e por leveduras fermentativas. Maçãs sãs carregam uma carga de bolores da ordem de 10^3 a 10^5 organismos por fruta, sendo *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor spp* as espécies mais comuns (DOORES, 1983). Os bolores termoresistentes têm como habitat natural o solo de plantações de frutas (PITT e HOCKING, 1999). Apesar de ocorrerem em baixos números nas frutas, os bolores comuns podem se tornar facilmente um grande problema já no início da colheita e durante a estocagem, caso práticas de manipulação para evitar danos nas frutas não sejam empregadas (DOORES, 1983), enquanto os bolores termoresistentes serão um problema para os sucos pasteurizados e comercializados à temperatura ambiente. Segundo dados levantados durante a realização do projeto de “*Segurança Microbiológica de Sucos e Drinks Envasados Asepticamente*” a contaminação por bolores termoresistentes nas frutas encontra-se abaixo de 10^0 esporos/100 g e a de bolores comuns na faixa de 10^3 a 10^5 UFC/g, sendo estes números reduzidos para $<10^1$ UFC/mL após a pasteurização dos suco, o que garante a estabilidade microbiológica destes produtos (Massaguer, 2003).

A microbiota secundária é proveniente de vetores externos de contaminação como solo, poeira, vento, chuva, água de irrigação, insetos, pássaros e roedores, podendo levar a uma variação dramática nos microrganismos presentes na superfície das frutas

não somente de horta para horta, mas também de maçã para maçã (DOORES, 1983). Assim, pode-se concluir que a microbiota presente no suco de maçã será determinada pelo tipo e número de microrganismos presentes nas frutas, higiene do ambiente de fabricação e dos equipamentos.

3.9. Fungos Filamentosos Termoresistentes em Alimentos:

Em geral, as hifas e conídios dos bolores possuem pequena resistência térmica e não são capazes de sobreviverem ao processo térmico aplicado nos derivados de frutas.

Por definição, fungos termoresistentes produzem estruturas, que os permite sobreviver à exposição à 75°C por 30 minutos (SAMSON *et al.*, 2000). Os ascos e ascósporos e estruturas com paredes espessas como clamidósporos, aleurosporos, esclerótios (JESENKÁ, PIECKOVÁ e BERNÁT, 1992; JESENKÁ, PIECKOVÁ e BERNÁT, 1993; JESENKÁ, BERNÁT e PIECKOVÁ, 1994; PIECKOVÁ e SAMSON, 2000), são as mais comuns formas que conferem resistência térmica aos fungos.

Os ascos são estruturas similares a sacos que contém os ascósporos. Neste órgão, a fusão de dois núcleos haplóides ocorre seguida pela meiose, e os ascósporos são produzidos livremente com o protoplasma como unidades individuais (BOOTH, 1969). Os ascósporos são normalmente produzidos em grupos de oito (HOCKING e PITT, 1984). A forma, tamanho e ornamentação dos ascósporos podem variar com o tipo, espécie, cepa do fungo e condições ambientais sob as quais os esporos são formados (TOURNAS, 1994). Os ascos podem estar presentes em grandes números

totalmente dentro de corpos maiores com paredes sólidas (cleistotécios) ou serem circundados por hifas finas e entrelaçadas (gimnostécios). Somente em *Byssochlamys*, os ascos nascem separadamente e livres (HOCKING e PITT, 1984).

Existem diversos relatos na literatura de casos de deterioração de alimentos associados aos bolores termoresistentes em vários países, como Inglaterra (OLLIVER e RENDLE, 1934), Austrália, Estados Unidos, Holanda (TOURNAS, 1994; PITT e HOCKING, 1984), Irlanda (McEVOY e STUART, 1970). A deterioração por bolores termoresistentes é caracterizada pelo crescimento visível do fungo, produção de odor desagradável, sabor ácido, gás, desintegração das frutas, solubilização de amido ou pectina no meio (SPLITTSTOESSER, 1991), culminando com a separação de fases no caso de sucos.

Como a maioria dos ascósporos dos bolores termoresistentes apresenta-se em um estado dormente, precisam ser ativados para germinarem e então serem enumerados. A ativação é caracterizada pelas altas taxas de respiração e na prática laboratorial o tratamento mais usualmente empregado é a aplicação de calor (TOURNAS, 1994). Na prática industrial, quando os processos de pasteurização dos sucos de frutas não conseguem eliminar os fungos termoresistentes, podem causar apenas danos subletais e por fim, funcionar como um tratamento de ativação dos ascósporos e com o meio rico em nutrientes (os próprios sucos) e condições ambientais favoráveis, segue-se a germinação, crescimento e deterioração dos produtos durante a estocagem e comercialização.

A grande preocupação com bolores termoresistentes em frutas e derivados, além de sua elevada termoresistência nos produtos ácidos, se deve ao fato de alguns

gêneros como *Byssochlamys spp* serem capazes de crescer sob baixas tensões de oxigênio (como as encontradas em embalagens cartonadas) (HOCKING e PITT, 1984) deteriorando o produto. Todavia é importante considerar que algumas vezes a extensão do crescimento destes fungos pode ser tão limitada que colônias ou material micelial podem não ser detectados visualmente, mesmo havendo deterioração evidente do produto (SPLISTTOESSER, 1991). Neste caso, a comprovação dos causadores da deterioração pode ser feita por meio da detecção e enumeração de bolores termoresistentes, usando metodologia apropriada. Outro ponto importante é a capacidade de algumas espécies serem capazes de produzir micotoxinas, como patulina, ácido bissoclâmico, bissotoxina A, assimetrina, variotina, fumitremorginas A e C, verrucológeno, fischerina e eupenifeldina (TOURNAS, 1994).

As espécies mais comumente isoladas e / ou associadas à deterioração de alimentos pertencem aos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Eupenicillium* (HOCKING e PITT, 2001) e *Paecilomyces* (PIECKOVÁ e SAMSON, 2000). Em termos práticos, o reconhecimento das espécies de fungos termoresistentes, baseia-se em quatro principais fatores: i) isolamento após um processo de aquecimento da amostra; ii) observação do crescimento da colônia e aparência em meios padrões; iii) observação de cleistotécio, gimnostécio ou ascos livres e iv) observação microscópica das estruturas conidiais (HOCKING e PITT, 1984). Cada gênero apresenta características gerais, as quais permitem sua diferenciação. Elas foram descritas a seguir de acordo com Pitt e Hocking (1999):

a) *Byssochlamys*: é um ascomiceto caracterizado pela ausência de cleistotécios, gimnostécios ou outros corpos envolvendo os ascos durante o

desenvolvimento. Os ascos em *Byssochlamys* nascem em cachos abertos, em associação com hifas finas brancas não estruturadas, não sendo, no entanto, cercados por elas;

b) *Neosartorya*: é um ascomiceto que produz cleistotécios com parede celular e ascósporos transparentes a brancos, não amarelados. Eles produzem vesículas pequenas e piriformes que aumentam à medida que se aproximam dos ápices. Todas as espécies conhecidas até o momento (um total de dez) são termodúricas, no entanto, a única de significância para os alimentos é *N.fischeri*;

c) *Talaromyces*: é um ascomiceto caracterizado pela produção de gimnostécio branco a amarelo em associação com um anamorfo característico de *Penicillium*, *Paecilomyces* ou *Geosmithia*, sendo as espécies mais comumente isoladas de alimentos ácidos tratados termicamente *T.macrosporus* e *T.flavus*;

d) *Eupenicillium*: é caracterizado pela produção de cleistotécios brilhantes, de paredes lisas com 100 a 500 µm de diâmetro, muito rígidos (escleróticos) em associação com um *Penicillium* anamorfo, sendo a maturação dos ascos contendo oito ascósporos a partir dos cleistotécios lenta. Como deterioradores de alimentos, espécies de *Eupenicillium* podem ser seguramente ignoradas ao menos em circunstâncias não usuais, como excessiva contaminação das matérias-primas;

e) *Paecilomyces*: é diferenciado de *Penicillium* baseando-se nas diferenças no formato das fiálides e cor dos conídios, não formando ascos. As fiálides têm pescoços os quais são caracteristicamente, longos e dobrados a partir dos eixos das fiálides. Os conídios são raramente verdes ou azuis, e são usualmente alongados,

fusiformes ou elipsoidais a cilíndricos. Somente três espécies são comumente isoladas de alimentos: *P.variotii*, *P.lilacinus* e *P.fulvus*.

Por representar o principal reservatório destes microrganismos, as contagens no solo podem atingir valores de até 461 colônias por 10 g (JESENKÁ, PIECKOVÁ e BERNÁT, 1992). Desta forma, as frutas que têm contato com o solo são as mais susceptíveis a contaminação por *Byssochlamys* e outros fungos termoresistentes. Apesar de contagens na faixa de 10^1 a $10^2/10$ g terem sido reportadas por Jesenká, Piecková e Bernát (1992), Massaguer (2003) reportou contaminação na recepção das maçãs para a produção de suco de maçã de 4,0 esporos/100 g ou mL, indicando ser baixa a contaminação por estes microrganismos nas frutas antes do processamento. Apesar disso, Beuchat e Pitt (1992), consideram que uma contagem de 5 ascósporos de bolores termoresistentes por 100 g ou mL de produto, em uma etapa imediatamente anterior ao tratamento térmico indica um sério problema, o que pode levar a episódios de deterioração do suco durante a sua comercialização.

Os níveis aceitáveis de contaminação por ascósporos de bolores termoresistentes dependerão e muito do produto final, e composição do produto e condições de processamento térmico e comercialização devem ser levadas em conta (HOCKING e PITT, 1984; TOURNAS, 1994). Apesar de normalmente estarem presentes em pequenos números nas matérias-primas utilizadas para o processamento dos sucos, uma contagem maior do que 2 ascósporos por 100 mL de produto pode ser considerada inaceitável. Para evitar-se casos de deterioração por bolores termoresistentes, é comum especificar-se ausência de ascósporos para cada 100 mL de amostra analisada (HOCKING e PITT, 1984).

Apesar de sua baixa incidência nas frutas, diversas medidas têm sido estudadas visando-se evitar ou reduzir a contaminação e deterioração dos alimentos pelos bolores termoresistentes. As ações podem ser adotadas do campo ao armazenamento das frutas, para evitar a contaminação das matérias-primas pelos ascósporos, evitando-se contato com solo e poeira, que são fontes destes contaminantes (JESENKÁ, PIECKOVÁ e BERNÁT, 1992). Na indústria, a etapa de lavagem parece apresentar eficiência em pouca extensão para reduzir as contagens de ascósporos de bolores termoresistentes. De acordo com Ito, Seeger e Lee (1972) se por um lado os ascósporos de *Byssochlamys* tiveram seu número reduzido após a lavagem das frutas com solução de ácido peracético 4% por 1,3 minutos, por outro, foram resistentes à exposição a 200 ppm de cloro (pH 6,0) e 446 ppm de iodóforo (pH 2,2). A etapa de seleção das frutas também pode ser efetiva na redução da carga de ascósporos, pois à medida que se eliminam frutas com lesões (e que provavelmente tiveram contato com o solo), reduz-se também a carga contaminante das matérias-primas. Outra etapa que pode auxiliar na redução da contaminação por ascósporos de fungos termoresistentes é a filtração com terra diatomácea. King, Michener e Ito (1969) obtiveram redução de 99,999% de suco de uva contendo uma carga inicial de $1,4 \times 10^6$ ascos, após filtração com terra diatomácea (escala piloto). Eles ainda observaram que a proporção de esporos que passaram pelo filtro não dependeu do tamanho do inoculo e não foi marcadamente influenciada por diferentes tipos de meios de filtração, no entanto, para ter sucesso, os arranjos físicos do sistema de filtração devem ser tais que o suco filtrado seja removido da área do filtro sem que haja recontaminação com o agente auxiliar de filtração usado. Além do mais, pelo fato de não se saber se as populações de *Byssochlamys* ocorrem na natureza como ascos ou ascósporos, a presença destes

microrganismos em sucos que passaram pela filtração com terra diatomácea pode ser explicada pelo fato dos ascósporos serem mais difíceis de filtrar por estarem fora do tamanho de partículas consideradas removíveis.

O isolamento de bolores termoresistentes de produtos finais e os episódios de deterioração relatados, indicam que durante as condições industriais, a remoção dos ascósporos nem é sempre garantida. Assim, para inativar os ascósporos presentes nos sucos, o emprego da tecnologia de altas pressões tem sido proposto, sendo necessárias pressões de até 700 Mpa e temperatura de até 60°C, para sensibilização dos esporos de *B.nivea* para posterior tratamento térmico (BUTZ *et al.*, 1996), o que inviabiliza economicamente a aplicação desta tecnologia.

A pasteurização por si só pode não ser eficaz para reduzir a carga destes fungos em virtude da elevada resistência térmica dos seus ascósporos (TOURNAS, 1994). Fatores como diferenças entre isolados, pH, atividade de água e a presença de preservativos afetam a resistência térmica (HOCKING e PITT, 2001). A presença de ascos (e não somente de ascósporos livres) pode ser um fator a mais que deve ser levado em conta pelo fato de que nestas estruturas os ascósporos serão protegidos dos efeitos deletérios do calor, culminando com sua sobrevivência à pasteurização. Valores D entre 1 e 12 minutos à 90°C e Z entre 6 e 7°C tem sido reportados para *B.fulva* (KING, MICHENER e ITO, 1969; BAYNE e MICHENER, 1979), e podem ser considerados valores práticos. *B.nivea* tem resistência térmica marginalmente menor do que *B.fulva*, enquanto *Neosartorya fischeri* é no mínimo tão termoresistente quanto *B.fulva*, todavia seu envolvimento na deterioração dos alimentos é menos freqüente (HOCKING e PITT, 2001).

O controle da temperatura de processo deve ser considerado crítico quando alimentos passíveis de contaminação por bolores termoresistentes são processados, em virtude dos baixos valores Z apresentados pelas espécies de *B.fulva* / *B.nivea* (4-6,1°C) (HATCHER *et al.*, 1979; CASELLA *et al.*, 1990). Por exemplo, uma variação de temperatura de 88°C para 89°C aumentaria o tempo requerido para destruição de 10⁴ UFC/mL esporos destes fungos de 14 minutos para 20 minutos. Já que os trocadores de calor e pasteurizadores em uso comercial normalmente podem flutuar nesta faixa de temperatura, é possível que alguns fungos termoresistentes sobrevivam a um processo térmico aparentemente satisfatório, resultando em surtos de deterioração e em riscos potenciais à saúde dos consumidores (HATCHER *et al.*, 1979) pela produção de micotoxinas.

Se o tratamento térmico aplicado aos sucos não for capaz de promover adequada destruição do microrganismo mais termoresistente sem reduzir a qualidade do produto, medidas alternativas como o controle do crescimento pela manipulação de fatores como atividade de água, conteúdo de açúcar, pH do xarope da fruta ou concentrado, tensão de oxigênio e temperatura de estocagem, devem ser levados em conta (TOURNAS, 1994). A adição de conservantes químicos como benzoatos, sorbatos e sulfitos é considerada uma alternativa para impedir a germinação e crescimento dos ascósporos dos bolores termoresistentes. Concentrações acima de 100 µg/mL de sorbato de potássio e benzoato de sódio foram efetivas para controlar o crescimento de *Talaromyces flavus* em pH 3,5, enquanto em pH 5,4, o sorbato de potássio só controlou o crescimento do microrganismo em concentrações entre 300-400 µg/mL e o benzoato de sódio não foi capaz de controlar o crescimento do microrganismo em concentrações

de até 600 µg/mL (KING JR e HALBROOK, 1987). Os estudos têm demonstrado que baseando-se na concentração, o SO₂ apresenta mais significativo efeito no retardo do crescimento de *B.nivea*, seguido pelo sorbato de potássio e benzoato de sódio (ROLAND et al., 1984). Além do pH, a eficiência dos agentes antifúngicos no controle do crescimento de *Byssochlamys fulva* se vê afetada pela temperatura, já que o crescimento do microrganismo não foi significativamente retardado na presença de até 25-75 µg de SO₂ / mL de suco de uva à 30 e 37°C, mas foi à 21°C (ROLAND et al., 1984). Roland, Beuchat e Heaton (1984) estudaram o efeito de diferentes níveis de sorbato de potássio, benzoato de sódio e dióxido de enxofre no comportamento de *B.nivea* em molho de maçã embalados sob diferentes tensões de oxigênio. Os autores reportaram que mesmo em atmosferas contendo entre 9,5 e 9,7% de oxigênio o crescimento do fungo não foi observado e o dióxido de enxofre foi o agente mais letal ao microrganismo, culminando com sua não detecção após 4 e 13 meses de estocagem. Concentrações de 200 e 400 ppm de benzoato de sódio e sorbato de potássio resultaram na redução das contagens de *B.nivea* comparando-se ao controle. Apesar dos resultados obtidos, é preciso atentar-se para o fato dos autores não terem usado suspensão de ascósporos, que são sabidamente as formas mais resistentes aos agentes químicos do que conídios, sendo também os responsáveis pela sobrevivência desses fungos à pasteurização dos sucos de frutas. O efeito diferenciado dos agentes químicos sobre os ascósporos e conídios foi comprovado por van de Riet, Botha e Pinches (1989), que estudaram o efeito do dimetildicarbonato (DMDC) sobre o crescimento vegetativo e ascósporos de duas cepas de *B.fulva*. Usando suco de maçã como meio de suspensão, o crescimento vegetativo foi sensível à concentrações de 25 a 75 mg / L de DMDC, enquanto nenhuma evidência de efeitos letais aos ascósporos

foram encontradas mesmo quando as maiores concentrações de DMDC foram usadas (1000 mg/L). Concentrações de até 2000 mg / L de ascopirona P (antibacteriano produzido por *Anthracobia melaloma*), mostrou-se ineficiente no controle de *Byssochlamys fulva* e *B.nivea* em suco de maçã inoculados (10^3 ascósporos / mL) e mantidos à 25°C (THOMAS *et al.*, 2004).

Apesar da eficiência destes agentes químicos no controle do crescimento dos bolores termoresistentes, seu uso pode esbarrar nos limites máximos permitidos pela legislação e também na tendência atual dos consumidores na busca por alimentos mais saudáveis e livres de conservantes sintéticos. Assim, como a estabilidade dos sucos de frutas usualmente se apóia mais na pasteurização do que no uso de preservativos químicos e outros métodos de controle, a melhor maneira de assegurar que os bolores termoresistentes não irão deteriorar os produtos susceptíveis é a seleção cuidadosa, manuseio e limpeza da fruta em conjunto com um minucioso procedimento de análises para detecção dos esporos destes microrganismos (HOCKING e PITT, 2001).

3.10. *Byssochlamys* spp:

Dentre as espécies de *Byssochlamys* já isoladas, *B.fulva* e *B.nivea* são significantes na deterioração dos alimentos. Apesar de outras espécies como *B. musticola*, *B. trisporus*, *B. nivea* var. *lagunculariae*, *B. zollerniae*, *B. verrucosa* já terem sido descritas na literatura, não foram implicadas como causadoras de deterioração de alimentos (BEUCHAT e RICE, 1979).

Com relação à incidência, *B.fulva* é comumente associado a problemas de deterioração na Austrália, enquanto na Europa e América do Norte, *B.nivea* parece ser mais comum (HOCKING e PITT, 2001).

3.10.1. Características Macroscópicas e Microscópicas e Controle da Identidade de *B.fulva* e *B.nivea*:

Quando se vai identificar isolados de *Byssochlamys* de alimentos, três características devem ser usadas para auxiliar na distinção entre *B.nivea* e *B.fulva*: coloração das colônias em meios de cultura (CYA e MEA – Czapek extrato de levedura ágar e ágar extrato de malte, respectivamente), produção de clamidospóros e dimensões dos ascos e ascósporos. O formato dos conídios pode também ser útil para propósitos de identificação.

a) Características macroscópicas e microscópicas de *B.nivea*:

Microscopicamente *B.nivea* (anamorfo: *Paecilomyces niveus*) produz aleuroconídios freqüentemente, na reprodução assexuada, sendo, no entanto, capaz de produzir clamidósporos quando a espécie cresce em condições adversas. Junto com outras duas estruturas reprodutivas típicas (penicílios e ascos solitários) a produção de aleuroconídios é útil para diferenciação de *B.nivea* de outros fungos. Os aleuroconídios são formados comumente à 30°C e 37°C, tendo formato esférico à piriforme com 7-10 µm de diâmetro. Os penicílios são produzidos esparsamente, com estipes curtas sustentando métulas irregulares e fiálides ou apenas fiálides, e algumas vezes as

fiálides nascem diretamente a partir das hifas. As fiálides têm entre 12-20 µm de comprimento e são cilíndricas se afilando gradualmente. Os conídios são elipsoidais a piriformes, com 3-6 µm de diâmetro e paredes lisas. Os ascos produzidos por esta espécie são sensivelmente menores do que os de *B. fulva* (8-11 µm de diâmetro), e os ascósporos (4-6 µm de diâmetro), maturam em 10-14 dias a 25°C e em 7-10 dias a 30°C, mas raramente à 37°C (PITT e HOCKING, 1999).

Macroscopicamente, *B. nivea* em CYA têm entre 40-50 mm de diâmetro, são baixas e esparsas, brancas a levemente cinzas e reverso pálido a amarronzado. No MEA as colônias cobrem toda a placa, com hifas brancas a creme, baixas e esparsas, com pequenos nós de hifas densas, sendo o reverso pálido a amarronzado, enquanto no G25N o crescimento usualmente só ocorre microscopicamente (PITT e HOCKING, 1999).

b) Características macroscópicas e microscópicas de *B. fulva*:

Macroscopicamente as colônias de *B. fulva* (anamorfo: *Paecilomyces fulvus*), têm ao menos 60 mm de diâmetro em MEA (ágar extrato de malte) e CYA (Czapek extrato de levedura ágar), freqüentemente cobrindo toda a placa de Petri. As colônias são relativamente esparsas, baixas ou flocosas, com coloração oliva a marrom e reverso de cor similar ou pálido. Colônias em G25N (agar nitrato 25% de glicerol) têm entre 5-10 mm de diâmetro, textura variável, baixa e esparsa a funda e flocosa, com cor branca ou como no CYA.

Microscopicamente *B. fulva* forma ascos a partir de hifas brancas retorcidas, não estando, no entanto, envelopadas por elas. Os ascos são melhores desenvolvidos à 30°C, maturando em 7-12 dias, sendo também ocasionalmente formados à 25°C em isolados recentes, mas maturando vagarosamente. Os ascos apresentam-se esféricos a subesféricos, com 9-12 µm de diâmetro e os ascósporos são elipsoidais, com 5-7 µm de comprimento com paredes lisas. Penicílios são as estruturas reprodutivas anamórficas, melhor observadas à 25°C, nascidos de hifas superficiais ou de hifas aéreas longas. As estipes têm comprimento entre 10 e 30 µm e as fiálides com comprimento entre 12-20 µm, possuem aparência não uniforme e formato de frascos, estreitando-se gradualmente até os ápices. Os conídios com paredes lisas são principalmente cilíndricos ou em formato de barril, usualmente estreitos e com comprimento entre 7-10 µm, mas algumas vezes mais longos e largos ou elipsoidais a partir de fiálides individuais. Clamidósporos não são produzidos (BEUCHAT e RICE, 1979). Microscopicamente *B. fulva* pode ser diferenciado de *P. variotii* por produzir conídios elipsoidais ao invés de cilíndricos.

c) Controle da identidade de *Byssochlamys* spp:

Além da confirmação da identidade dos fungos através de observações macroscópicas e microscópicas, a aplicação de técnicas para o sequenciamento genético tem sido usada para o controle da identidade dos fungos. Puel et al., 2007, confirmaram a identidade de diversas cepas de *B. fulva* e *B. nivea* através da amplificação e seqüenciamento de fragmentos do espaço interno transcrito (*internal transcribed spacer* – ITS), após observação de características micro e macroscópicas.

A região ITS está localizada entre a menor subunidade (SSU) e a maior subunidade (LSU) dos genes rRNA. Organismos eucarióticos possuem dois espaços internos transcritos: ITS-1 é localizado entre os genes 18S e 5.8S, enquanto o ITS-2 é localizado entre os genes 5.8S e 28S. Em todas as espécies, cada rRNA codifica uma unidade de transcrição 18S, 5.8S e 28S, arranjada de maneira a se iniciar a partir da posição 5'. As três seqüências rRNA codificadoras são unidas e separadas por segmentos de espaços transcritos. Estes são chamados, respectivamente, o espaço externo transcrito (5' e 3'ETSs) e o espaço interno transcrito (5' e 3'ITSs). Na transcrição do rRNA, os genes da SSU, LSU and 5.8S rRNA são conservados, enquanto os do ITS são suprimidos. A região ITS vem sendo usada para se estudar a diversidade genética entre diferentes cepas de microorganismos, sendo hoje em dia a região do DNA dos fungos mais seqüenciada, largamente usada em estudos de taxonomia e filogenia molecular. Seu uso como marcador genético pode ser explicado pelo fato de ser uma região que possui uma taxa evolucionária mais rápida do que a das regiões codificadoras do rRNA (fragmentos SSU e LSU), e desta forma, pode conter sítios de polimorfismo que permitem a discriminação entre populações ou espécies de um gênero (SINGER e BERGER, 1991; HOMAN et al., 1997, TSUCHIYA et al., 2003).

3.10.2. Principais Parâmetros que Afetam o Crescimento de *Byssochlamys*:

À parte do isolamento e descrição de *B.nivea* do solo por Westling in 1911, espécies de *Byssochlamys* têm sido reportadas raramente a partir de outros substratos que não a partir de alimentos termoprocessados. As espécies de *B.fulva* e *B.nivea* possuem uma vantagem seletiva frente a outras espécies de fungos termoresistentes,

que é a capacidade de crescimento anaerobicamente quando há baixos níveis de oxigênio, produzindo gás carbônico. A pequena quantidade de oxigênio presente em garrafas ou embalagens cartonadas provém o oxigênio suficiente para o crescimento destes fungos (PITT e HOCKING, 1999).

Com relação ao teor de sólidos, a máxima concentração de sacarose tolerada encontra-se na faixa de 60 a 65%, sendo a faixa ótima para crescimento próxima aos 10%. Já a produção dos ascos ocorre com concentrações de sacarose entre 5 e 20%, sendo concentrações acima de 30% inibitórias para a produção dos ascos (OLLIVER e RENDLE, 1934).

Byssochlamys têm temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 37°C, não havendo crescimento abaixo de 7-8°C (OLLIVER e RENDLE, 1934; BEUCHAT e ROLAND, 1977). A influência da temperatura sobre a atividade de água mínima para crescimento de *B.nivea* foi demonstrada por Roland e Beuchat (1984). Os autores observaram que a atividade de água mínima para crescimento do microrganismo em xaropes de maçã foi de 0,915, 0,886 e 0,871 à 21°C, 30°C e 37°C, respectivamente.

Tournas (1994) descreve uma faixa de pH para crescimento de *Byssochlamys* entre 2,0 e 9,0, o que torna a manipulação do pH como alternativa para restrição do crescimento do microrganismo inviável.

3.10.3. Ultraestrutura e Composição dos Conídios e Ascósporos de *Byssochlamys*:

O estudo da ultraestrutura dos conídios e ascósporos de *B. fulva* foi realizado por Partsch, Draxler e Altmann (1969). Os autores descreveram que os conídios têm uma capa fibrosa e áspera que cobre toda a membrana da parede celular, seguindo-se um “espaço intermediário” entre a capa e a membrana citoplasmática (*Figuras 02 e 03*). A parede celular é de considerável força, com espessura entre 100 e 200 μm e permanece inalterada durante a germinação. O espaço intermediário é composto por diversas camadas e na proximidade da membrana citoplasmática, ainda existe uma segunda membrana fina, mas claramente discernível. O citoplasma mostra de um a três núcleos, que podem variar em tamanho e formato, com a cromatina e mitocôndrias sendo claramente discerníveis.

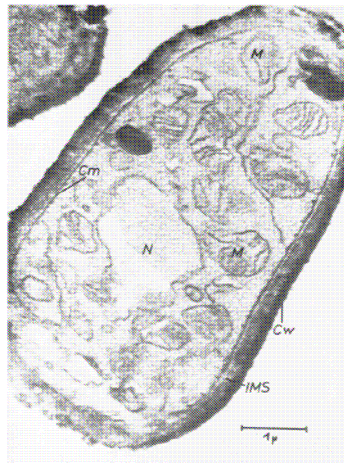


Figura 02: Ultra-estrutura dos conídios de *B. fulva*, onde **N**= núcleo; **M**= mitocôndrias; **Cw**= Parede celular; **IMS**= espaço intermediário; **Cm**= membrana celular.

(Fonte: PARTSCH, DRAXLER e ALTMANN, 1969).

Já nos ascósporos (*Figura 03*), a parede celular possui maior espessura (200-300 μm) do que a dos conídios. Os ascósporos são circundados por uma membrana menos estruturada e o espaço intermediário mostra uma espessura destacada, com elevada densidade óptica. O citoplasma dos ascósporos ocupa somente 1/3 de sua largura. A parede celular e ao espaço intermediário presente nos ascósporos atribuem-se resistência térmica dos ascósporos.

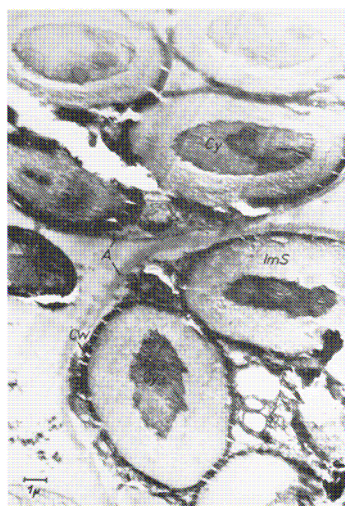


Figura 03: Ultra-estrutura dos ascos e ascósporos de *B. fulva*, onde **A**= ascó; **CW**= Parede celular do ascósporo; **IMS**= espaço intermediário do ascósporo; **Cy**= citoplasma no ascósporo.

(Fonte: PARTSCH, DRAXLER e ALTMANN, 1969).

Quimicamente os ascósporos de *B. fulva* são compostos por aproximadamente 60% de carboidratos, 20% de lipídeos, entre 8 a 10% de proteínas e em torno de 1,5% de cinzas, com fósforo, potássio e magnésio representando aproximadamente 88% dos minerais (BANNER, MATTICK e SPLITTSTOESSER, 1979). Segundo estes autores a presença de maior quantidade de ácidos graxos de cadeias longas (maiores que C_{20}) e

o isolamento de ácidos graxos não anteriormente detectados em outros esporos fúngicos podem explicar a elevada termoresistência dos ascósporos.

3.10.4. Estudos de Resistência Térmica de *Byssochlamys*:

Anteriormente ao estudo de resistência térmica é preciso determinar-se a população presente numa suspensão de ascósporos. A ativação é feita em condições de tempo e temperatura tais que os ascósporos têm o processo de germinação iniciado passando para um estado de atividade metabólica elevado.

Após a ativação, uma série de alterações estruturais são observadas nos ascósporos; o tubo de germinação forma-se a partir da parede dos esporos e os corpos citoplasmáticos se tornam claramente visíveis (PARTSCH, DRAXLER e ALTMANN, 1969). Conforme sumarizado por Tournas (1994), temperaturas entre 70°C e 80°C por tempos variados têm sido utilizados para a ativação de ascósporos de *B.fulva* e *B.nivea*. O tempo e temperatura ótimos podem variar principalmente com a composição do meio de aquecimento (CASELLA, MATASCI e SCHMIDT-LORENS, 1990). A importância da determinação correta do binômio de ativação reside no fato desta contagem ser utilizada como N_0 na determinação dos parâmetros cinéticos de inativação.

Conforme já relatado por alguns autores, a cinética de destruição de bolores termoresistentes não segue uma ordem de destruição logarítmica, mas algumas vezes podem tender a ela quando temperaturas mais elevadas são utilizadas (KOTZEKIDOU, 1997). A resistência térmica é influenciada por muitos fatores, incluindo as espécies,

natureza do meio de aquecimento e a temperatura de tratamento (BEUCHAT e RICE, 1979).

Kotzekidou (1997) encontraram que *B.nivea* e *B.fulva* foram mais termoresistentes em suco de tomate (16°Brix) do que em tampão fosfato, indicando que constituintes do suco tiveram algum efeito protetor sobre os ascósporos. Os tempos de destruição térmica de um ciclo logarítmico à 90°C para *B.nivea* e *B.fulva* foram respectivamente, 1,5 min e 8,1 min. Bayne e Michener (1979) estudaram a habilidade de 25 cepas de *Byssochlamys* para resistir ao tratamento térmico e obtiveram que sete das cepas foram capazes de sobreviver ao aquecimento à 90°C / 25 min ou mais, quando o número inicial era de 10⁶ esporos / mL. Cinco cepas mostraram mais termoresistentes quando aquecidas em meio com pH 5,0 do que quando o pH foi de 3,6 e uma rápida inativação foi observada em pH 6,6.

Os tipos de ácidos presentes nos alimentos que servem como meio de aquecimento também exercem influência sobre a resistência térmica dos ascósporos. Splittstoesser e Splittstoesser (1977) encontraram que a resistência térmica de *B.fulva* H-25 em suco de uva (15°Brix) pode ser reduzida na presença dos ácidos fumárico, láctico, succínico e acético, enquanto na presença dos ácidos málico, tartárico e cítrico ela é aumentada. O meio de cultura no qual o fungo cresce também influencia a resistência térmica dos ascósporos de *B.nivea*, com o MEA dando maiores valores D (50 min à 80°C) do que o PDA (agar batata dextrose) (24 min à 80°C). Da mesma maneira, aumento nos valores D e Z foram observados quanto maior o tempo de incubação (CASELLA, MATASCI e SCHMIDT-LORENS, 1990), indicando que o tempo de esporulação influencia a resistência térmica dos ascósporos.

Como espécies de variadas resistências térmicas estão amplamente difundidas pelo ambiente (solo), com algumas podendo sobreviver a aquecimento à 90°C por mais de 10 minutos, pode-se concluir que a seleção dos fungos mais termoresistentes ocorre justamente durante a industrialização das frutas e seus derivados (JESENSKÁ, PIECKOVÁ e BERNÁT, 1993).

Com relação a pesquisas sobre a termoresistência de *B.fulva* e *B.nivea* no Brasil, Aragão (1989) reportou valores D^* à 90°C e 93°C iguais a 6,3 min e 1,7 min (cinética não linear), respectivamente para *B.nivea* em polpa de morango utilizando frascos de três bocas. Salomão (2002) isolou uma cepa de *B.fulva* a partir das maçãs (matéria-prima) utilizadas para a produção de néctar de maçã. A cepa foi capaz de sobreviver a aquecimento de até 95°C / 20 minutos. Em 2002, Gressoni Jr (2002) reportou um valor D à 90°C igual a 2,03 min para *B.nivea* em suco de laranja integral pasteurizado. Com os valores D encontrados, todas as cepas seriam capazes de sobreviverem aos processos térmicos comumente aplicados nas indústrias processadoras de sucos (90°C à 98°C por poucos segundos).

3.11. Micotoxinas:

Micotoxinas são substâncias oriundas do metabolismo secundário dos fungos e compreendem um grupo de compostos químicos largamente diversos em sua estrutura e efeitos tóxicos. Apesar das micotoxinas serem metabólitos fúngicos, nem todos os metabólitos de origem fúngica são necessariamente micotoxinas, como os antibióticos.

O termo micotoxicose é aplicado às condições patológicas resultantes da ingestão de alimentos ou rações contaminados com toxinas fúngicas (SHARMA e SALUNKE, 1991).

Apesar da contaminação fúngica dos alimentos ser um fenômeno recorrente, as atitudes tomadas para o seu controle estão longe de serem consistentes. Por muitos anos, a tendência em se considerar fungos como “menos perigosos” foi comum, sendo mais importantes as perdas devidas à aparência dos alimentos e deterioração. No entanto, a partir da descoberta da aflatoxina em 1960, mudou o escopo do problema da contaminação fúngica dos alimentos, inserindo-se também a grande preocupação com a presença das micotoxinas (DHUMAL e SALUNKHE, 1992).

Pelo fato dos fungos toxígenos serem ubíquos, a infecção de produtos agrícolas susceptíveis tais como grãos, nozes e frutas é comum ao redor do mundo. Existem centenas de micotoxinas, no entanto, somente poucas representam desafios para a segurança dos alimentos (MURPHY, HENDRICH e LANDGREN, 2006). Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* destacam-se como os mais importantes produtores de micotoxinas. Aflatoxinas, ácido ciclopiazônico, deoxivalenol, fumonisinas, ocratoxinas, esterigmatocistina, zearalenona e patulina destacam-se como as mais importantes micotoxinas que apresentam efeitos biológicos adversos como, hepatotóxicidade, carcinogenicidade, nefrotoxicidade e outros como convulsão, hemorragia e vômitos aos homens e animais (MOSS, 2000).

A prevenção da contaminação com micotoxinas nos alimentos pode ter um significativo efeito na saúde pública de países de baixa renda, e merece atenção especial. A indústria de alimentos deve tomar a frente com relação a estes esforços porque tal ação poderá melhorar a sustentabilidade econômica, aumentar a segurança

dos alimentos, do comércio internacional e melhorar a saúde pública (MURPHY, HENDRICH e LANDGREN, 2006). As estratégias para o controle das micotoxinas nos alimentos incluem não somente métodos de controle de natureza química ou física, mas também se expandem às boas práticas agrícolas, boas práticas de fabricação, APPCC e adoção de controles biológicos e transgênicos (MURPHY *et al.*, 2006).

3.11.1. Características Químicas da Patulina:

Quimicamente a patulina (4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one) é uma micotoxina de natureza relativamente não complexa. A sua estrutura é caracterizada pela presença de uma lactona cíclica de cinco membros (*Figura 04*). A patulina possui peso molecular de 154,0266, fórmula empírica $C_7H_6O_4$ (COLE e COX, 1981), com composição de carbono (54,55%), hidrogênio (3,92%) e oxigênio (41,52%).

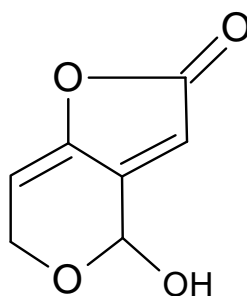


Figura 04: Estrutura Química da Patulina.

A patulina também é conhecida como claviformina, clavatina, clavacina, expansina, penicidina, micoína, leucopina e tercinina (COLE e COX, 1981).

Como características gerais, a patulina é um composto incolor e cristalino com máxima absorção no UV a 276 nm e ponto de fusão de 111°C (LEATHERHEAD, s.d.). Apresenta boa solubilidade em água, álcoois, acetona, acetato de etila, clorofórmio; sensivelmente solúvel em éter etílico e benzeno, enquanto apresenta-se insolúvel em éter de petróleo. É instável em solventes polares como água e metanol e perde sua atividade biológica em condições alcalinas (COLE e COX, 1981) na presença de grupos sulfidrilas (-SH) (ASKAR, 1999), compostos normalmente presentes em alimentos protéicos como mortadela, presunto curado, queijos e refeições à base de milho (STOTT e BULLERMAN, 1976; LIEU e BULLERMAN, 1977; BAILLY *et al.*, 2005). Em grãos (cevada, milho e trigo), quanto maior a atividade de água, menor a estabilidade desta micotoxina, porque maiores são as taxas de reação com grupos sulfidrilas (HARWIG, BLANCHFIELD e JARVIS, 1977). A afinidade da patulina com os grupos sulfidrilas pode ser usada para detoxificar a micotoxina (LINDROTH e WRIGHT, 1990). Um exemplo desta aplicação foi o estudo realizado por Morgavi *et al.* (2003) os quais estudaram a prevenção da toxicidade da patulina na fermentação microbiana do rúmen pela adição de compostos sulfidrílicos como a cisteína e glutadiona ao feno de alfafa. Os autores observaram rápido desaparecimento da toxina, sendo impossível detectá-la após uma hora e indicando que utilização de compostos como cisteína para evitar a toxicidade pode ter implicações práticas na nutrição de ruminantes. A patulina é ainda instável na presença de ozônio (solução aquosa 10%), com rápido desaparecimento após exposição por 15 segundos (McKENZIE *et al.*, 1997). Dentre as técnicas que tiveram grande desenvolvimento e aplicações para a melhoria da qualidade e segurança dos alimentos, a irradiação merece destaque, faltando ainda dados com relação à estabilidade da patulina às radiações ionizantes.

A patulina é também instável durante a fermentação do suco de maçã para a fabricação da sidra de maçã. De acordo com Harwing *et al.* (1973) a micotoxina tem sua concentração reduzida e praticamente desaparece após 2 semanas de fermentação, sendo improvável que a patulina seja detectada na sidra mesmo se suco com elevadas concentrações da micotoxina sejam usados para sua fabricação. No processo de produção da sidra de maçã, pode ocorrer uma redução dos níveis de patulina de até 99% da quantidade inicial presente (STINSON *et al.*, 1978). Segundo Moss e Long (2002) a degradação da patulina por *Saccharomyces* só ocorre durante a fermentação, mas não quando esta levedura cresce aerobicamente. Assim, a detecção da patulina em amostras de sidra de maçã pode ser explicada pela adição de suco não fermentado contaminado com patulina ou se a fermentação é feita com leveduras selvagens, que são intolerantes ao álcool e normalmente arrastam o processo, permitindo a recuperação desta micotoxina (STINSON *et al.*, 1978).

A patulina é, no entanto, estável em clorofórmio, benzeno, cloreto de metila (McCKINLEY e CARLTON, 1991) e muito estável ao calor em meio ácido, como em sucos de maçãs (ACAR e ARSAN, 1989).

3.11.2. Produção da Patulina:

3.11.2.1. Fungos Produtores de Patulina e Condições que Afetam a Produção da Micotoxina:

Dentre as espécies produtoras de patulina, *Penicillium expansum*, é provavelmente o mais comumente associado às maçãs e pelo fato de possuir elevada

capacidade de invasão das frutas ao ser comparado com outras espécies produtoras como *P.patulum* e *Aspergillus clavatus* (NORTHOLT, VAN EGMOND e PAULSCH, 1978), é considerado o maior causador da chamada podridão azul (CODEX, 2003b). Dentre os potenciais produtores de patulina nas maçãs, *P.expansum*, e *P.claviforme* são considerados invasores primários, enquanto fungos como *A.clavatus* e *P.patulum* são considerados oportunistas em virtude de seu baixo potencial de invasão das frutas (LOVETT e THOMPSON, 1978).

Apesar de espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cladosporium* serem ocasionalmente isoladas a partir das maçãs sua presença é esporádica, ocorrendo em baixas contagens. Todavia, *P.expansum* é o fungo predominantemente isolado ao longo de todo o período de estocagem das frutas, com contagens médias variando entre 3 log₁₀ UFC/g antes da estocagem a contagens médias de até 6,68 log₁₀ UFC/g após 33 dias de estocagem das maçãs, com grandes quantidades de patulina estando presentes no final deste período de estocagem (SYDENHAM *et al.*, 1995; SYDENHAM *et al.*, 1997).

Enquanto algumas espécies de *Penicillium* podem ser consideradas as principais responsáveis pela produção da patulina nas etapas anteriores ao processamento das frutas (pré-colheita e pós-colheita), algumas espécies de *Byssochlamys* podem ser consideradas potenciais produtoras desta micotoxina nas etapas pós-pasteurização. Isto se deve ao fato das espécies de *Penicillium* terem valores D de menos de um segundo à temperatura de 60°C (SHEARER *et al.*, 2002), sendo desta forma inativadas na etapa de pasteurização dos sucos, considerando-se que os binômios aplicados comercialmente encontram-se na faixa de 90°C-105°C / 15-30 segundos, enquanto as

cepas de *Byssochlamys* por terem valores D na faixa de 1,3 a 15 minutos à 90°C (BAYNE e MICHENER, 1979) têm a capacidade de sobreviver e crescer nos sucos em virtude de sua habilidade de multiplicação sob baixas tensões de oxigênio (ambiente encontrado nas embalagens destes produtos).

A produção da patulina por *P.expansum* e outras espécies de *Penicillium* se vê afetada por diversos fatores. Stott e Bullerman (1975) mostraram em seu estudo que em meio basal líquido a produção de patulina por *P.patulum* foi afetada pela temperatura de incubação, quantidade e tipo de carboidrato e fonte de nitrogênio presente, com aparente interação entre estes fatores.

Dentre os componentes majoritários da porção sólida do suco de maçã, glicose e frutose suportam o crescimento e produção da patulina por *P.expansum*, quando a fonte de carbono é o ácido málico, foi observado crescimento pobre. Além disso, a produção da patulina também se vê afetada pelo tamanho das moléculas de carboidratos presentes no substrato, com redução na produção da micotoxina ocorrendo com a medida que há o aumento do comprimento da cadeia da molécula (DAMAGLOU, CAMPBELL e BUTTON, 1985).

O tipo de substrato deve ser levado em conta em estudos de avaliação da capacidade de produção de patulina por *P.expansum*, sendo mais importante do que o tipo de técnica usada para manutenção das cepas. Em seu estudo, Santos *et al.* (2002) relataram que a capacidade de produção da patulina parece ser mais cepa-dependente do que do tipo de técnica usada para preservação das culturas fúngicas. Também foi observada uma tendência para detecção da patulina após a preservação das culturas, quando a micotoxina não havia sido detectada anteriormente, o que pode ser explicado

como uma resposta dos microrganismos à preservação por longos períodos, sendo comparado à depleção de nutrientes na natureza. Já com relação ao substrato para produção de patulina, os autores observaram que o ágar suco de uva suporta melhor produção desta micotoxina ao se comparar com o ágar extrato de levedura-sacarose.

Assim como para as espécies de *Penicillium*, diversos fatores afetam a produção de patulina por *Byssochlamys*. Rice, Beuchat e Worthington (1977) encontraram que as cepas de *Byssochlamys* são capazes de produzir a patulina em sucos de *blueberry* (mirtilo), framboesas vermelhas, *boysenberry*, pêra, uva Concord, maçã, *cranberry*, morango, abacaxi, cerejas pretas, pêsego, mas não em sucos de tomate e ameixa seca, sendo possível que o menor teor de sólidos solúveis (4,8%) do suco de tomate e mais elevado pH (4,22) em comparação aos demais sucos (teor médio de sólidos acima de 13% e pH médio abaixo de 3,60) explique a não produção da patulina pelo fungo. No caso da ameixa seca, o fato do suco ser obtido a partir da extração das frutas secas e elas conterem grandes quantidades de produtos da reação de escurecimento durante a secagem, pode explicar a incapacidade do fungo em produzir a micotoxina no produto. Já com relação à temperatura, estes autores também reportaram que quanto maior a temperatura de crescimento, menor a produção de patulina, com maiores quantidades de patulina sendo produzidas sob temperaturas de refrigeração. *Byssochlamys* produziu mais patulina à 18°C após 25 dias, enquanto a produção de biomassa foi maior a 25 e 30°C após 20 e 25 dias. Apesar de *Byssochlamys nivea* ter como atividade de água mínima para crescimento valores de 0,915; 0,886 e 0,871 e de 0,978; 0,968 e 0,959 para produção de patulina à 21°C, 30°C e 37°C, respectivamente, a manipulação destes parâmetros para o controle da produção da micotoxina se tornaria inviável

sensorialmente em se tratando de sucos prontos para beber. De acordo com Roland e Beuchat (1984), a produção máxima de patulina por *B.nivea* em suco de maçã ocorreu à 20°C, após 21 dias de incubação, com quantidades de micotoxina de 20 mg/100 mL sendo detectadas. À 30°C e 37°C, o conteúdo de patulina alcançou valores máximos (nunca maiores que 10 mg/100 mL) entre 6 e 9 dias, respectivamente, sendo observado um rápido declínio após este período. A produção da micotoxina também ocorreu à 12°C demonstrando que o crescimento de *B.nivea* em produtos mantidos em temperatura de abuso de refrigeração (acima de 7°C) pode ocorrer e, portanto, a contaminação dos produtos por este fungo deve sempre ser uma preocupação para as indústrias de sucos, já que segundo dados reportados na literatura, a produção de patulina é favorecida sob temperaturas na faixa de 12°C à 21°C.

Com relação ao espaço-livre das embalagens, Rice (1980) usou condições mais favoráveis do que as encontradas em embalagens comerciais de sucos para estudar o efeito do teor de oxigênio livre na produção de patulina por *Byssochlamys* spp. Os autores encontraram que maiores quantidades de patulina (0,31mg/50mL) foram produzidas nas embalagens contendo 5,1 cm de espaço-livre e mantidas à 20°C após 28 dias. Com espaço-livre de 1,3 e 2,5 cm, as cepas usadas no estudo produziram menos patulina (aproximadamente 0,27mg/50mL, após 7 e 9 dias de incubação à 30°C e 25°C, respectivamente) do que quando o espaço livre foi de 5,1 cm, dando uma indicação de que apesar da capacidade de crescimento sob baixas tensões de oxigênio, a produção de patulina nas condições encontradas nas embalagens de sucos de frutas parece ser bem limitado.

Dentre os conservantes comumente usados em produtos derivados de frutas, os sulfitos (concentrações entre 0-75 ppm) apresentam maior efeito sobre a taxa de produção de biomassa por *B.nivea*, seguido pelo sorbato de potássio (concentrações entre 0-150 ppm) e benzoato de sódio (0-500 ppm). Com relação à produção da patulina, concentrações de sulfito entre 0-50 ppm foram mais efetivas no controle desta micotoxina, seguidas pelo sorbato de potássio (0-100 ppm) e benzoato de sódio (0-400 ppm) (ROLAND e BEUCHAT, 1984). Sulfitos também foram os mais eficientes, seguidos pelo sorbato de potássio e benzoato de sódio, para controlar a produção de biomassa e patulina por *B.nivea* em suco de uva (ROLAND *et al.*, 1984).

3.11.2.2. Biossíntese da Patulina:

Como todo idiólito ou metabólito secundário, a patulina não é essencial para os microrganismos produtores em cultura pura, mas possui funções para garantir sua sobrevivência na natureza. Por ser um metabólito secundário, a patulina é desnecessária na fase de crescimento vegetativa da cultura e a tem sua produção usualmente suprimida por elevadas taxas de crescimento das culturas produtoras. Além disso, a produção desta micotoxina é regulada pela repressão de fontes de nitrogênio, indução (ácido 6-metilsalicílico) e perda de atividade da sintetase (DEMAIN, 1986).

A patulina é sintetizada através da via acetato / malonato e apesar de sua biossíntese ainda não estar totalmente esclarecida, parece que diversas rotas alternadas podem resultar num mesmo produto final (STEYN, 1992). De acordo com Murphy *et al.* (1974) na rota biossintética da patulina (*Figura 5, onde 1: 6-MAS sintase, 2: 6-MAS descarboxilase, 3: m-cresol 2-hidroxilase, 4: m-hidroxibenzil álcool desidrogenase e 5: isoepoxidon desidrogenase*) um grande número de metabólitos e

atividades enzimáticas podem ser observadas e somente poucas delas são envolvidas em uma, ou talvez duas rotas de biossíntese principais. Muitos dos metabólitos estão em equilíbrio com intermediários verdadeiros ou são resultados da inespecificidade das enzimas do sistema que catalisam reações com substratos de estrutura sensivelmente variadas, criando pequenas rotas laterais até o produto final. É interessante notar que uma vez formados, os três primeiros metabólitos da rota (ácido 6-metilsalicílico, m-cresol e m-hidroxibenzilalcool) funcionam como indutores do resto da via (DEMAIN, 1986).

Conforme já mencionado anteriormente, dentre as espécies de *Byssochlamys*, *B.nivea* e *B.fulva* são as mais importantes por estarem envolvidas em surtos de deterioração de alimentos ácidos processados ou por serem isoladas a partir destes alimentos. Apesar de alguns estudos terem apontado que as duas espécies são produtoras de patulina (RICE, BEUCHAT e WORTHINGTON, 1977; RICE, 1980), recentemente, estudos mostraram que somente espécies de *B.nivea* possuem capacidade de produzir a patulina. No estudo realizado por Houbraken, Samson e Frisvad (2006) trinta e nove isolados de *Byssochlamys* e *Paecilomyces* foram testados com relação à sua capacidade de produção de patulina e nenhuma das cepas de *B.fulva* foi capaz de produzir a patulina, enquanto algumas de *B.nivea* a produziram. Através de estudos genéticos, Dombrink-Kurtzman e Engberg (2006) demonstraram que cepas de *B.nivea* com capacidade de produção de patulina possuíam genes da enzima isoeoxidona desidrogenase (*idh*) com seqüência homóloga às encontradas em *Penicillium expansum* e *P.griseofulvum* produtores de patulina, demonstrando que a presença deste gene é fundamental para a biossíntese da micotoxina pelos fungos.

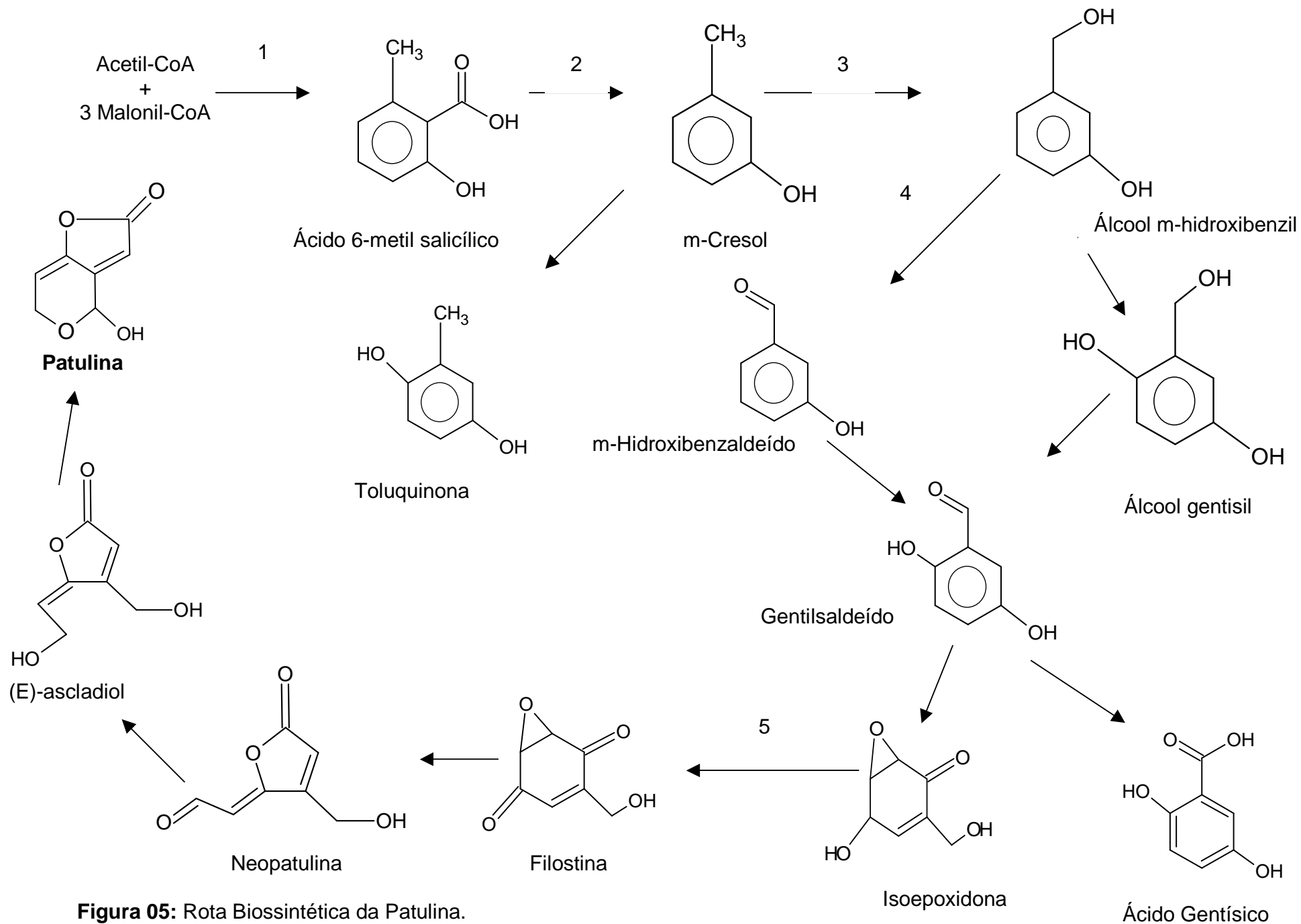


Figura 05: Rota Biossintética da Patulina.

Puel *et al.* (2007) investigaram a capacidade de produção da patulina por oito cepas de *B.nivea* e onze de *B.fulva*. As oito cepas de *B.nivea* foram capazes de produzir a patulina, enquanto nenhuma das onze cepas de *B.fulva* foi capaz. Estes autores identificaram através de ensaios genéticos que a inabilidade das cepas de *B.fulva* estudadas em produzir a patulina devia-se a ausência de dois genes envolvidos na rota sintética da micotoxina (*6msas* e *idh*), que codificam as enzimas ácido 6-metilsalicílico sintetase e isoepoxidon desidrogenase, respectivamente. Desta forma, pode-se concluir que não somente os genes *6msas* e *idh* estão envolvidos na biossíntese da patulina, mas também que ela é mediada ao nível de transcrição genética (WHITE, O'CALLAGHAN e DOBSON, 2006). No entanto, Paterson (2004) reportou a detecção do gene *idh* em uma cepa de *B.fulva* isolada do solo e relata que a detecção destes genes através da reação de polimerase em cadeia (*polimerase chain reaction*) tem como limitação o fato de alguns metabólitos secundários do próprio fungo atuarem como inibidores da reação, podendo levar a obtenção de resultados falso-negativos.

3.11.3. Efeitos Tóxicos da Patulina:

Os vários efeitos biológicos das micotoxinas são atribuídos grandemente a alteração dos processos metabólicos básicos. O metabolismo de carboidratos, lipídeos e esteróides, as funções mitocondriais e a biossíntese de proteínas e ácidos nucléicos são processos agudamente afetados pelas micotoxinas (KIESSLING, 1986).

Em virtude da preocupação com a toxicidade das micotoxinas, diversos estudos foram realizados a partir dos anos sessenta, quando se comprovou sua capacidade de causar danos à saúde de animais e possivelmente do homem.

Apesar de ter sido considerada inicialmente como um antibiótico, com potenciais possibilidades de uso clínicos (RAISTRICK, 1943), a patulina tem sido atribuídos diversos efeitos adversos aos animais e possivelmente ao homem.

Sintomas agudos pela ingestão da micotoxina incluem agitação, convulsões, congestão pulmonar, edema, hiperemia, distensão do trato gastrointestinal, hemorragia intestinal e degeneração de células epiteliais (ESCOULA *et al.*, 1977; HAYES *et al.*, 1979; MAHFOUD *et al.*, 2002). Em células mamárias *in vitro*, a patulina exibiu atividade genotóxica e possível mutagenicidade (SCHUMACHER *et al.*, 2004). Além destes, sintomas crônicos são efeitos neurotóxicos (HOPKINS, 1993), imunotóxicos (WICHMANN *et al.*, 2002) e imunossupressivos (WICHMANN *et al.*, 2002). A patulina é ainda capaz de induzir a morte celular (LIU *et al.*, 2006).

Uma grande limitação dos estudos de toxicidade da patulina é o fato de serem feitos com animais e nem sempre permitirem uma boa extrapolação para humanos. Em um dos únicos estudos com humanos, Rychlik (2003) demonstrou que após o consumo de suco de maçã com até 50 µg/L desta micotoxina, somente 2% foi encontrado no sangue. Foi comprovado que os efeitos adversos da micotoxina não são sistêmicos, mas locais e que até mesmo com o consumo de grandes quantidades da micotoxina, há rápida degradação antes de alcançarem outros tecidos além do trato gastrointestinal.

Outra grande discussão com relação aos efeitos adversos da patulina é sua capacidade carcinogênica. Osswald *et al.* (1978) administraram pelo tubo digestivo

duas doses semanais de patulina por um período de 64 semanas em ratos fêmeas e machos. A dose total de patulina administrada foi de 358 mg / Kg e neste período não foram observados carcinomas induzidos pela patulina. A administração de duas doses diárias com 2 mg da micotoxina / Kg através de intubação gástrica, entre os dias 14 e 19 de gravidez das ratas também não indicou carcinogenicidade via placenta. No entanto, durante o período neonatal (2 a 6 dias pós-parto), 11 das 52 fêmeas e 8 dos 43 machos nascidos dos ratos nos quais se administrou a patulina morreram com sinais claros de toxicidade (hemorragia predominante na pele da cabeça e em menor extensão no cérebro e pulmões). A suposta carcinogenicidade desta micotoxina pode ser atribuída ao fato dela ser capaz de induzir diversas aberrações cromossômicas e clastogenicidade (PFEIFFER, GROB e METZLER, 1998). No entanto, de acordo com a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), não existem evidências adequadas para comprovar a carcinogenicidade da patulina nos animais experimentados (IARC, 1998). Apesar disso, controvérsias a respeito da carcinogenicidade desta micotoxina ainda permanecem. Em estudo recente, Pfeiffer *et al.* (2005) demonstraram que concentrações não tóxicas de patulina (máximo de 2 mM) levaram a uma pronunciada depleção intracelular dos níveis de glutadiona no fígado de ratos e inibiram várias enzimas metabolizadoras de drogas. Os autores relatam que estes efeitos podem não somente representar eventos anteriores na ação citotóxica da patulina, mas também ser relevante para uma possível genotoxicidade e carcinogenicidade desta micotoxina, já que a depleção da glutadiona e o comprometimento do sistema de detoxificação de outros carcinógenos podem aumentar o dano ao DNA devido ao estresse oxidativo e formação de adutos. Em um estudo *in vivo* e *in vitro*, demonstrou-se a

perturbação dos sistemas de DNA mediados pela patulina (PHILLIPS e HAYES, 1977).

Apesar de muitos resultados controversos a respeito dos efeitos tóxicos da patulina, os órgãos de saúde pública e de segurança de alimentos e os governos tem se preocupado com sua presença no suco de maçã. A importância do entendimento do mecanismo de ação das micotoxinas nos processos metabólicos dos organismos reside no fato de se tornar possível desenvolver métodos para controlar e prevenir a contaminação dos alimentos por estes metabólitos tóxicos (KIESSLING, 1986).

3.11.4. Limites Aceitáveis de Patulina em Maçãs e Derivados:

Segundo o estudo de Stolof, Egmond e Parks (1991), até o início da década de 90, o estabelecimento dos limites e regulações para micotoxinas pela maioria dos países do mundo não era baseada em dados de análise de risco, mas sim devido a limitações das metodologias e fatores de ordem econômica, como considerações práticas e requerimentos de comércio exterior.

A patulina pode ser considerada uma das micotoxinas mais reguladas a nível internacional (FAO, 2004).

Na determinação de limites máximos de patulina presente nos alimentos, deve-se levar em conta a adoção de boas práticas agrícolas e de fabricação, disponibilidade de métodos analíticos, disponibilidade de dados toxicológicos e dificuldades associadas à obtenção destes valores na prática (BHAT, 1999). Ainda de acordo com a FAO (2004) muitos países ao redor do mundo possuem regulamentação para patulina, sendo a maior parte para produtos de frutas tais

como, suco de maçã. A vasta maioria dos países com regulações para incidência de patulina nos alimentos estabeleceram o mesmo nível máximo (50 ppb) (44 países), no entanto, outros quatro países (Armênia, Lituânia, República Tcheca e China) estabeleceram limites de 5ppb, 25ppb, 30ppb e 100ppb, respectivamente.

Devido às evidências de efeitos adversos desta micotoxina, um nível máximo de 50 µg/L patulina nos sucos de frutas e produtos derivados é tolerado pelo *Codex Alimentarius* (CODEX, 2003a) (substituído pelo CODEX STAN 193, revisão 2006) e pelo FDA (FDA, 2001). Apesar de um nível máximo (50 µg/L) ser também tolerado pela União Européia para sucos de maçã, níveis de 25 µg/L e 10 µg/L foram estabelecidos para produtos de maçã sólidos e para sucos e alimentos destinados aos lactentes, respectivamente, segundo a regulação 1425/2003 (EUROPEAN UNION, 2003), o que demonstra maior rigidez com relação à presença desta micotoxina nos alimentos consumidos pela população daquele bloco econômico.

A determinação dos limites aceitáveis de patulina em cada derivado da maçã é baseada na quantidade do alimento ingerida diariamente e no peso corpóreo do indivíduo. A Organização Mundial de Saúde – OMS estabeleceu um limite provisional máximo de tolerância para ingestão diária (*Provisional maximum tolerance daily intake - PMT-DI*) de 0,4 µg / Kg de peso corpóreo, baseando-se em uma dose na qual efeitos adversos não são observados (*No observed adverse effect level - NOAEL*) de 0,3 mg / Kg de peso corpóreo / semana e um fator de segurança de 100. Como o nível de patulina em suco de maçã está geralmente abaixo de 50 µg / L a máxima ingestão tem sido estimada ser de 0,2 µg / Kg de peso corpóreo / dia para crianças e 0,1 µg / Kg de peso corpóreo / dia para adultos e estaria abaixo da ingestão tolerável estabelecida pelo “*The Joint FAO/WHO*

Expert Committee on Food Additives” - JECFA (WHO, 1996). Esta afirmação foi confirmada por Thuvander *et al.* (2001), que estudaram a exposição diária da população sueca a diversas micotoxinas, dentre elas a patulina. Os autores mostraram que se os sucos contaminados com patulina tem níveis não superiores a 50 µg / Kg, uma ingestão média de 8 e 4 ng / Kg de peso corpóreo são obtidas para crianças e adultos, respectivamente. Para aqueles que consomem maiores quantidades de suco, a ingestão é estimada em 24 e 11 ng / Kg de peso corpóreo, respectivamente, concluindo que a ingestão de patulina pela população sueca está bem abaixo do limite de 400 ng / kg de peso corpóreo estabelecido pelo JECFA (WHO, 1996).

Baseando-se nos resultados da reunião do JECFA (WHO, 1998), o consumo de 150 mL de suco de maçã contaminado com 50 µg / L de patulina por uma criança pesando 10 Kg levaria a uma ingestão de 7,5 µg de patulina; já o consumo de 200 mL deste suco de maçã por um criança pesando entre 10 a 20 Kg levaria a uma dose ingerida de 10 µg de patulina. Nos dois casos, a quantidade de patulina ingerida seria de 0,75 µg / Kg de peso corpóreo / dia e 1,0 µg / Kg de peso corpóreo / dia, respectivamente, e superaria a dose recomendada (0,4 µg / Kg de peso corpóreo / dia). Assim, limites de 25 µg / Kg para produtos sólidos e 10 µg / L ou Kg para sucos ou alimentos destinados à alimentação infantil foram estabelecidos pela Comunidade Européia (conforme descritos anteriormente) para proteger a saúde das crianças. Ainda é preciso se considerar que se o suco de maçã apresentar ocasionalmente elevada contaminação com a patulina, a PMT-DI pode ser superada, o que indica a necessidade de esforços continuados na prevenção e redução da contaminação dos alimentos por esta micotoxina.

No Brasil não há nenhuma regulação para os níveis de patulina em sucos de maçãs e seus derivados, sendo o limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1996; Codex, 2003). As indústrias exportadoras são também forçadas a atender os requisitos estabelecidos por seus respectivos importadores, reforçando e obrigando a adoção de práticas que permitam o controle da contaminação destes produtos.

Apesar da detecção da patulina ser feita em virtude dos diversos efeitos adversos causados por esta micotoxina, ela também é comumente usada como indicador da qualidade das frutas usadas para o processamento do suco. Todavia, de acordo com os resultados obtidos por Andersen, Smedsgaard e Frisvad (2004) uma amostra negativa para patulina nem sempre é um sinônimo de amostra livre de metabólitos fúngicos e como não se sabe se eles possuem ou não efeitos adversos em outros seres vivos, o uso da caetoglobosina A, um outro metabólito secundário de *P.expansum*, como indicador do crescimento de espécies toxigênicas deste microrganismo é sugerido para melhoria da qualidade e segurança dos derivados de maçã.

3.11.5. Métodos para Detecção da Patulina:

Para os vários estudos envolvendo a patulina como: incidência e estabilidade, entre outros, é necessário identificar e quantificar este analito, tornando-se essencial o desenvolvimento de métodos que tenham, entre outras características, sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, baixo custo e curto tempo de análise (IHA, 2006). A confiabilidade de um determinado método é determinada por suas características, como precisão, acurácia, detectabilidade,

sensibilidade e especificidade (EGMOND e PAULSCH, 1986). Enquanto os métodos de detecção e quantificação da patulina tem tido grande melhoria nos últimos anos, a sua sensibilidade é ainda um fator freqüentemente limitante em muitos aspectos da pesquisa sobre o controle desta micotoxina (MOAKE, PADILLA-ZAKOUR e WOROBO, 2005).

Atualmente, métodos analíticos rápidos não existem e a metodologia padrão para quantificação da patulina requer equipamentos específicos e operadores treinados (MOAKE, PADILLA-ZAKOUR e WOROBO, 2005). A utilidade de um método é determinada por suas características práticas, tais como aplicabilidade, custo, performance, tempo, equipamento e treinamento requeridos para sua execução (EGMOND e PAULSCH, 1986) e deve ser levada em consideração no desenvolvimento de metodologias com limites de detecção e quantificação cada vez menores. Esta necessidade por sua vez, provém do fato de haver uma tendência de se reduzir os limites aceitáveis (padrões) da patulina nos sucos e outros derivados de maçãs.

A escolha do método mais adequado para análise da patulina depende da finalidade do estudo e das condições do laboratório que executará as análises, principalmente quanto aos recursos disponíveis tais como equipamentos, materiais e reagentes, entre outros (IHA, 2006). Outros fatores são a diversidade das estruturas químicas das micotoxinas, a variação na composição dos materiais a serem analisados e as propriedades químicas e físicas da toxina e da matriz a ser analisada (EGMOND e PAULSCH, 1986).

Os métodos para detecção das micotoxinas e da patulina, em particular, podem ser classificados de acordo com a finalidade da análise, em métodos de

triagem e métodos presuntivos e de acordo com a abordagem, em biológicos e químicos. Os métodos de triagem foram desenvolvidos como parte da metodologia destinada à detecção de micotoxinas múltiplas, em diferentes substratos e sua importância reside no fato de se obter maior facilidade na determinação destas substâncias, além de seu custo ser mais baixo e da maior rapidez na sua execução. Os métodos presuntivos fornecem resultados confiáveis, devido ao emprego de técnicas de extração e purificação específicas para determinado substrato e para a micotoxina pesquisada. Os métodos biológicos oferecem a possibilidade de avaliação tanto de micotoxinas já identificadas quanto das não identificadas. Eles foram muito importantes no período de descoberta das aflatoxinas. Uma possível aplicação dos métodos biológicos é a avaliação da estabilidade das micotoxinas durante a fabricação de um determinado alimento, já que é plausível que os métodos químicos falhem em detectar uma micotoxina em particular se ela é convertida em outra substância tóxica durante o processamento. Já os métodos químicos são escolhidos caso se conheça a micotoxina a ser pesquisada, pois são mais específicos, rápidos, reprodutíveis e possuem menores limites de detecção e quantificação. Ao se comparar os métodos biológicos e químicos, os primeiros deveriam ser considerados preferenciais já que o objetivo final de sua aplicação é monitorar a presença nos alimentos de agentes perigosos aos sistemas biológicos. Todavia, como os métodos biológicos de detecção de micotoxinas apresentam uma série de desvantagens (menor reprodutibilidade, sensibilidade e rapidez) em comparação aos métodos químicos, existem poucas justificativas para sua aplicação na análise de alimentos. O uso dos métodos biológicos como testes confirmativos da presença de micotoxinas também não é mais justificado devido aos grandes

avanços observados nos últimos anos nas técnicas de química analítica, as quais fornecem resultados confiáveis e sensitivos para a grande maioria dos analitos (WATSON e LINDSAY, 1982; EGMOND e PAULSCH, 1986; MANCHISKY JR e MÍDIO, 1995).

Egmond e Paulsch (1986); Manchisky Jr e Mídio (1995); Trucksess (2000) e IHA (2006), citam que as etapas básicas para a detecção da patulina por métodos químicos a partir dos alimentos são as seguintes:

a) *Amostragem*: Pode ser considerada a mais importante parte do procedimento de análise e pode muitas vezes ser a principal fonte de erros;

b) *Preparo da amostra*: Requerido para algumas matrizes, como suco de maçã não clarificado, que pode formar emulsão na etapa de extração, o que não permite sua separação. Neste caso, recomenda-se pré-tratar a amostra com pectinase e posteriormente centrifugá-la. Para extração usa-se um volume de 5 mL do centrifugado;

c) *Extração*: Tem por objetivo a separação do componente de interesse da matriz do alimento através do uso de um solvente apropriado, com a obtenção dos materiais de interesse numa forma manejável. A escolha do solvente depende das características químicas da matriz e da toxina, sendo freqüentemente utilizadas misturas de solventes ou solventes com pequenas quantidades de água ou ácidos. No caso da patulina, os solventes (polares) mais utilizados são: acetato de etila, acetonitrila-água (9:1), acetonitrila-cloreto de potássio (9:1), acetonitrila-hexano (4:1) e isopropanol-acetato de etila (3:2);

d) *Limpeza ou purificação e concentração*: Pelo fato das micotoxinas estarem presentes em níveis muito pequenos nos alimentos, uma

forte etapa de concentração do extrato é normalmente necessária para tornar a detecção possível. A freqüente presença de lipídeos e outras substâncias que podem interferir na detecção final fazem a etapa de limpeza necessária antes da concentração. Esta purificação pode ser feita por coluna adsorvente, partição líquido-líquido e ou por co-precipitação das impurezas. A escolha do método de purificação (separação) pode depender do método usado para detecção e determinação, do limite de detecção requerido, da velocidade da análise e da recuperação esperada. As principais técnicas de purificação aplicadas à análise de patulina são: carbonato de sódio, coluna de celite, coluna Extrelut[®], coluna Sep-pak[®], coluna de sílica-gel, diálise, sulfato de zinco e ferrocianeto de potássio. Os extratos purificados são usualmente concentrados pela evaporação do solvente sob pressão reduzida num evaporador rotatório ou utilizando banho de vapor, mantendo o extrato sob arraste de nitrogênio. O resíduo é então redissolvido num pequeno volume de solvente e levado a um volume específico;

e) *Separação, detecção e quantificação:* Apesar da extração e limpeza, o extrato final pode ainda conter outras substâncias co-extraídas que podem interferir na detecção da micotoxina. Para separação da micotoxina da matriz do alimento, diversas técnicas podem ser usadas para permitir a sua determinação qualitativa e quantitativa. Dentre elas, destaca-se a cromatografia, sendo as técnicas de cromatografia em camada delgada (CD), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as que encontram aplicação. A cromatografia pode ser usada para quantificação, quando comparada a um padrão. Portanto, quando se utiliza a cromatografia é necessária a confirmação do pico cromatográfico, através de técnicas analíticas qualitativas ou quantitativas como espectrofotometria, reações específicas, entre outras. As

técnicas hífenizadas como cromatógrafo acoplado a um detector de espectrometria de massa ou detector de arranjo de diodo, vem sendo utilizadas para quantificação e confirmação da patulina.

Dentre as técnicas cromatográficas, a CD foi a primeira a ser empregada para detecção de patulina em suco de maçã, com a metodologia oficial aprovada pela AOAC, método 974.18, datando de 1974. Esta técnica tem como princípio, a extração da micotoxina presente no suco com acetato de etila e purificação do extrato em coluna de sílica gel. A patulina é detectada no eluato, após concentração, por CD, pulverizando-se com solução hidrocloreto de 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona (MBTH) (TRUCKSESS, 2000). A quantificação da patulina por comparação visual, não poderia ser realizada às custas da incipiente fluorescência emitida pela substância quando presente em placa cromatográfica em camada delgada. Para tanto, são utilizados os chamados intensificadores de fluorescência, que permitem melhor visualização ou agentes cromogênicos propriamente ditos (MANCHISKY JR e MÍDIO, 1995).

Apesar de ter prevalecido nos anos 70, a CD foi praticamente substituída nos últimos anos pela CLAE e numa menor extensão pela CG. Quatro são as razões para a substituição da CD principalmente pela CLAE: i) Por ser uma técnica tediosa e consumir muito tempo; ii) Pela necessidade de confirmação da micotoxina em virtude da pobre resolução devido à presença de co-extratos, como o 5-hidroximetilfurfural – HMF; iii) Por fornecer resultados semi-quantitativos; iv) Por não ser uma técnica suficientemente sensível, com limite de detecção em torno de 20 µg/L (KUBACKI e GOSZCZ - IUPAC, 1988). Além disso, o fato de a patulina diferir da maioria das micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona) e não emitir fluorescência torna sua identificação por CD mais complexa

100

(MANCHISKY JR, 1994). No entanto, esta técnica pode ser útil quando não se dispõe dos equipamentos necessários para utilização da CG e CLAE (EGMOND e PAULSCH, 1986).

A CLAE se tornou disponível para determinação de micotoxinas em alimentos no início dos anos 70 e se tornou rapidamente importante na determinação das micotoxinas, particularmente quando diversos tipos de colunas e detectores (fluorescentes) se tornaram disponíveis. A introdução de auto-amostradores e sistemas computadorizados de registros de dados tornaram a CLAE muito útil para análises em grandes escalas. Além disso, a possibilidade de acoplamento do equipamento de CLAE à um espectrômetro de massa pode possibilitar o uso deste último na confirmação das micotoxinas. Como limitações da CLAE, podem-se citar o elevado custo inicial do equipamento e a extensiva experiência requerida pelo operador para obter-se máximo benefício do sistema (EGMOND e PAULSCH, 1986).

Particularmente para determinação da patulina, estudos recentes têm demonstrado grande aplicação da CLAE acoplada com um detector de UV, já que esta toxina é relativamente polar e exibe um forte espectro de absorção (SHEPARD e LEGGOTT, 2000).

Atualmente as colunas em fase reversa são as mais utilizadas para detecção da patulina. Em virtude de seu baixo peso molecular e pela polaridade da molécula, a patulina somente é retida nas colunas de fase reversa pelo uso de fases móveis com elevado conteúdo aquoso, sendo a maioria delas misturas de água e acetonitrila (até 10%) ou água e tetrahidrofurano (até 5%) (SHEPARD e LEGGOTT, 2000).

A extração líquido-líquido vem sendo substituída pela extração sólido-líquido, principalmente pela necessidade de se reduzir o número múltiplo de etapas necessários na partição líquido-líquido e as grandes quantidades de solventes e reagentes usadas, os quais são caros e apresentam problemas de descarte (GÖKMEN, ACAR e SARIOGLU, 2005). Além disso, a etapa de evaporação presente na extração líquido-líquido tem uma influência negativa na reprodutibilidade do método de detecção da patulina (BOONZAAIJER, BOBELDIJK e OSENBRUGGEN, 2005), pelo fato de ser destruída quando acetato de etila úmido é desidratado (TRUCKSESS, 2000). A utilização de cartuchos à base de copolímeros macroporosos hidrofílicos-lipofílicos permite a extração, isolamento e purificação da patulina em até 7 minutos a partir de suco de maçã filtrado ou não, seguindo-se posteriormente a eluição, separação numa coluna de fase reversa e detecção no UV à 275 nm (TRUCKSESS e TANG, 1999). O método de extração em fase sólida também encontra aplicação na determinação da patulina em suco concentrado, com índices de recuperação maiores que 96% e um limite de detecção de 0,005 mg/Kg, sendo considerado rápido, confiável e barato (LI *et al.*, 2007).

A extração sólido-líquido da patulina pelo método da seringa-cartucho permitiu que o tempo entre a preparação da amostra e a determinação cromatográfica fosse menor do que 30 minutos e a redução de custos pode ser conseguida pelo uso de um cromatógrafo básico com bomba, sistema de injeção manual, detector e registrador (EISELE e GIBSON, 2003). Arranz *et al.* (2005) desenvolveram uma metodologia baseada na cromatográfica líquida e extração sólido-líquido para quantificação de patulina em produtos destinados para alimentação infantil. Através de um estudo intralaboratorial, os autores mostraram

que o método envolvia uma etapa rápida e simples de extração da patulina, sem a necessidade da remoção da pectina dos purês, permitindo a determinação da micotoxina em concentrações de 10 µg/Kg.

Com relação ao regime, o CLAE é normalmente operado no modo isocrático (SHEPHARD e LEGGOTT, 2000), sendo o preferido devido à sua simplicidade, conveniência, repetitividade das análises e menor custo por não necessitar de equipamentos especiais (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006). O regime de eluição por gradiente é usado quando se deseja separar impurezas, maior simetria para os picos cromatográficos, melhor resolução, detectabilidade e menor tempo de análise (TRUCKESS e TANG, 1999; SHEPHARD e LEGGOTT, 2000; JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006). Este regime evita a sobreposição dos picos de eluatos tardios com o pico da patulina numa subsequente injeção, apesar de exigir ao menos quinze a cinquenta minutos de acondicionamento da coluna antes de uma nova injeção e também é responsável por eluir substâncias apolares que poderiam danificar a coluna (TRUCKESS e TANG, 1999; IHA e SABINO, 2006). Além destas, outras limitações da eluição por gradiente são relacionadas aos tipos de detectores, tipos de cromatografia e por requerer o uso de solventes de alta pureza completamente desgaseificados (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006).

Em seu estudo, Iha e Sabino (2006) desenvolveram e validaram um método para detecção da patulina, com extração por uma mistura de acetato de etil-hexano e análise por CLAE com detector por arranjo de diodo. Limite de detecção de 3 µg/L e de quantificação de 7 µg/L foram obtidos, com uma recuperação média de 84,8%, comprovando a eficiência do método para ser usado em estudos de quantificação da micotoxina em suco de maçã. Além desta, outras vantagens

da técnica podem ser citadas, como a rapidez, praticidade, simplicidade e o fato da maioria dos solventes usados (exceto hexano) serem atóxicos. O detector de arranjo de diodo foi também utilizado por Kawashima, Soares e Massaguer (2002) quando uma metodologia para detecção de patulina e verruculógeno em polpa de tomate por CLAE foi desenvolvida. O método apresentou limite de detecção de 3 ng/g e 6 ng/g para verruculógeno e patulina, respectivamente, e os limite de quantificação foram 20 ng/g e 10 ng/g, respectivamente. De acordo com Jardim, Collins e Guimarães (2006), o detector por arranjo de diodos apresenta inúmeras vantagens, como: i) espectros tridimensionais, mostrando absorvância, comprimento de onda e tempo de retenção; ii) pelo fato de conhecerem-se os espectros de absorvância dos compostos presentes na amostra, pode-se selecionar o comprimento de onda de máxima absorvância, melhorando a detectabilidade e eliminando-se picos interferentes; iii) possibilidade de obter-se e armazenar-se o espectro de absorvância de cada pico durante a corrida; iv) possibilidade de determinação da pureza dos picos cromatográficos; v) possibilidade de redução do desvio da linha de base, bem como o ruído durante a eluição por gradiente.

Na detecção de patulina em sucos de frutas e derivados, o HMF (5-hidroximetilfurfural) é um interferente comum em sucos de maçã que pode sobrepor o pico da patulina. Desta forma, para se separar o HMF e a patulina, recomenda-se a seleção de diferentes colunas para realização da análise. Também se deve testar outras fases móveis de maneira a se otimizar as condições cromatográficas objetivando-se separar a patulina e o HMF. Se isto não é conseguido, a análise não deve ser realizada. Outra substância adicionada principalmente nos néctares de maçã e que pode levar a uma pobre

reprodutibilidade dos resultados analíticos é a vitamina C, já que esta vitamina parece reagir com a patulina (BRAUSE *et al.*, 1996, TRUCKSESS, 2000). Gokmen e Acar (1999) descreveram um método rápido, preciso, simples e econômico (requer menos reagentes) para determinação simultânea da patulina e HMF. O método resultou em completa separação dos dois compostos e consistiu de extração com acetato de etila e purificação do extrato com solução de carbonato de sódio, seguindo-se determinação CLAE em fase reversa usando uma mistura de água-acetonitrila (99:1, v/v) como fase móvel com uma vazão de 1,0 mL/min. As taxas médias de recuperação de HMF e patulina foram 94% e 103% e os limites de detecção foram < 0,01 mg/L e 5 µg/L, respectivamente.

Um resultado recente e muito importante observado durante a validação de metodologia para detecção de patulina por CLAE com UV foi reportado por Baert *et al.*, (2007). Os autores relataram que a formação de adutos entre a patulina e as proteínas presentes na parte sólida dos sucos não clarificados, o que faz com que até 20% da quantidade real da toxina presente numa amostra pode não ser detectada, levando a uma subestimação dos níveis verdadeiramente presentes. Também sugerem que pelo fato de não se ter dados sobre o efeito da patulina ligada à proteínas no trato intestinal, esta fração (até 20%) deveria ser incluída nos níveis reportados de contaminação como uma maneira de garantir a segurança dos consumidores, como forma de compensar a subestimação que pode ocorrer.

O emprego da cromatografia gasosa na análise de micotoxinas tem sido limitado devido ao fato da maioria das micotoxinas não serem voláteis e requererem derivação antes de serem analisadas por esta técnica. Adicionalmente o fato de muitas micotoxinas serem prontamente detectadas e determinadas em baixos níveis de concentração usando as técnicas de CD e CLAE, não tem

estimulado a sua aplicação na determinação destes analitos, encontrando, no entanto, grande aplicação na determinação dos tricotecenos (compostos que não têm propriedades fluorescentes e não absorvem na faixa do ultravioleta). No entanto, sua vantagem sobre as técnicas descritas anteriormente é o potencial uso de espectrômetros de massa como detectores altamente sensíveis e específicos (EGMOND e PAULSCH, 1986).

A detecção da patulina por CG normalmente envolve a derivação com trimetilsilila, com formação de éteres desta substância e posterior detecção por espectrômetro de massa ou detector de captura de elétrons (SHEPHARD e LEGGOTT, 2000). Rupp e Turnipseed (2000) propuseram a aplicação da CG acoplada ao espectrômetro de massa como técnicas para confirmação da patulina e do HMF em suco de maçã. A extração inicial da amostra seguiu a metodologia descrita pela AOAC, com recuperação da patulina e do HMF, sendo, todavia o extrato final derivatizado pelo uso de bistrimetilsilila trifluoroacetamida (BSTFA). Os compostos derivatizados são separados por CG e os analitos determinados/confirmados por espectrometria de massa usando uma fonte de impacto de elétrons.

A aplicação da técnica de ensaio de diluição de isótopo estável como padrão interno e CG/espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS) como método de detecção mostrou sensibilidade e seletividade adequadas para sua utilização em estudos fisiológicos, onde a determinação de quantidades traço da micotoxina são requeridas e as técnicas mais comuns como CLAE com UV não são capazes de detectar a patulina. A técnica descrita é capaz de detectar a patulina em níveis de até 12 ng/L e de quantificá-la em níveis de até 35 ng/L., com recuperação de 96% (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 1999).

A espectrometria de massa (MS) tem também encontrado aplicação na confirmação da presença da patulina quando acoplada a CLAE. A MS é uma técnica de elevada especificidade intrínseca e a adoção da técnica de MS-MS fornece uma seletividade adicional permitindo o aumento da sensibilidade como resultado da redução dos ruídos (SEWRAM *et al.*, 2000). Estes autores estudaram a aplicação da CLAE-MS-MS para determinação da patulina em suco de maçã e demonstraram a aplicabilidade da técnica para análise destes sucos, em virtude dos limites de detecção e quantificação de 4 µg/L e 10 µg/L, respectivamente encontrados.

Algumas amostras podem mostrar sinal no cromatograma da CLAE com o mesmo tempo de retenção da patulina, mas com um espectro no UV não equivalente. A aplicação da técnica de CG acoplada com espectrômetro de massa para confirmação da patulina foi estudada por Llovera *et al.* (1999). O uso do controle de pressão eletrônica e injeção na coluna evitaram a necessidade de derivação da micotoxina e permitiram uma análise sensível, com um limite de detecção de 4 µg/L. A não utilização da derivação resultou numa análise mais rápida e sem o perigo de se adicionar possíveis interferentes.

Além da cromatografia, técnicas como a eletroforese capilar (cromatografia capilar micelar eletrocínica) acopladas a detectores por arranjo de diodo, podem ter vantagens como baixo custo e facilidade de extração da patulina de sucos de maçãs. Apesar da técnica ter apresentado um limite de detecção de 3,8 µg/L, ainda não está bem difundida e tem como desvantagem o fato do equipamento ainda não estar disponível na maioria dos laboratórios (TSAO e ZHOU, 2000).

Os futuros desenvolvimentos na determinação de patulina serão provavelmente focados na confirmação de modo confiável de baixos níveis da micotoxina por espectrometria de massas e no desenvolvimento de anticorpos específicos para patulina, permitindo seu uso em ensaios do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*), e radioimunoensaios (radio-immuno-assay – RIA) e em colunas de imunoafinidade (EGMOND e PAULSCH, 1986; SHEPHARD e LEGGOTT, 2000). O desenvolvimento de métodos rápidos para detecção da micotoxina e que possam ser usados “*in-loco*” pelas indústrias de alimentos sem a necessidade de equipamentos complicados seria extremamente benéfico (MOAKE, PADILLA-ZAKOUR e WOROBO, 2005). Neste sentido, os ensaios imunológicos são técnicas promissoras, pela possibilidade de automação completa, tornando-se valiosas e rápidas técnicas de rastreamento quantitativo (EGMOND e PAULSCH, 1986). Em estudo recente realizado por Mhadhbi, Benrejeb e Martel (2005), foi demonstrado que somente 30% dos anticorpos policlonais de patulina (conjugado de patulina-hemiglutarato-albumina sérica bovina) foram específicos para a toxina livre, o que não foi suficiente para o desenvolvimento de um imuno-ensaio para a aplicação na análise de alimentos. Outra possível promissora aplicação das técnicas genéticas (*Polimerase chain reaction* – PCR) é a detecção de espécies fúngicas micotoxigências (PATERSON, 2006). Apesar de algumas limitações, como: i) contaminação pelo DNA de outros fungos presentes no ambiente; ii) possibilidade de resultados falsos positivos se genes inespecíficos são usados e iii) o fato de alguns genes serem compartilhados por mais de uma micotoxina (sterigmatocistina e aflatoxina) levando a uma superestimação da contaminação, a detecção de fungos potencialmente micotoxígenos por PCR pode permitir o estabelecimento de pontos críticos de

controle, resultando numa significativa vantagem para a indústria de alimentos e órgãos responsáveis pela segurança dos alimentos. Outra tendência no sentido do desenvolvimento dos métodos para análise de patulina a partir dos alimentos é a detecção simultânea de outros metabólitos e/ou micotoxinas com a patulina, o que pode ser uma boa ferramenta para melhoria da qualidade e segurança destes alimentos, conforme proposto por Andersen, Smedsgaard e Frisvad (2004).

Como se sabe, os sistemas de monitoramento e vigilância da qualidade e segurança dos alimentos importados podem ter um impacto significativo no comércio entre dois ou mais países. Os métodos de análises usados para determinar a conformidade de amostras de alimentos importados devem ser tais que o laboratório possa assegurar a confiança e equivalência dos resultados das análises que vem sendo feitas pelo país exportador. Este procedimento irá fornecer confiança nos programas de inspeção e controle de qualidade de ambos os países e facilitará o comércio internacional (LUPIEN e KENNY, 1998). Assim, a importância da adoção de métodos analíticos reconhecidos e validados internacionalmente pode ser destacada por impedir a utilização de limites de detecção e quantificação cada vez menores e nem sempre alcançáveis, como uma tática para dificultar o comércio exterior, o que iria a desencontre ao seu real papel, que é o de detectar níveis de contaminantes que representariam um risco à segurança dos alimentos destinados ao consumo humano.

3.11.6. Ocorrência de Patulina em Maçãs e Derivados:

A patulina tem sido principalmente encontrada em maçãs e produtos derivados e, ocasionalmente em outras frutas tais como pêras, abricós, pêsego e

uvas e é normalmente produzida nas partes apodrecidas destas frutas (CHERAGHALI *et al.*, 2005).

A ocorrência da patulina tem sido reportada ao redor do mundo, com elevados níveis sendo encontrados em alguns países, enquanto em outros, os níveis encontrados podem ser considerados baixos. Nos Estados Unidos da América, Brackett e Marth (1979) determinaram a concentração de patulina em 40 amostras de suco de maçã comercializadas à beira de estradas em Wiscosin. Os autores observaram que 43% das amostras continham menos que 10 µg/L da toxina, 30% continham entre 10 e 50 µg/L, e respectivamente, 10%, 8%, 8% e 3% das amostras continham entre 51-100 µg/L, 101-200 µg/L e 201-300 µg/L e > 300 µg/L de patulina, respectivamente. Na Austrália, Watkins, Fazekas e Palmer (1990) encontram que 74 (65%) de um total de 113 (100%) amostras de suco de maçãs analisados continham patulina. Em 33 amostras, as concentrações de patulina excederam o limite de 50 µg/L, sendo que em oito amostras, concentrações maiores que 300 µg/L com valores máximos entre 625 e 629 µg/L, foram encontrados. Também na Austrália, em 1992, Burda (1992) analisou 328 amostras de sucos de frutas e produtos derivados como molhos, purês, geléias, polpas e frutas em pedaços. A patulina foi detectada em 75 das 258 amostras de sucos de frutas e sucos concentrados com concentrações variando entre 5 e 50 µg/L e em 73 amostras, variando entre 51 e 1130 µg/L. Das 70 amostras que não sucos, a micotoxina foi detectada em 18 amostras a níveis abaixo de 50 µg/L. Prieta *et al.* (1994) avaliaram a incidência de patulina em sucos de maçã (100 amostras) e alimentos infantis (12 amostras). Os alimentos infantis foram livres de patulina, no entanto, 82% dos sucos apresentaram-se contaminados, sendo que

75% continham menos que 10 µg/L de patulina. A máxima concentração encontrada foi de 170 µg/L.

O estudo de Gokmen e Acar (1998) demonstrou que a contaminação dos sucos concentrados pode ser amplamente difundida e se torna uma fonte importante para ingestão da patulina a partir dos sucos de maçãs. A patulina foi detectada a partir de todas as amostras de suco concentrado de maçã analisados (215), em concentrações variando entre 7 a 376 µg/L, com 43,5% destas amostras apresentando concentrações maiores que 50µg/L e estando portanto, acima dos limites aceitáveis internacionalmente. A análise de patulina a partir dos sucos consumidos pela população turca (45 amostras), indicou que 60% das amostras continham a toxina em concentrações variando entre 19,1 e 732,8 µg/L, sendo que 44% das amostras continham níveis de patulina acima do limite de 50 µg/L permitido no país. A presença de níveis tão elevados indica que a patulina é um contaminante potencial nos sucos de maçãs produzidos na Turquia, sugerindo a adoção de mais controles durante as etapas de produção (YURDUN, OMURTAG e ERSOY, 2001). Uma possível explicação para os elevados índices de patulina nos sucos de maçãs comercializados na Turquia pode ser a utilização de maçãs com partes apodrecidas para o processamento, com a adoção de agentes de refino junto com carvão ativado durante a clarificação dos sucos para redução dos níveis de patulina no produto final (GÖKMEN e ACAR, 2000). No entanto, é preciso considerar-se que a melhor maneira de evitar-se a contaminação do produto final é o controle de qualidade da matéria-prima do que se tentar retirar a micotoxina durante a produção do suco.

Watanabe e Shimizu (2005) investigaram a incidência da patulina em 179 amostras de sucos de maçãs e 9 amostras de sucos mistos, contendo suco

concentrado de maçã como ingrediente, comercializados no distrito de Tohoku, Japão. Os autores observaram que das 179 amostras, 9 estavam contaminadas com a micotoxina, porém em concentrações não maiores que 15 µg/L, indicando que os sucos estavam em acordo com os limites de patulina estabelecidos para o produto no país. Na África do Sul, Leggot e Shepard (2001) conduziram uma pesquisa para avaliar a presença da patulina em produtos de maçãs em seis localidades diferentes. Vinte e três das trinta e uma amostras de sucos, não se apresentaram contaminadas por patulina e as oito amostras contaminadas continham quantidades de patulina variando entre 5 e 45 µg/L. Das 6 amostras de maçãs analisadas, um nível de 10 µg/g de patulina foi encontrado em duas. Das dez amostras de sucos para crianças, seis continham entre 5 e 20 µg/L da micotoxina, enquanto os purês de maçã para crianças mostraram níveis não detectáveis de patulina, indicando baixa incidência da micotoxina no país.

Um estudo sobre a contaminação com patulina no Irã, mostrou que 69% dos sucos de maçã e 78% dos sucos concentrados analisados (65 amostras), continham mais que 15 µg/L da micotoxina. Uma média de 33% e 56% das amostras de sucos de maçã e sucos concentrados continham níveis de patulina acima de 50 µg/L, com níveis máximos de 258 µg/L e 148 µg/L, respectivamente, (CHERAGALI *et al.*, 2005). Na Itália, Ritieni (2003) a partir da análise de 40 amostras de quatro diferentes produtos de maçãs (sucos de maçã – n=21, purês de maçãs – n=6, vinagre de maçãs – n=3, alimentos infantis – n=10), encontrou que onze amostras continham níveis detectáveis de patulina com concentração variando entre 1,4 e 74,2 µg/L e uma média de 26,7 µg/L. Todas as amostras de vinagre foram negativas para a micotoxina e das amostras de alimentos infantis, duas apresentaram-se contaminadas com 17,7 e 13,1 µg/L de patulina,

respectivamente, indicando baixa incidência da patulina no país (2 amostras positivas de 10 analisadas) e sendo um parâmetro claro para se considerar o uso de frutas e do processo de alto padrão. Spadaro *et al.* (2006) analisaram 53 amostras de suco de maçã e 82 amostras de sucos mistos contendo suco de maçã, encontrando a toxina em 34,8% das amostras, em concentrações variando entre 1,58 e 55,41 µg/L, sendo que somente uma amostra ultrapassou o limite de 50 µg/L estabelecido pela legislação da Comunidade Européia. Estes autores puderam também observar que quanto maior a proporção de suco numa bebida, maior a média de contaminação pela patulina, com bebidas contendo mais que 50% de suco, tendo uma média de 11,26 µg/Kg da toxina e aqueles com menos que 50% de suco, tendo uma média de 3,35 µg/Kg da toxina. Piamontese, Solfrizzo e Visconti (2005) associaram aos produtos orgânicos tanto maior incidência (45% *versus* 26%) quanto níveis médios de patulina (4,78 *versus* 1,15 µg/L), ao se comparar com produtos convencionais.

Na Holanda, somente uma de 63 amostras apresentaram contaminação acima do limite de detecção (25 µg/Kg) (BOONZAAIJER, BOBEDIJK e OSENBRUGGEN, 2005). Apesar do resultado demonstrar baixa incidência da micotoxina nos sucos comercializados no país, deve-se considerar o elevado limite de detecção do método utilizado, sendo mais prudente afirmar que a maioria das amostras tem seus níveis de patulina abaixo do limite de detecção do método do que a baixa incidência, o que poderia ser afirmado com um limite de detecção mais baixo. Na Suécia, Thuvander *et al.* (2001), analisaram 100 amostras de suco de maçã e sopa de blueberry e a patulina somente foi detectada em cinco amostras de suco de maçã em concentrações sempre menores que 50 µg/Kg. Na Bélgica, a análise de bebidas à base de maçã, indicou que nenhuma das 50

amostras apresentavam-se contaminadas com níveis de patulina acima dos 50 µg/L estabelecidos pela Comunidade Européia. Os níveis de patulina foram comparáveis nas amostras de sucos nacionais e importadas, com concentrações médias de 9,0 µg/L e 3,4 µg/L, respectivamente, para sucos e sidras (TANGNI *et al.*, 2003). Já Baert *et al.* (2006) analisando 177 amostras de sucos de maçã de orgânicos (65), convencionais (90) e artesanais (22), detectaram a patulina em 22 amostras (12%) e quantificaram em 10 (6%), com o limite de 50 µg/L sendo ultrapassado em somente duas das amostras de sucos orgânicos. Apesar disso, a incidência de patulina nos produtos orgânicos (12%), convencional (13%) e artesanais (10%), não diferiu significativamente, com uma maior concentração média sendo observada nas amostras orgânicas (43,1 µg/L) do que nas convencionais (10,2 µg/L) e artesanais (10,5 µg/L).

Na França, Leblanc *et al.* (2005), ao analisarem diversas amostras de derivados de maçãs, obtiveram que 16 delas continham níveis da toxina abaixo do limite de detecção do método; duas amostras compostas (suco de maçã concentrado e sidra de maçã), continham a patulina em níveis entre o limite de detecção e 50 µg/L e níveis de 60 µg/L e 100 µg/L foram encontrados, respectivamente, nas amostras compostas (torta e sonho de maçã), estando estas amostras em desacordo com os limites estabelecidos pela legislação européia, que estabelece um padrão de 25 µg/Kg para estes produtos, demonstrando ser a ocorrência da micotoxina em produtos derivados da fruta amplamente difundida.

No Brasil, estudos têm demonstrado que a incidência desta micotoxina em sucos de frutas, principalmente de maçã, é baixa. Manchisky e Mídio (1996) analisaram 73 amostras de sucos de maçã disponíveis no mercado brasileiro (região sudeste), encontrando uma média de contaminação das amostras de 21%,

sendo que 14 amostras, tiveram a concentração variando na faixa de 6,4 a 34,8 $\mu\text{g/L}$ e uma amostra extrapolando o limite estabelecido pela OMS (50 $\mu\text{g/L}$), com uma quantidade de 77, 5 $\mu\text{g/L}$. Sylos e Rodriguez-Amaya (1999) avaliaram a incidência de patulina em 111 amostras de sucos de frutas (maçã, uva, abacaxi, mamão, banana, manga e goiaba) e em 38 amostras de frutas deterioradas (maçã, mamão, manga, pêra e pêsego) e verificaram que somente uma das 30 amostras de suco de maçã foi positiva para a patulina ao nível de 17 $\mu\text{g/L}$. A patulina não foi encontrada nos outros sucos de frutas, mas foi encontrada em 14 amostras de frutas deterioradas, como a maçã (entre 150-267 $\mu\text{g/Kg}$), pêra (entre 134-245 $\mu\text{g/Kg}$) e pêsego (92-174 $\mu\text{g/Kg}$). Prado *et al.* (2000) relataram que a partir de 13 amostras de suco de maçã comercializadas em Belo Horizonte – MG, a patulina somente foi detectada a partir de uma amostra, com uma concentração de 10 $\mu\text{g/L}$. Celli *et al.* (2006) verificaram a incidência da patulina em 38 amostras de sucos de maçãs comercializados no estado do Paraná e não detectaram a micotoxina em nenhuma delas, sugerindo a utilização de matérias-primas de boa qualidade e / ou instabilidade da micotoxina na presença de sulfitos, já que 75% das amostras eram sulfiteadas. Iha & Sabino (2007) avaliando a incidência de patulina em bebidas à base de maçã (63 amostras de néctars de maçã, 27 amostras de suco de maçã, 10 amostras de néctar clarificado de maçã e 34 amostras de bebida à base de soja), encontraram que somente quatro amostras (3%) estiverem contaminadas com patulina. As quatro amostras (uma de néctar não clarificado e 3 de suco de maçã) continham níveis de patulina que variaram entre 3 e 7 $\mu\text{g/L}$. Apesar da baixa incidência de patulina em sucos / néctar de maçã no Brasil, é importante considerar-se a natureza heterogênea da contaminação dos alimentos pelas micotoxinas, o que leva a necessidade da

adoção de procedimentos bem definidos de amostragem e análises para a obtenção de resultados realmente representativos.

3.11.7. Efeito das Etapas do Processo do Suco de Maçã sobre a Patulina:

A incidência da patulina em amostras de sucos de maçãs e produtos à base de maçãs ao redor do mundo, indica que a micotoxina é estável em algum grau às etapas durante o processo de fabricação destes produtos. Neste sentido, diversas medidas de natureza química, física ou biológica têm sido propostas para controlar / impedir a produção da patulina desde a colheita das frutas e / ou reduzir seus níveis durante as diversas etapas do processo de fabricação do suco. Algumas técnicas encontram-se já sendo aplicadas nas indústrias de alimentos e outras podem ser consideradas técnicas em potencial para o controle da patulina no suco de maçã e derivados. A eficiência de cada uma destas medidas pode ser considerada dependente das técnicas utilizadas e do treinamento e controles exercidos durante sua aplicação. A seguir, são apresentados os efeitos de cada etapa da fabricação do suco de maçã sobre os níveis da patulina no produto final.

a) Pré-colheita e colheita:

Apesar da patulina ocorrer principalmente em frutas atacadas pelos fungos, a presença dos bolores não necessariamente indica que a micotoxina estará presente na fruta, já que nem sempre o crescimento fúngico é visível externamente. Em alguns casos, pode ocorrer o crescimento interno dos fungos como resultado de invasões por insetos ou outros tipos lesões que resultam na

ocorrência de patulina na fruta que externamente parece saudável. Apesar dos esporos de muitos dos bolores capazes de produzirem patulina estarem presentes nas frutas enquanto elas estão nas árvores, eles não irão crescer geralmente até que as frutas sejam colhidas. Todavia, o crescimento dos bolores e produção da patulina pode ocorrer nas frutas na pós-colheita se estas são afetadas por doenças ou por danos causados por insetos ou ainda quando frutas caídas no chão são usadas para o processamento (CODEX, 2003).

Para garantir a qualidade das maçãs usadas para o processamento do suco, na pré-colheita algumas medidas merecem destaque, como a remoção e destruição de frutas ou madeira apodrecidas; o espaçamento adequado entre as árvores para permitir boa penetração do ar e luz entre as mesmas; o controle de pragas e doenças os quais podem diretamente causar podridão das frutas ou ser sítio de entrada para bolores produtores de patulina; a aplicação de fungicidas para prevenir a germinação e crescimento de fungos durante e após a colheita; o uso de fertilizantes à base de cálcio e fósforo na plantação para melhorar a estrutura celular e reduzir a susceptibilidade à podridão das frutas; não estocagem de frutas com composição mineral pobre por longos períodos (mais que 3-4 meses), por sua maior susceptibilidade a desordens fisiológicas e podridões, como as causadas por *Gloeosporium* e *Penicillium* spp; a manutenção de registro dos índices de podridão para cada pomar, pois os dados históricos são os melhores guias, até o momento, para indicação da necessidade da aplicação de fungicidas e potencial de estocagem das frutas (CODEX, 2003).

Na colheita e transporte, os cuidados devem ser tomados de maneira a evitem-se danos às frutas, independentemente se estas se destinam ao processamento, estocagem e posterior processamento ou para o mercado de

consumo da fruta fresca. A importância do manuseio adequado com o intuito de se evitar lesões nas maçãs durante as etapas anteriores ao processamento foi demonstrada por Marin *et al.*, 2006, os quais observaram que a concentração de patulina em ambas as porções (deterioradas e sãs) das maçãs é dependente do diâmetro das lesões presentes. Assim, quanto piores as práticas antes do processamento, menores as probabilidades do produto final estar dentro do limite internacional estabelecido para esta micotoxina. A não detecção da patulina no suco obtido de maçãs colhidas diretamente das árvores e a detecção de níveis entre 40,2 e 374 µg/L nos sucos de maçãs colhidas no solo (JACKSON *et al.*, 2003), corrobora a importância da colheita na qualidade do produto final. Para as frutas colhidas mecanicamente, que são obtidas pela agitação das árvores e coleta das frutas do solo com máquinas apropriadas, alguns cuidados devem ser tomados: remoção das frutas caídas no solo anteriormente à colheita mecânica para que somente frutas frescas ou sãs serão coletadas; transporte das frutas coletadas às plantas de processamento em até três dias e limpeza de todos os containers usados para o transporte; colheita separada de frutas de pomares com elevados níveis de podridão, não devendo estas frutas ser consideradas para estocagem; colheita das frutas preferencialmente durante a estação seca sendo colocadas em bins e mantidas ao abrigo da chuva; seleção e rejeição de frutas com lesões, com a polpa exposta ou com sinais de alguma doença (CODEX, 2003). Além destas medidas, a colheita das frutas no estágio adequado de maturação, pode reduzir grandemente o índice de podridões, pelo fato das frutas estarem mais firmes e menos susceptíveis aos ferimentos mecânicos, considerando-se estes o principal ponto de entrada de *Penicillium* (BONETI & KATSURAYAMA, 1998).

O principal objetivo da seleção durante colheita, é a diminuição da incidência da patulina, pela exclusão de frutas apresentando sinais aparentes de podridão. Se esta seleção não é realizada nesta etapa, o resultado será um grande aumento da produção de patulina nas etapas de transporte e estocagem. Assim, uma redução das maçãs visivelmente mofadas ou apresentando algum tipo de lesão a um nível menor que 1% é recomendado (FAO, 2003).

b) Transporte:

No transporte de curta duração, o risco de aumento da contaminação com patulina é baixo, porém qualquer dano físico que as frutas sofram durante esta etapa, incluindo-se a carga e descarga, aumentará sua sensibilidade a uma infecção posterior pelos fungos (FAO, 2003).

Como já são conhecidos, os fungos são amplamente difundidos pelo ambiente e os esporos potencialmente produtores de patulina podem sobreviver por longos períodos nos containers (LITTLE e HOLMES, 2000). Desta forma, como as frutas pomáceas são geralmente retiradas dos containers pelo descarregamento com água, seguindo-se estocagem por longos períodos com tratamento anterior pela imersão ou aspersão com soluções de inibidores de queimaduras pelo frio e fungicidas, a disseminação dos conídios de *P.expansum* nos aspersores ou nos tanques de água de transporte das frutas, pode facilmente ocorrer (SPOTTS e CERVANTES, 1986; SANDERSON e SPOTTS, 1995; NERI *et al.*, 2006), o que demonstra a importância da adoção de medidas de higiene objetivando-se controlar a contaminação por fungos nestes sistemas.

c) *Estocagem:*

Em diversos países do mundo, inexistem pomares nos quais as frutas são destinadas exclusivamente para processamento. O que ocorre é a utilização de maçãs não aprovadas pelos rigorosos critérios de seleção para o mercado consumidor das frutas frescas para o processamento do suco. Por isto, as maçãs após a colheita podem ser destinadas diretamente ao processamento do suco ou ao mercado consumidor da fruta fresca, enquanto a outra porção é destinada à estocagem para posterior comercialização durante a entressafra, sendo as frutas novamente rejeitadas pelo controle de qualidade para o mercado consumidor das frutas frescas destinadas ao processamento do suco.

Penicillium expansum apresenta características psicrotróficas, crescendo e produzindo a patulina sob refrigeração. Com relação à estocagem refrigerada, Taniwaki, Bleinroth e De Martin (1989) encontraram que *P.expansum* foi capaz de produzir a patulina em maçãs armazenadas a 25°C e 4°C, a partir de 20 e 90 dias. Concentrações de 310 µg/L e 300 µg/L foram detectadas, após 30 e 120 dias de estocagem à 25°C e 4°C, respectivamente. Morales *et al.* (2006), não detectaram a patulina após 6 semanas quando as frutas foram estocadas sob refrigeração (1°C), apesar de lesões em virtude do crescimento do fungo terem sido observadas.

Já com relação à estocagem sob atmosfera controlada, *P.expansum* 1071 foi capaz de crescer e produzir patulina quando as maçãs foram armazenadas sob atmosfera contendo 1% e CO₂, 3% de O₂ e 96% de N₂) à temperatura de 0,5°C e umidade relativa maior que 90%, sendo, no entanto, a quantidade produzida da micotoxina menor no armazenamento sob atmosfera controlada (0,5 µg/mL, em média) do que no armazenamento sob refrigeração somente (2,5 µg/mL, em

média). Já a cepa *P.expansum* NRRL 973 foi capaz de produzir a patulina (3,0 µg/mL, em média) somente quando as maçãs foram estocadas sob refrigeração sem atmosfera controlada (LOVETT, THOMPSON e BOUTIN, 1975), o que demonstra diversidade com relação às cepas de *Penicillium expansum* e sua capacidade de produzir a patulina nas maçãs estocadas sob atmosfera controlada. Em um estudo mais recente, algumas cepas de *P.expansum* foram capazes de crescer e produzir a patulina a 0°C, 3°C, 6°C, 17°C e 25°C, mas não quando a atmosfera continha 3% CO₂ / 2% O₂ (25°C). Com 3% CO₂ / 10% O₂ e 3% CO₂ / 20% O₂ a produção da micotoxina ocorre, demonstrando que o ratio CO₂/O₂ deve ser mantido através do período de estocagem, já que qualquer aumento na concentração de O₂ pode ser seguido da formação da patulina por alguma espécie fúngica (PASTER, HUPPERT e BARKAI-GOLAN, 1995). Como a estocagem das frutas até o processamento pode durar até 12 meses, dependendo da condição de estocagem (refrigeração ou atmosfera controlada), conclui-se que quanto maior a porcentagem de frutas deterioradas num lote armazenado, maior será a quantidade de patulina nos produtos derivados.

As limitações de espaço e financeiras para estocagem refrigerada e/ou sob atmosfera controlada das frutas, força algumas vezes sua estocagem ao ar livre por períodos consideráveis de tempo (SYDENHAM *et al.*, 1995), levando a sérias implicações nos níveis de patulina. Em seu estudo, Sydenham *et al.*, 1997, encontraram que a concentração de patulina nas maçãs estocadas ao ar livre aumentou com os dias de estocagem. Uma concentração média de 90 µg/L foi obtida após 7 dias de estocagem, 395 µg/L após 15 dias de estocagem e 2445 µg/L após 33 dias de estocagem, com as partes apodrecidas das frutas contendo uma quantidade média de patulina de 1120 µg/L, 2525 µg/L e 6235 µg/L,

respectivamente, aos 7, 15 e 33 dias de estocagem, indicando que quanto maior o tempo de estocagem, maiores as probabilidades de que as quantidades de patulina ultrapassem o limite estabelecido no suco pronto. A estocagem das maçãs antes do processamento é considerada um ponto crítico de controle na fabricação do suco e desta forma, um limite crítico de 48 h é recomendado para se controlar a produção da patulina no produto (FAO, 2003). Apesar de Morales *et al.* (2007b) terem encontrado que um aumento significativo na acumulação de patulina somente ocorre após 48 h de estocagem a 20°C (simulando a estocagem aberta), o estabelecimento e utilização deste limite crítico deve ser considerado dependendo da qualidade das frutas e outros fatores como temperatura e condições de umidade relativa, quando se for usar a estocagem aberta. Considerando que o tempo em que as frutas são mantidas à temperatura ambiente é mais importante para produção da patulina do que o tratamento pós-colheita (MORALES *et al.*, 2006) recomenda-se que este tipo de estocagem seja reduzido tanto quanto possível. No entanto, considerando-se que é freqüentemente impossível colher as frutas e processá-las imediatamente, a avaliação da sua qualidade antes da estocagem é indicada como a principal medida para prevenir a acumulação da patulina (MORALES *et al.*, 2007b).

Como as estocagens sob refrigeração e atmosfera controlada por si só não conseguem impedir o crescimento e produção de patulina, outros tratamentos adicionais tem sido estudados, dentre elas, a aplicação de agentes fungicidas. A aplicação de fungicidas à base de benzimidazol e de inseticidas organofosforados (DRAUGHON e AYRES, 1980), foi abandonada por questões de segurança e adaptação dos fungos. Morales *et al.*, (2007a) reportaram que a eficiência de uma mistura de folpet e imazalil (agentes antifúngicos comumente usados em

packinghouses para prevenir a podridão azul) é dependente das condições de maturidade das frutas, sendo seu efeito no controle das lesões somente observado para as frutas maduras, apesar da produção de patulina ter sido independente da aplicação do tratamento com fungicida na pré-estocagem, sugerindo ser o tempo em que as maçãs permanecem fora da estocagem refrigerada crítico para a produção da micotoxina, confirmando o efeito aditivo da aplicação dos fungicidas com estocagem sob refrigeração e atmosfera controlada.

Errampali (2004); Errampali *et al.* (2005) usaram o fungicida fludioxinil como um tratamento não somente preventivo, mas também curativo para maçãs já infectadas por *P.expansum*. Segundo Neri *et al.* (2006), vapores de trans-2-hexenal (um componente do aroma de muitas frutas e vegetais) com uma concentração de 12,5 µg/L pode ter potencial para controlar os bolores azuis, conteúdo de patulina e a qualidade da maçã, variedade Golden Delicious e também uma atividade curativa, com redução significativa das infecções por *P.expansum*. No entanto, sintomas fitotóxicos, desenvolvimento de *off-flavours*, atividade fungicida e de controle da produção da patulina variados foram observados dependendo da variedade da fruta.

As restrições com relação à toxicidade dos fungicidas têm estimulado a busca por agentes alternativos de controle, como os sanitizantes, agentes naturais, agentes biológicos ou suas combinações. Hasan (2000) obteve completa inibição do crescimento e produção da lesão à 25°C nas maçãs infectadas por *Aspergillus alternata*, *A.flavus*, *A.niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium sp*, *P.expansum* e *Rhizopus stolonifer* utilizando imersão em solução de hipoclorito de sódio 3% por 5 minutos. Chen, Ingham e Ingham (2004), reportaram que concentrações entre 2-5% de ácido acético, após a higienização, foram eficientes

sanitizantes contra *P.expansum* nas maçãs, por inibirem completamente o fungo e a conseqüente produção de patulina, durante estocagem à 25°C / 7 dias. Para sua aplicação industrial, se o tempo de contato apropriado é assegurado, uma concentração de 2% poderia ser aplicada às maçãs em um tanque de imersão por 1 minuto, enquanto a uma concentração de 5%, poderia ser aplicada nas frutas através de bicos de aspersão, ambos sem enxágüe antes da estocagem. Apesar da falta de dados provando a eficiência destes agentes durante a estocagem das frutas, os dados podem indicar que estes agentes podem ser considerados como alternativas mais baratas e seguras para prevenir ou controlar a produção da patulina durante o período posterior à remoção das frutas da refrigeração até que elas sejam processadas.

Utilizando-se o conceito de tecnologia de barreiras e pelo fato das frutas permanecerem estocadas por até 12 meses (dependendo da variedade e condições) antes de serem processadas, a combinação da desinfecção das frutas antes da estocagem com ácido acético e posterior tratamento com fungicida (que apresenta efeito mais prolongado), no entanto, com menores concentrações, parece ser uma alternativa promissora para quando grandes quantidades de maçãs forem ser estocadas.

O controle através de agentes naturalmente presentes nos alimentos foi utilizado por Hasan (2000), o qual comprovou completa inibição da produção da patulina por *P.expansum* usando 0,2% de óleo essencial de limão. Uma inibição de 90% foi obtida usando-se 0,05% e 0,2% de óleos essenciais de limão e laranja, respectivamente. O controle biológico da deterioração pós-colheita causado por *P.expansum* e *Botrytis cinerea* em maçãs foi obtido por Calvo *et al.* (2006), utilizando-se a bactéria *Rahnella aquatilis*, que foi capaz de causar reduções

variadas na incidência da doença e da severidade (diâmetro médio da lesão) desenvolvidos por estes microrganismos à 28°C, à 15°C e à 4°C, além de inibir completamente a germinação dos fungos *in vitro*. Uma combinação de tratamento térmico, infiltração de cálcio e controle biológico (*Pseudomonas syringae*) mostrou-se eficiente para controlar o crescimento de *P.expansum* em maçãs (CONWAY *et al.*, 1999).

Apesar de algumas técnicas descritas anteriormente serem efetivas para redução da incidência da podridão azul e da patulina, a maioria apresentam limitações de custos e/ou de aplicabilidade prática. Uma alternativa que evita a aplicação de quaisquer agentes nas frutas, sendo também mais barata, de mais fácil aplicação e que pode controlar a produção da patulina e crescimento de *P.expansum* durante a estocagem e transporte é o armazenamento das maçãs em embalagens de polietileno de baixa densidade (PEBD) com ou sem atmosfera modificada, conforme estudo de Moodley, Goviden e Odhav (2002). Eles observaram que a embalagem em PEBD foi capaz de reduzir a produção de patulina em 99,5% e o crescimento fúngico em até 68% em relação às maçãs não embaladas, mesmo sem a utilização de atmosfera modificada e com temperatura de estocagem de 25°C por 14 dias, parecendo ser uma alternativa ao uso de fungicidas durante a estocagem das frutas. Ao se utilizar atmosfera modificada, 88% CO₂/ 12% N₂, a quantidade de patulina produzida foi reduzida em até 99,97%.

A importância da qualidade das frutas desde a colheita, evitando-se a utilização daquelas colhidas do solo e de sua cuidadosa seleção para o processamento e sua influência na etapa de estocagem sobre a qualidade final do suco de maçã foram demonstradas por Jackson *et al.*, 2003. Os autores

reportaram que quando as frutas foram estocadas (0-2°C por 4-6 semanas), a patulina não foi detectada no suco quando as maçãs passaram anteriormente por uma seleção cuidadosa, mas níveis entre 0,97 a 64,0 µg/L foram detectados quando as frutas não selecionadas foram mantidas nas mesmas condições. Níveis de patulina entre 0 a 15,1 µg/L e 59,9 a 120,5 µg/L, para frutas selecionadas e não selecionadas, respectivamente, foram obtidas quando a estocagem sob atmosfera controlada (condições não conhecidas) foi utilizada.

Para manter a qualidade interna e externa da fruta, o funcionamento regular das câmaras frigoríficas deve ser assegurado por meio da observação periódica dos equipamentos de refrigeração e controle de gases (atmosfera controlada) (GIRARDI e BENDER, 2003), assim como sua higiene deve ser assegurada. A desinfecção das câmaras frias pode ser feita por lavagem com detergente e água quente sob pressão, seguindo-se desinfecção com pulverização de solução de hipoclorito de sódio (0,025%), paratolueno cloro sulfamida sódica (DUP) (0,015%) ou termonebulização com digluconato de clorohexidina (0,02%) (SANNHUEZA, 1996). Adicionalmente, a realização de controles periódicos mensais da qualidade, através de análises laboratoriais de amostras de 20 a 50 frutas, permite prognosticar o potencial e a duração do período de conservação, avaliar a evolução de problemas de qualidade observados no início do armazenamento, observar a reação das frutas às condições de armazenamento, verificar o comportamento das diferentes cultivares ou lotes em relação às características externas de maturação (murchamento, podridões, distúrbios fisiológicos) e determinar a qualidade interna e externa das frutas através de análises laboratoriais (sólidos solúveis totais, firmeza de polpa, acidez) (GIRARDI e BENDER, 2003). Assim, se condições bem estabelecidas de estocagem não

forem adotadas, grandes quantidades da micotoxina podem ser produzidas e certamente grandes quantidades poderão estar presentes durante as etapas posteriores de industrialização do suco.

d) Recepção das Frutas:

A monitoração da qualidade das frutas na sua recepção pode ser considerada a primeira medida de controle da patulina aplicada efetivamente pela indústria processadora do suco. Isto pode ser feito pelo estabelecimento de critérios de compra levando-se em conta a incidência máxima de doenças e lesões nas frutas.

A recepção de lotes de frutas com a menor taxa possível de podridão, é de extrema importância para evitar-se a contaminação das frutas sãs. Nesta etapa, lotes de maçãs que apresentem qualidade inferior (elevada proporção de frutas com danos ou podres), não devem ser aceitas para o processamento, já que seria muito difícil selecionar a mão as maçãs de um lote com uma média de frutas podres maiores que 10% e atingir-se um nível aceitável de patulina no produto final, em virtude das elevadas concentrações da micotoxina provavelmente presentes nestes lotes (FAO, 2003).

e) Lavagem das Frutas:

Uma redução significativa dos níveis de patulina na etapa de lavagem das maçãs foi obtida por Sydenham *et al.* (1995), que reportaram que o nível médio da micotoxina foi reduzido de 920 ppb após a estocagem aberta para 190 ppb após a lavagem (redução de aproximadamente 80%). Em 1997, Sydenham *et al.* (1997), observaram que a quantidade de patulina nas frutas não processadas estocadas

ao ar livre atingiu 90 ppb após 5 dias, 395 ppb após 15 dias e 2245 ppb após 33 dias, mas diminuiu após a valores de 75 ppb, 100 ppb e 695 ppb, respectivamente, após a etapa de lavagem. Acar, Gökmen e Taydas (1998) reportaram que a lavagem com água sob alta pressão (valor não informado pelo autor) foi capaz de reduzir os níveis de patulina no suco de maçã em até 54%. Jackson *et al.* (2003), demonstraram que a lavagem das frutas (imersão em tanques contendo as soluções de lavagem por 2 minutos, sem agitação) foi capaz de reduzir os níveis de patulina entre 10% e 100%, dependendo da quantidade inicial da micotoxina nas maçãs. A eficiência da solução de lavagem utilizada (água potável, água potável com 100 ppm ou 200 ppm de cloro ativo) também foi afetada pelo nível inicial da patulina nas frutas, já que com uma contaminação inicial (média) de 20 µg/L, a toxina foi reduzida à valores (em média) de 5 µg/L no suco e quando as maçãs estavam altamente contaminadas (aproximadamente 350 µg/L), a lavagem demonstrou-se incapaz de reduzir os níveis de patulina para valores abaixo de 50 µg/L, independentemente do tipo de solução utilizada.

Devido às diversas limitações do uso dos agentes clorados no controle de patógenos pós-colheita (sensibilidade à matéria orgânica e elevado poder corrosivo), (CHEN, INGHAM e INGHAM, 2004), a escolha e aplicação de outros agentes coadjuvantes na lavagem das frutas e seu efeito sobre a patulina, ainda permanecem como um campo interessante de estudos. Todavia, os estudos com outros agentes coadjuvantes de lavagem devem ser baseados não somente na sua eficiência, mas também em questões como custos, aplicabilidade prática (segurança e poder corrosivo) e contaminação do meio-ambiente pelos resíduos derivados.

Apesar da etapa de lavagem sob água pressurizada poder ser considerada como uma boa medida para o controle da patulina, é insuficiente para eliminar totalmente a toxina, já que somente é capaz de remover as partes apodrecidas das frutas (MARIN *et al.*, 2006). Nesta etapa, a redução da população fúngica também tem sido relatada (SYDENHAM *et al.*, 1995, SYDENHAM *et al.*, 1997), o que pode resultar na redução da formação de lesões e podridões durante a estocagem ou entre a lavagem e a prensagem na indústria. Por outro lado, como a etapa de lavagem resulta na remoção de áreas apodrecidas, a introdução da patulina e dos esporos fúngicos e sua suspensão e dispersão na água de limpeza (SYDENHAM *et al.*, 1995) e nos aerossóis durante a lavagem poderá levar ao aumento do risco de proliferação dos fungos, se a higiene das instalações e o ar não for cuidadosamente monitorada e assegurada. A importância da higiene nesta etapa reside no fato dela exercer um impacto direto na qualidade das frutas, caso o armazenamento a granel seja utilizado na unidade processadora até a prensagem e extração do suco.

f) Estocagem das Frutas na Indústria:

Idealmente as maçãs devem ser mantidas sob refrigeração (<10°C), durante o tempo de estocagem na indústria até serem processadas. Quando o armazenamento sob refrigeração não for possível, a estocagem à temperatura ambiente não deve ser maior que 48 h (FAO, 2003). A adoção destas medidas pode ser considerada adequada para o controle da podridão e conseqüente produção da patulina ao se tomar como base o estudo realizado por MORALES *et al.* (2007a), os quais reportaram que mesmo após estocagem prévia por 6 semanas à 1°C, a patulina somente foi detectada (em quantidades que variaram

de 10,821 a 30,602 ng por maçã), após as frutas terem sido mantidas por 3 dias à 20°C (simulação do intervalo de tempo que as maçãs podem ser mantidas a temperatura ambiente até serem processadas).

g) Seleção das Frutas:

A eficiência da seleção das frutas dentro da fábrica e, a conseqüente redução da patulina no produto final, pode ser considerada dependentes da eficiência combinada de todas as operações de seleção realizadas anteriormente, já que um aumento no número de frutas com partes apodrecidas na etapa anterior à prensagem, reduz a eficiência da seleção. A seleção das maçãs na indústria pode ser feita pela exclusão e descarte das frutas acometidas por alguma lesão ou pelo aproveitamento condicional das partes não afetadas.

A quantidade de patulina nos sucos pôde ser reduzida de uma concentração média de 190 ppb (após a lavagem) para 55 ppb após a remoção das frutas apodrecidas ou apresentando lesões. Uma concentração média de 2335 ppb nas partes apodrecidas das maçãs foi detectada (SYDENHAM *et al.*, 1995). Em outro estudo, Sydenham *et al.*, (1997), conseguiram reduzir a quantidade de patulina nas frutas estocadas ao ar livre através da remoção das frutas apodrecidas ou apresentando lesões estocadas abertas ao ar livre de 75 ppb (após a lavagem) para 55 ppb (após a seleção); uma redução de 100 ppb (após a lavagem) para 90 ppb (após a seleção) foi obtida aos 15 dias de estocagem e uma redução de 695 ppb (após a lavagem) para 405 ppb (após a seleção), aos 33 dias de estocagem. Níveis de até 6235 ppb foram encontrados nas partes apodrecidas das frutas após 33 dias de estocagem. A presença de partes apodrecidas das frutas (aumento de

1,76% no 15º dia para 3,2% no 33º dia), foi seguida por um aumento numérico nos níveis de patulina e pelo aumento nas quantidades de material descartado.

Corte (*trimming*) é a separação do tecido defeituoso do tecido são, sendo usado comercialmente para o aproveitamento de frutas e vegetais. O *trimming* é capaz de reduzir entre 93 a 99% do total da patulina presente nas maçãs (LOVETT, THOMPSON e BOUTIN, 1975) e é utilizado em virtude da grande perda econômica representada pelo descarte completo das frutas atacadas por fungos. Apesar da presença das lesões causadas por *P.expansum* nem sempre implicarem na presença da patulina, a micotoxina pode estar presente em pequenas quantidades em algumas partes não lesionadas ou em áreas próximas às partes lesionadas (TANIWAKI *et al.*, 1992). Normalmente, um aumento do diâmetro das lesões é acompanhado por sua maior profundidade (MARIN *et al.*, 2006). Assim, a difusão da micotoxina pelas partes sãs das frutas, parece tornar impossível sua eliminação completa (LAIDOU, THANASSOULOPOULOS e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2001). Beretta *et al.* (2000), analisaram maçãs com partes deterioradas e determinaram a concentração de patulina nestas partes e nas partes não afetadas. Das 21 amostras de áreas não deterioradas e com casca, a toxina foi encontrada em 17 (81%) a nível máximo de 1170 µg/Kg, sendo que depois do descascamento a micotoxina ainda foi detectada em 7 (33%) das amostras, a um nível máximo de 93 µg/Kg, mostrando que mesmo se estas partes forem removidas a quantidade de patulina ainda pode exceder os limites seguros estabelecidos internacionalmente. MARTINS *et al.* (2002), analisaram 351 amostras de maçãs de diferentes variedades com áreas deterioradas de 25 a 42%, não observando correlação entre a quantidade de patulina e o tamanho das lesões, mas a disseminação da micotoxina pelas partes não deterioradas das

frutas foi sempre observada, com a maior quantidade encontrada nas partes superiores das lesões. TANIWAKI *et al.* (1992), reportaram que a maior quantidade de patulina é encontrada no primeiro 1 cm das lesões, com menores quantidades sendo encontradas à medida que se penetra na fruta. Em geral, a micotoxina é encontrada nas partes ao redor das lesões e também na seção de 0,5 cm próxima da última seção onde os sintomas da podridão são observados (MARIN *et al.*, 2006). Em seu estudo, Rychlik e Schieberle (2001), demonstraram que a uma distância de 2 cm da área infectada por *P.expansum*, a micotoxina não foi detectada nas maçãs. No entanto, não somente a difusão da patulina pelos tecidos sãos das frutas deve ser objeto de preocupação, mas também a quantidade total da micotoxina produzida na fruta, já que entre 1 % a 6% da quantidade presente nas partes apodrecidas migração para as partes sãs (HARWING *et al.*, 1973; MARIN *et al.*, 2006). Dentre os fatores que podem afetar a quantidade e difusão da patulina nas maçãs, a variedade e a acidez parecem ser os mais importantes. Maçãs mais ácidas e macias com Golden Delicious permitem maior produção de patulina (mais macias e ácidas), enquanto que as da variedade Fuji permitem uma melhor difusão da micotoxina. Adicionalmente, o diâmetro das lesões e grau de maturidade da fruta, podem afetar o conteúdo de patulina produzida pelo fungo (MARIN *et al.*, 2006).

A comprovação de que a patulina não se difunde completamente pela fruta, assegura que com o *trimming* entre 1 a 2 cm ao redor do tecido apodrecido, os níveis da toxina possam ser reduzidos ou até eliminados das maçãs. Todavia, a decisão para o *trimming* ou para o descarte das frutas deve ser baseada no tamanho da área apodrecida e no tamanho das frutas (TANIWAKI *et al.*, 1992; RYCHLIK e SCHIEBERLE, 2001). De acordo com Kadakal e Nas (2002b), em

geral, a concentração de patulina nas amostras de suco de maçã aumentou com o aumento da proporção de maçãs com lesões superficiais. As concentrações de patulina em todas as amostras de suco de maçã produzidas a partir de frutas sãs foram menores do que 50 ppb, enquanto o suco obtido a partir de amostras produzidas com 30, 60 e 100% de maçãs lesionadas foi maior que 50 ppb. Assim, maçãs com mais do que 30% da sua superfície lesionadas não devem ser usadas para a produção de suco de maçã livre de patulina, sendo importante e preferível prevenir a acumulação da micotoxina do que tentar removê-la das matérias-primas (MORALES *et al.*, 2007a).

h) Prensagem e extração do suco:

Apesar da maior parte das infecções das maçãs por *P.expansum* serem devidas às feridas causadas por insetos e feridas causadas por cuidados precários no transporte, elas também podem se originar pela penetração dos fungos através do sistema vascular do pedicelo, seios do cálice e lenticelas (NERI *et al.*, 2006).

No entanto, a falta de estudos para determinar a incidência da podridão interna de variedades de maçãs utilizadas para o processamento industrial e as variáveis que podem afetar sua taxa de incidência, não permite avaliar seu impacto sobre o nível de patulina no produto final. Se todas as práticas na pré-colheita, colheita e estocagem são adequadamente implantadas, a razão para a prevalência da patulina no suco de maçã é podridão interna. O *Codex Alimentarius* recomenda que as variedades de frutas com cálice aberto, em vista de sua maior susceptibilidade à infecção fúngica interna (aparentando externamente ausência de infecções), sejam examinadas quanto à podridão interna pela checagem

regular anteriormente à prensagem. Uma amostragem de maçãs pode ser realizada para cada lote de fruta, através do seu corte no sentido do equador e pelo exame para sinais de crescimento micelial. Caso a frequência de frutas com podridão central ultrapasse um nível considerado admissível para o processamento do suco, estas devem ser rejeitadas (CODEX, 2003b).

i) Clarificação e Filtração do suco:

A remoção da patulina de meio de cultura pela utilização de carvão ativado (KAROW e FOSTER, 1944), levou Sands, McIntyre e Walton (1976), a estudarem o uso do carvão ativado granulado para remoção da micotoxina do suco de maçã. Tanto a agitação (30 min) com carvão ativo (5-20 mg/mL) quanto a filtração usando-se o carvão ativado (40 a 60 mesh), foram capazes de reduzir os níveis de patulina entre 98,15% a 100% do suco de maçã. Kadakal e Nas (2002a), avaliaram o efeito da adição de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 e 3.0 g de carvão ativado por litro de suco de maçã contendo 62.3 ppb de patulina, seguindo-se agitação por 5, 10, 20 e 30 min e concluíram que 3 g/L de carvão ativado por um tempo de 5 min foi o tratamento mais efetivo para redução de patulina no suco (redução para 30,8 ppb), sendo contudo, observadas aumento da clareza dos sucos, redução da cor do suco e pequenas reduções no conteúdo de ácido fumárico, pH e °Brix. Uma redução da patulina entre 20% e 80% da quantidade inicial contida no suco de maçã após a adsorção com carvão ativado foi obtida por Leggott *et al.* (2001), sendo a variação na porcentagem de redução devida ao tipo de carvão, tipo de ativação do carvão (física ou química) e do teor de sólidos do suco.

A utilização de um sistema de reciclo do suco de maçã para adsorção da patulina foi estudada por Mutlu e Gökmen (1998). O tratamento foi capaz de

reduzir em até 99% os níveis de patulina inicialmente presentes no suco, todavia, também alterou marcadamente a sua qualidade, indicando a necessidade de realização de mais estudos para um melhor desenho e otimização das colunas de adsorção de carbono ativado, de modo a se reduzir os níveis de patulina no suco, sem, no entanto, alterar a sua qualidade. Um composto de carbono adsorvente (CCA) (carvão ativo ultrafino ligado em quartzo granulado) foi desenvolvido por HUEBNER *et al.* (2000), que estudaram sua eficácia para redução dos níveis de patulina numa solução aquosa e em suco de maçã e apesar de ser capaz de reduzir os níveis de patulina nestas soluções, o processo usando o CCA levou a modificação na aparência e sabor do produto. Além destas desvantagens, deve-se considerar o impacto ambiental devido ao excesso de resíduos gerados pela aplicação do tratamento com o carvão ativado (ARTIK *et al.*, 2001). Pelo fato do tratamento com carvão ativado representar um substancial custo para a indústria e pelo fato de ser um tratamento que tem sua eficiência dependente do tempo, anteriormente à sua utilização, é importante se avaliar e se verificar a eficiência dos diferentes tipos de carvão ativados disponíveis para remoção da patulina (LEGGOTT *et al.*, 2001). ARTIK *et al.* (2001), comprovaram que a clarificação com carvão ativado causou a alteração da cor, conteúdo fenólico e redução dos níveis de patulina em até 40,9%, sendo resina à base de DVB (poliestireno divinil benzeno) capaz de reduzir os níveis de patulina em 11%. O uso de polímeros sintéticos foi capaz de reduzir mais de 45% no nível de patulina em suco de maçã (CANAS e ARANDA, 1996).

Um procedimento para redução do conteúdo de patulina em sucos de frutas, o qual inclui o uso de resinas tendo microporos em abundância com largura de menos do que 20Å e uma superfície capaz de reter a patulina através de forças

de quimisorção, foi desenvolvido e patenteado por Miller e Lyndon (2001). Basicamente o processo consiste em passar o suco através de um material resinoso por vários ciclos seguindo-se a regeneração da resina. Esta etapa envolve a conversão da patulina retida pela resina à um derivado com maior facilidade de deslocamento, usando amônia ou uma base volátil, preferencialmente gerada *in situ* a partir de uma solução de elevado pH. O processo patenteado é capaz de reduzir os níveis de patulina no suco mais do que 85% e tem como principais vantagens o fato de não gerar problemas ambientais (já que a através do processo de regeneração da resina há a inativação da micotoxina contida nos resíduos), ou envolver os custos associados com o uso do carvão ativado.

Algumas técnicas convencionais de clarificação têm sido consideradas eficientes para redução da patulina. A despectinização, clarificação e filtração através de um filtro rotatório com vácuo pode reduzir os níveis de patulina em 39%, enquanto que o uso de despectinização, clarificação e mistura com gelatina/bentonita e ultrafiltração resultou numa redução de 25% desta micotoxina (ACAR, GÖKMEN e TAYDAS, 1998). Bissessur, Permaul e Odhav (2001), avaliaram o efeito de diversas técnicas convencionais sobre a redução dos níveis de patulina durante a etapa de clarificação do suco de maçã e reportaram que a centrifugação foi o tratamento mais eficiente, com redução real de 20,5% da patulina; o refino com bentonita foi o segundo mais efetivo, com redução real de 8,5% nos níveis da toxina; sendo a filtração com terra diatomácea e o tratamento com enzimas, os tratamentos menos efetivos entre os avaliados, sendo capazes de reduzir os níveis de patulina em 3% e 4,5%, respectivamente. A combinação de centrifugação e refino com bentonita causou a uma redução de 20,5% da patulina,

enquanto a combinação da centrifugação com o tratamento enzimático resultou na redução de 17% da micotoxina, em virtude das moléculas de pectina presentes no suco serem degradadas pelas enzimas e a eficiência da centrifugação é reduzida. As combinações menos eficientes foram: o refino com bentonita e filtração com terra diatomácea e a filtração com terra diatomácea e tratamento enzimático, com reduções de patulina de 12 e 7,5%, respectivamente. De um modo geral, os menores valores obtidos para os tratamentos combinados podem ser explicados pelo fato da remoção da patulina ser devida principalmente à ligação da toxina ao material particulado que é removido do suco na etapa de clarificação. Os processos acima descritos apresentaram vantagens quanto à simplicidade para implementação, bom custo benefício e o fato de não necessitarem de tempo e trabalhos intensivos. No entanto, a preocupação para as indústrias deve ser a possibilidade dos subprodutos da centrifugação (torta, por exemplo) apresentarem elevados níveis de patulina, o que inviabiliza sua utilização para alimentação animal.

j) Pasteurização:

Os estudos realizados para avaliação dos efeitos da pasteurização sobre os níveis de patulina nos sucos de maçãs são controversos. A estabilidade térmica desta micotoxina foi reportada primeiramente por Wiesner (1942), em solução aquosa. Posteriormente, Heatley e Philpot (1947), relataram ser a patulina estável a aquecimento (100°C/15 min, à pH 2,0) em sistema modelo. Scott e Somers (1968), reportaram que o aquecimento do suco de maçã adicionado de vitamina C (35 mg/100 mL) à 80°C por 10 e 20 minutos causou a redução de 45% (90µg) e 55% (110µg), respectivamente, da patulina inicialmente presente (200µg).

Adicionalmente, Kubacki (1986), reportaram que a patulina foi estável ao aquecimento à 80°C por 30 min, só ocorrendo redução maior que 20% desta micotoxina quando o suco foi aquecido à 120°C por 30 min. Um nível remanescente de 67% de patulina foi recuperado do suco de maçã aquecido à 100°C por 177 min (KRIGER, 2001). Já Taniwaki *et al.* (1989), ao submeterem suco de maçã contaminado com patulina (1500 µg/L) à um aquecimento à 90°C por 2 minutos, seguido de enchimento à quente e tratamento térmico final por 5 minutos em água sob ebulição e resfriamento à temperatura ambiente, observaram uma redução de 60% nos níveis de patulina. Mais recentemente, Kadakal e Nass (2003), investigaram o efeito do aquecimento à 90°C e 100°C por 5, 10, 15 e 20 min sobre a cor, clareza e os níveis de hidroximetilfurfural (HMF) e patulina em suco de maçãs. O aquecimento à 90°C e 100°C, resultou em significativas reduções na concentração de patulina. Com o aumento do tempo de tratamento (5, 10, 15 e 20 min), observaram-se maiores reduções dos níveis de patulina, sendo esta mais rápida nos primeiros cinco minutos de tratamento, com posterior redução na velocidade de degradação. Os tratamentos à 90°C e 100°C por 20 min, causaram reduções nos níveis de patulina em 18,81 e 25,99%, respectivamente. Valores máximos médios de HMF de 8,91 mg/L e 10,14 mg/L foram obtidos para os tratamentos térmicos à 90°C e 100°C por 20 minutos, respectivamente. Pequenas mudanças na cor e clareza do suco de maçã foram relacionadas ao aumento do conteúdo de HMF, o qual se vê afetado pelo tempo e temperatura de aquecimento. Apesar de não representarem as condições utilizadas nas indústrias atualmente para o tratamento térmico dos sucos, estes estudos demonstraram a estabilidade térmica da patulina a variados binômios de tempo e temperatura, comprovando que se a contaminação é elevada nas etapas

iniciais do processamento, praticamente não se terá reduções significativas nos níveis da micotoxina no produto final.

A primeira descrição dos parâmetros cinéticos de inativação térmica da patulina foi feita por Lovett e Peeler (1973). Os autores determinaram os parâmetros cinéticos de inativação térmica desta micotoxina em solução aquosa, observando elevada resistência térmica para os três valores de pH estudados: 3,5, 4,5 e 5,5. O valor D foi sendo reduzido à medida que houve aumento do pH, corroborando maior estabilidade térmica da micotoxina em ambientes ácidos. Os valores D à 105°C, 110°C, 115°C, 120°C e 125°C, em solução com pH 3,5 foram iguais a 1058, 744, 527, 378 e 268 min, respectivamente. Em solução com pH 4,5, os valores D foram respectivamente, 695, 444, 334, 236 e 167 min, enquanto para solução com pH 5,5, os valores encontrados foram 167, 109, 71, 48 e 33 min, respectivamente. Os valores Z (°C) reportados foram iguais a 33,4°C à pH 3,5, 31,6°C à pH 4,5 e 27,7°C à pH 5,5. Wheeler, Harrison e Koehler (1987), compararam os processos de pasteurização em batelada (90°C por 10 min) e os processos alta temperatura – curto tempo (HTST) (60°C, 70°C, 80°C e 90°C por 10 s) e seus efeitos sobre os níveis de patulina nos sucos de maçãs e obtiveram uma redução significativa dos níveis de patulina, sendo o tratamento HTST à 90°C/10 s responsável por uma redução de 19% da micotoxina inicialmente presente no suco, comprovando que processos equivalentes industrialmente aplicados não asseguram a sua eliminação.

Quando o suco for pasteurizado pela segunda vez, conforme fluxograma mostrado na *Figura 1*, a quantidade de patulina presente no produto final será dependente da concentração inicial da toxina no concentrado, do teor de sólidos e pH final, dos aditivos adicionados (ácido ascórbico e ácido cítrico) e do efeito

combinado destes com a temperatura de pasteurização do néctar de maçã. A redução da patulina deve ser menos pronunciada quando o suco de maçã for fabricado, todavia, a falta de estudos sobre o efeito de diferentes formulações (néctar e suco) pasteurizadas em condições equivalentes às industriais sobre os níveis da micotoxina, não permite que conclusões concretas sejam tiradas.

1) Concentração:

O estudo do efeito da etapa de concentração sobre o conteúdo de patulina é importante desta operação unitária ser bastante utilizada, principalmente para redução de custos e espaço para comercialização. Kubacki (1986), reportaram uma redução de 24% da patulina presente no suco de maçã, sendo a maior parte removida pela concentração com destilação a vácuo. O efeito da etapa de concentração (evaporação) à 70°C e 80°C, por 5, 10, 15 e 20 min sobre os níveis de patulina, HMF, cor e clareza no suco de maçã foi estudado por Kadakal e Nas (2003), que observaram redução dos níveis de patulina à medida que a temperatura e o tempo de evaporação foram elevados, sendo no entanto as maiores taxas de degradação da micotoxina observadas após 15 min de evaporação. Os tratamentos à 70°C e 80°C resultaram na redução de 9.4% e 14.06% nas concentrações de patulina, respectivamente, após 20 minutos. A evaporação foi responsável por maior redução na clareza e cor do suco do que a etapa de tratamento térmico. Apesar dos níveis de HMF terem aumentado com o tempo de evaporação, atingindo valores máximos com 20 min, este aumento foi maior durante o tratamento térmico do que na etapa de evaporação. Em um estudo dos efeitos de algumas etapas do processamento do suco de maçã, Leggott, Vismer, Sydenham, Shepard, Rheeder and Marasas, (2000), não

obtiveram redução dos níveis da patulina durante o estágio de concentração do suco. A importância deste estudo reside no fato de que foi realizado numa indústria, confirmando que as condições de processamento e outros fatores como equipamento, podem levar a discrepâncias em relação à redução nos níveis de patulina quando se comparar à dados obtidos em laboratório, onde as condições são muito bem controladas. O aroma de maçã comercial é composto em sua maioria por água, com pequena porcentagem de álcool e níveis, em partes por milhão (ppm), de vários compostos aromáticos representando a fração mais volátil do suco. O aroma de maçã é um importante produto da concentração do suco de maçã, e é adicionado novamente ao suco para reconstituir seu *flavour* natural, no entanto, pode também ser usado como flavorizante para outras aplicações em alimentos. Kriger, (2001), mostrou que um fator de redução de ao menos 250 ocorre no nível de patulina no destilado do suco de maçã comparado ao encontrado no suco no início do processo. Em virtude de seu elevado peso molecular (154) e por ser menos volátil que a água, a patulina não é volatilizada durante a etapa de concentração, não estando presente nos aromas de maçãs, mas podendo estar presente no suco concentrado. No entanto, é importante se considerar que a ausência de aromas de maçã contaminados com patulina só pode ser assegurada, caso o suco não seja misturado ao aroma para formar uma base para aplicações industriais.

m) Estocagem:

O único estudo que avaliou o efeito da temperatura e tempo de estocagem sob os níveis de patulina em suco concentrado foi realizado por Koca e Eksi, 2005. Os autores avaliaram efeito da temperatura de estocagem (22°C e 30°C)

dos sucos concentrados de maçã (70-74°Brix) por um período de 6 meses, utilizando-se suco de maçã naturalmente contaminado contendo 64, 105 e 150 ppb da micotoxina, respectivamente. Os resultados demonstraram que a redução da patulina é dependente do tempo e temperatura de estocagem, com maiores reduções nos níveis da micotoxina ocorrendo à 30°C (66-86%) do que à 22°C (45-64%) após um mês de estocagem. Após 4 meses de estocagem nestas temperaturas, os níveis de patulina estiveram abaixo do limite de detecção do método (10 ppb), no entanto, os motivos não foram descritos. Apesar de nenhum estudo até o momento ter avaliado o comportamento de sucos contendo patulina sob congelamento, baseando-se nos resultados descritos acima, é de se esperar que os níveis da micotoxina não sejam reduzidos durante a estocagem sob baixas temperaturas.

n) Formulação:

O efeito da etapa de formulação sobre a patulina dependerá, se o suco ou o néctar de maçã é fabricado. A instabilidade da patulina frente ao ácido ascórbico e ascorbato foi demonstrada primeiramente por Brackett e Marth (1979), que observaram rápido desaparecimento da micotoxina à 25°C, após a adição de 2% deste composto em tampão fosfato contendo a toxina. A esta mesma temperatura, observou-se que o maior decréscimo nos níveis de patulina na solução tampão pH 3.5, ocorreram quanto maiores foram às concentrações de vitamina C (0, 0.15, 0.5, 1.0 e 3.0%). Já no suco de maçã contendo 5% de vitamina C a queda no conteúdo de patulina foi maior do que no suco sem adição desta vitamina, não sendo, no entanto, tão rápida quanto em solução tampão, demonstrando que os componentes do produto influem na taxa de redução da patulina. Além do ácido

ascórbico, a adição de vitaminas do complexo B, hidrocloreto de tiamina, hidrocloreto de piridoxina e pantotenato de cálcio, podem causar reduções significativas reduções nos níveis de patulina no suco de maçã (YAZICI e VELIOGLU, 2002), apesar de ser uma medida que elevaria os custos de produção. Drusch, Kopka e Kaeding (2007), ao avaliarem a estabilidade da patulina em um sistema modelo (solução tampão) frente ao ácido ascórbico, observaram após 34 dias a redução do nível da micotoxina a 30% de sua concentração inicial na presença de ácido ascórbico, comparando-se aos 68-71% das amostras sem ácido ascórbico. Assim, os autores concluíram que as condições durante a estocagem (presença de luz, oxigênio e/ou íons metálicos) influenciam a estabilidade da patulina. Além disso, como a decomposição da patulina se dá através dos radicais livres gerados pela oxidação do ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, quando todo ácido ascórbico foi oxidado, a degradação da patulina não foi mais observada, concluindo que devido aos baixos conteúdos de oxigênio presentes no espaço-livre das embalagens de sucos, a adição do ácido ascórbico antes do enchimento, não pode ser considerada como uma estratégia efetiva de descontaminação.

Outro aditivo que normalmente é usado no suco de maçã é dióxido de enxofre. A patulina se mostrou instável na presença de dióxido de enxofre diluído em solução aquosa (POHLAND e ALLEN, 1970). Burroughs (1977), obtiveram uma redução de 12% e 90%, após 24 e 48 h, respectivamente, nos níveis de patulina nos sucos usando o dióxido de enxofre (200 ppm). Uma concentração de 100 ppm de dióxido de enxofre causou a redução imediata dos níveis de patulina a 50% (OUGH e CORISON, 1980). Redução de 42% do nível de patulina foi obtida

por Aytac e Acar (1994), ao utilizarem 100 mg de dióxido de enxofre por Kg de suco.

Além de serem considerados aditivos de grau alimentício, possuindo algum efeito específico para a melhoria ou manutenção de alguma característica de qualidade dos sucos, estes podem ser efetivos para o controle do crescimento dos bolores produtores da patulina no produto final, o que faz com que eles tenham uma dupla função no controle da patulina (MOAKE, PADILLA-ZAKOUR e WOROBO, 2005). Apesar de estudos prevendo a adição de alguns conservantes, como dióxido de enxofre, benzoato de sódio e sorbato de potássio, para inibição do crescimento e produção de patulina por *B.nivea* (ROLAND e BEUCHAT, 1984, ROLAND *et al.*, 1984) e sorbato de potássio para inibição do crescimento e produção de patulina por *P.expansum* e *P.patulinarulum* (BULLERMAN e OLIVIGNI, 1974; LENNOX e McELROY, 1984), já terem sido realizados, a busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis e livres de aditivos pode ser um entrave para a utilização destas técnicas, além de questões de custos, já que o processo asséptico atualmente aplicado, assegura produtos estáveis durante a vida de prateleira. Assim, é preferível a utilização de tratamentos que garantam a eliminação/inativação dos ascósporos dos fungos termoresistentes do que a aplicação destes aditivos.

o) Envase:

Uma condição importante nesta etapa é o material de embalagem utilizado para o envase. É possível que em virtude das diferentes composições químicas e propriedades dos materiais utilizados, haja diferentes atmosferas dentro do

material de embalagem que afetem o crescimento e produção da patulina por fungos termoresistentes.

p) Estocagem e comercialização:

Os estudos realizados por Scott e Somers (1968) e Pohland e Allen (1973), apontaram para a estabilidade da patulina durante a estocagem ou pequenas reduções de seus níveis, no entanto, a produção da micotoxina por fungos termoresistentes passa a ser um novo enfoque necessário nesta etapa.

3.12. Microbiologia Preditiva:

A microbiologia preditiva é baseada na premissa de que as respostas das populações de microrganismos aos fatores ambientais são reprodutíveis e que é possível, a partir de observações passadas, prever as respostas dos microrganismos em um ambiente particular. As respostas são medidas sob condições laboratoriais definidas e controladas, freqüentemente em meios líquidos. Os resultados são sumarizados na forma de equações matemáticas, as quais por interpolação, podem ser usadas para prever respostas nas condições não testadas (ROSS, 1996).

Na microbiologia preditiva, modelos matemáticos são usados para descrever as respostas de crescimento, sobrevivência e inativação dos microrganismos dos microrganismos a diferentes condições ambientais (WALLS e SCOTT, 1997). Eles podem ser usados para prever a segurança microbiológica ou vida-de-prateleira dos produtos, para determinar os pontos críticos de controle no processo e otimizar as cadeias produtiva e de distribuição (ZWITERING *et al.*, 1991).

O desenvolvimento da microbiologia preditiva como um campo organizado de estudo foi devido principalmente, ao aumento no número de doenças de origem alimentar, a observação de que os testes desafio dos produtos finais eram pouco racionais, à demanda por parte dos consumidores por alimentos mais “frescos” ou “naturais” e mais seguros associados ao desenvolvimento das ferramentas computacionais (ROBERTS e JARVIS, 1983; BUCHANAN, 1991; McMEEKIN *et al*, 1993).

O uso pretendido de um modelo é uma importante consideração quando se vai projetar experimentos para descrever os efeitos e interações dos fatores ambientais no crescimento, sobrevivência ou morte de uma população de microrganismos (McCLURE *et al*, 1994).

Segundo Jagannath e Tsuchido (2003), os modelos preditivos podem ser classificados de acordo com:

1) Evento microbiológico estudado: modelos cinéticos e probabilísticos. Os modelos cinéticos descrevem o tempo de adaptação, velocidade específica de crescimento e densidade máxima da população (ELLIOTT, 1996). Os modelos cinéticos correspondem à modelagem da extensão e velocidade de crescimento ou destruição de microrganismos de interesse (NAKASHIMA, ANDRÉ e FRANCO, 2000). Os modelos probabilísticos correspondem a modelos para prever a probabilidade de algum evento, como por exemplo, a formação de uma quantidade de toxina detectável, em um determinado período de tempo;

2) Abordagem da modelagem: modelos empíricos e mecanísticos: Os modelos empíricos simplesmente descrevem um conjunto de dados por meio de

uma relação matemática conveniente, enquanto os modelos determinísticos fornecem a interpretação dos parâmetros do modelo em termos de fenômenos e processos conhecidos (McMEEKIN *et al*, 1993);

3) Variáveis independentes consideradas para a modelagem: modelos primários, secundários e terciários. Pode-se considerar que os modelos matemáticos estabelecidos para a microbiologia preditiva possuem níveis primários, secundários e terciários (WHITING e BUCHANAN, 1993). Os modelos primários descrevem mudanças no número de microrganismos ou outras respostas microbianas com o tempo. Eles podem quantificar as unidades formadoras de colônias/mL, formação de toxinas, níveis de substrato e produtos metabólicos ou absorvância ou impedância. Os modelos secundários descrevem como os parâmetros dos modelos primários mudam com respeito a um ou mais fatores ambientais, como atmosfera envolvendo o alimento, pH, temperatura e teor de sal. Os modelos terciários basicamente são constituídos por programas softwares utilizados para resolver os modelos de nível primário e secundário. Estes programas podem calcular a resposta microbiana às mudanças nas condições, comparar os efeitos de diferentes condições ou comparar o comportamento de diversos microrganismos. Os modelos terciários são aplicações de um ou mais modelos secundários para gerar sistemas para realizar previsões para pessoas não familiarizadas com a técnica de modelagem (WHITING, 1995; McDONALD e SUN, 1999; NAKASHIMA, ANDRÉ e FRANCO, 2000; JAGANNATH e TSUCHIDO, 2003).

Como podem existir diferenças significativas entre as previsões derivadas do meio de cultura (caldos, por exemplo) e as verdadeiras observações no alimento

por causa de várias razões, como a existência de fatores inibitórios de crescimento ou fatores protetores ao calor (presença de ácidos orgânicos, umectantes e etc. que não são levados em conta pelo modelo, mas que influenciam o comportamento microbiano). Desta forma, para avaliar a segurança dos modelos antes de serem usados para tomada de decisões, a validação é requerida. Ela fornece uma estimativa do ajuste da função aos dados e mostra onde dados adicionais são necessários e é chamada validação interna ou ajuste da curva (WHITING, 1995; JAGANNATH e TSUCHIDO, 2003).

Assim, os modelos não podem ser usados com confiança até que sua validação seja feita (JAGANNATH e TSUCHIDO, 2003). É importante se considerar que os erros na estimativa do crescimento microbiano devem tender pelas taxas de crescimento mais rápidas do que aquelas observadas nos alimentos para se ter uma predição conservadora ou “*fail-safe*” (WHITING, 1995).

O rápido desenvolvimento dos modelos preditivos e de sua habilidade para prever o crescimento microbiano torna a modelagem uma inestimável ferramenta de pesquisa. No entanto, os modelos não devem substituir completamente os testes microbiológicos, nem o julgamento de um microbiologista treinado e experiente. Os modelos podem fornecer informações muito úteis para tomada de decisões em diversas situações, como na estimativa do risco, sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), no desenvolvimento e melhoria de produtos e em treinamentos (WHITING, 1995; McDONALD e SUN, 1999).

3.12.1. Modelos Preditivos para Estudo e Avaliação da Segurança dos Alimentos:

Os modelos probabilísticos podem estar entre os mais importantes e ainda são os mais subutilizados no desenvolvimento de planos APPCC. A condução da avaliação de risco no desenvolvimento de um plano APPCC requer lidar com probabilidades (ELLIOTT, 1996).

A vantagem de se usar modelos probabilísticos é a de se poder determinar a probabilidade de um evento particular ocorrer sob condições pré-determinadas num alimento. Todavia, um problema com a probabilidade é que ela muda com o tempo, então modelos probabilísticos são na verdade uma combinação de modelos de probabilidade e cinéticos (McDONALD e SUN, 1999). Quando a produção de toxina em um alimento é a preocupação, os modelos probabilísticos são apropriados (GIBSON e HOCKING, 1997). No entanto, eles têm sido mais recentemente usados para definir os limites absolutos para multiplicação dos microrganismos num ambiente especificado, por exemplo, na presença de um número de fatores inibidores do crescimento, os quais individualmente não limitariam o crescimento, mas que coletivamente previnem a multiplicação (JAGANNATH e TSUCHIDO, 2003). Os modelos que descrevem a interface cresce / não cresce podem trazer muitos benefícios para a indústria de alimentos (McDONALD e SUN, 1999). A construção destes modelos é baseada em equações logísticas, log-logísticas ou na distribuição de Weibull e em muitos casos as respostas observadas são o tempo para produção da toxina ou tempo para alcançar uma determinada população (MAAS, 1993; RAZAVILLAR e GENIGEORGIS, 1998; SCHAFFNER, ROSS e MONTVILLE, 1998; WHITING e ORIENTE, 1997).

Os valores de probabilidade são calculados como função dos fatores de preservação (temperatura de incubação, pH, concentração de sal, atividade de água e etc.), usando expressões polinomiais e resultando em modelos de superfície de resposta (LÓPEZ-MALO, GUERRERO e ALZAMORA, 2000). Os modelos probabilísticos tem sido aplicados para avaliar o efeito de fatores combinados (tecnologia dos obstáculos) na inibição de leveduras (LÓPEZ-MALO, GUERRERO E ALZAMORA, 2000; LÓPEZ-MALO e PALOU, 2000) e também para estudar a inibição do crescimento e produção de toxina por *Clostridium botulinum* (LUND e WYATT, 1984; GARCIA, GENIGEORGIS E LINDROTH, 1987; DODDS, 1989 e LUND *et al.*, 1990; ROBERTS, GIBSON e ROBINSON, 1981; IKAWA e GENIGEORGIS, 1986; LINDROTH e GENIGEORGIS, 1987; GARCIA e GENIGEORGIS, 1987; LUND, GRAHAN e FRANKLIN, 1987; GENIGEORGIS, MENG e BAKER, 1991).

Um modelo probabilístico primário foi utilizado por Whiting e Call (1993), para descrever o tempo para crescimento de *C. botulinum* proteolítico em meio de cultura (caldo) frente com variados valores de pH, cloreto de sódio e temperatura. O modelo foi usado para descrever o incremento do número de amostras positivas com o aumento do tempo de estocagem. Os dados foram ajustados à função abaixo (equação 1):

$$P_{(t)} = \frac{P_{m\acute{a}x}}{(1 + e^{k(\tau - t)})} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo,

$P_{(t)}$ = probabilidade de crescimento em um tempo “t” (dias);

t = tempo (dias);

$P_{m\acute{a}x}$ = máxima probabilidade de crescimento após 62 dias (tempo que as amostras turvas continham a toxina e as não turvas não continham);

κ = taxa de crescimento (dia⁻¹);

τ = tempo do ponto médio da função (dias) ou tempo para metade das replicatas que se tornarão tóxicas, mostrarem turbidez;

$P_{(t)}$ tem inicialmente um valor de 0,0 e pode aumentar até 1,0, se todas as replicatas apresentarem crescimento.

Os parâmetros do modelo forneceram informações quanto ao tempo para as amostras se tornarem turvas, a taxa com que as amostras se tornaram turvas e a proporção de amostras que nunca se tornaram turvas. Os autores também ajustaram os dados à função e uma equação de regressão múltipla (modelo secundário) foi usada para descrever o efeito do pH, NaCl e temperatura nos valores dos parâmetros da função e observaram que a temperatura e pH são os fatores mais importantes para controlar o crescimento do microrganismo do que o teor de cloreto de sódio. Sugere-se que a principal vantagem do uso deste modelo é o cálculo do tempo para a probabilidade de crescimento alcançar 0,1, ou seja, tem-se uma estimativa de quando as primeiras amostras provavelmente se tornarão tóxicas. Este valor de tempo pode ser considerado mais importante e ter mais aplicações do que o usual cálculo do tempo para metade das amostras se tornarem tóxicas, demonstrando que o modelo primário apresentado é aplicável em situações similares quando se quer calcular o tempo para crescimento de um determinado microrganismo.

A microbiologia preditiva pode ser considerada uma ferramenta chave para estimar o impacto do processo e do alimento e, assim como a exposição a um determinado perigo pelos consumidores. A aplicação de cenários em várias etapas dos processos produtivos (abordagem multi-etapas), demonstra que cada uma das etapas tem um impacto, e a integração de todas as operações unitárias

determina a segurança microbiológica dos produtos. Neste sentido, o uso de modelos preditivos mais refinados pode tornar possível desenvolver sofisticados modelos de avaliação de riscos, que podem ajudar rapidamente na estimativa do impacto das mudanças no processamento ou formulação dos produtos, na segurança dos alimentos e saúde pública. Os modelos preditivos podem fornecer meios para exploração de riscos, através do estabelecimento de cenários de riscos (BUCHANAN e WHITING, 1996).

Apesar de um cenário cada vez mais favorável à aplicação da microbiologia preditiva, os modelos de crescimento de patógenos não respondem às questões “Este alimento ou processo é seguro?” ou “Comendo este alimento eu ficarei doente?”, precisando ser incorporados a sistemas de avaliação de risco (*Risk Assessment*), que inclui a distribuição dos patógenos na matéria-prima, mudanças na população durante o processamento, distribuição, preparo do alimento e dados de dose infecciosa (WHITING, 1995).

3.13. Segurança dos Alimentos:

É considerado um alimento seguro aquele no qual, durante sua produção ao longo da cadeia produtiva, foram aplicadas medidas sanitárias e de higiene efetivas e eficazes e que, por isso, não representa riscos em níveis acima dos tolerados pelo consumidor, sempre e quando o mesmo for usado nas condições e para os fins a que se destina. A segurança do produto depende dos níveis aceitáveis do perigo no alimento ou, em outras palavras, do nível de proteção necessário para a saúde do consumidor (PAS, 2004).

A “segurança dos alimentos” é um tema de saúde pública de crescente importância. Governantes dos países de todo mundo vêm intensificando seus esforços para melhorar a segurança dos alimentos em resposta ao aumento do número de problemas associados à segurança dos alimentos e também por ser um tema de crescente preocupação dos consumidores (WHO, 2002a). Apesar do importante papel dos governos, é importante ter-se em mente que a segurança e o controle de qualidade dos alimentos é primariamente de responsabilidade da indústria com apropriado suporte dos organismos governamentais (LUPIEN e KENNY, 1998).

A integração, consolidação de indústrias e a globalização do comércio dos produtos alimentícios estão mudando os padrões de produção e distribuição dos alimentos. Este cenário está criando um ambiente no qual doenças veiculadas por alimentos (emergentes e re-emergentes), têm se tornado prevalentes (WHO, 2002b).

A cadeia produtiva dos alimentos é complexa e composta por diferentes elos. A relação entre a gestão de cada um dos elos é estabelecida principalmente através de exigências e especificações dos clientes (usuários e consumidores), que podem, de forma indireta, interferir na operacionalização e nas características da produção e do produto do elo anterior. Raramente uma gestão é responsável desde a produção até o consumo e, por isso, a inter-relação entre os diferentes elos tem grande importância e impacto na segurança do produto final. A gestão da segurança de perigos nos alimentos é feita inicialmente através da aplicação operacional de práticas, procedimentos e programas nos diferentes elos da cadeia produtiva e que são planejados, implementados e dimensionados para o controle dos perigos significativos dos alimentos em questão. Entre as ferramentas de

gestão de perigos, merecem atenção especial: as boas práticas de fabricação (BPF), os procedimentos operacionais padronizados (POP) e o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) (PAS, 2004).

O sistema APPCC tem como objetivos, identificar e controlar perigos significativos pela adoção das medidas preventivas ou de controle. Apesar de ter sua implementação recomendada a nível internacional e seu uso apresentar-se grandemente difundido pela indústria de alimentos no mundo, o sistema APPCC apresenta limitações, como o fato de se basear na análise qualitativa dos perigos associados a uma etapa, tornando difícil se estimar a probabilidade de que variações em certas etapas não consideradas pontos críticos influenciem a eficácia de uma etapa considerada um ponto crítico de controle (PCC) e mais importante limitação, que é a inabilidade de se avaliar diretamente o impacto do programa na saúde pública, já que não é possível se considerar a equivalência de diferentes planos APPCC devido à sua natureza produto-processo específico (BUCHANAN e WHITING, 1998).

O desenvolvimento das técnicas de análise quantitativa de risco foi estimulado pelo desejo de melhor estimar-se o impacto potencial na qualidade e segurança dos alimentos junto à saúde pública e as conseqüências econômicas associadas, permitindo à indústria de alimentos executar avaliações de riscos confiantes (WHITING e BUCHANAN, 1997).

3.14. Análise de Riscos:

A análise de riscos (*Risk analysis*) é um processo constituído de três componentes: avaliação do risco, gestão do risco e comunicação do risco, que são

relacionados entre si, mas constituem-se em distintas fases (BUCHANAN e WHITING, 1996).

O processo para cientificamente avaliar a probabilidade de ocorrência e severidade de um conhecido ou potencial efeito adverso à saúde resultante da exposição humana a um perigo microbiológico é denominado avaliação de risco (*risk assessment*). A definição de avaliação de riscos inclui tanto expressões qualitativas quanto quantitativas. As avaliações qualitativas de riscos são tratamentos descritivos ou categóricos das informações, enquanto as avaliações quantitativas contam pesadamente com o uso de dados numéricos e suposições, fornecendo uma expressão numérica do risco. Em ambos os casos, a ênfase é dada na descrição da incerteza e variabilidade das informações usadas para derivar o risco estimado. Idealmente estudos quantitativos são desejados, todavia, o reconhecimento de que em muitos casos, dados quantitativos para os patógenos não estarão disponíveis, faz com que avaliações qualitativas sejam realizadas, tendo-se como vantagem a possibilidade de posterior incorporação de novas informações aos modelos de riscos à medida que dados forem sendo adquiridos (LAMMERDING, 1997, LAMMERDING, FAZIL e PAOLI, 2001).

A análise de riscos para gestão de perigos determinados pela avaliação de riscos apresenta um triplo propósito: i) determinar os efeitos à saúde associados à uma atividade; ii) comparar estratégias de controle e redução designadas para reduzir estes riscos e iii) ajustar prioridades de gestão. Este processo inclui a determinação da significância de vários riscos, comunicação efetiva dos riscos e tomar decisões, ações e/ou adotar políticas objetivando-se à gestão ou controle dos riscos. Devido à natureza inclusiva da análise de riscos, o processo requer inerentemente a participação de profissionais de diversas áreas como

microbiologia, tecnologia de alimentos, epidemiologia, economia, medicina veterinária, política pública e cientistas sociais (JAYKUS, 1996).

Segundo o *Codex Alimentarius* (CODEX, 1999), a avaliação de riscos é um processo cientificamente baseado consistindo das seguintes etapas: (i) identificação do perigo, (ii) caracterização do perigo, (iii) avaliação da exposição e (iv) caracterização do risco.

A primeira das etapas da avaliação de riscos é a determinação do seu objetivo. O estudo só deve ser iniciado com um claro conhecimento (transparência) do propósito da avaliação, já que ele pode definir o escopo da avaliação, estabelecer suposições chaves e parâmetros a serem considerados, além de fornecer um guia em relação ao grau das suposições adicionais a serem feitas (BUCHANAN, 1997).

A identificação do perigo envolve o uso de informações epidemiológicas, biológicas, além de outras juntamente com o conhecimento de especialistas, pertinentes aos agentes biológicos, o alimento, e a presença da doença nos consumidores. Estimativas em relação às quantidades, freqüências, e fontes dos agentes biológicos que levam a doença devem ser feitas nesta fase. As fontes dos dados para a identificação do perigo vêm de avaliações do processo, vigilância epidemiológica e investigações epidemiológicas. Muitas vezes, o perigo já é bem estabelecido, particularmente quando o propósito da avaliação do risco é avaliar os riscos relativos associados com mudanças no sistema dos alimentos (processo ou formulação ou outras variações) (BUCHANAN, 1997).

A avaliação da exposição tem por objetivo estimar o real número dos agentes biológicos ingeridos pelos consumidores, o que normalmente requer

considerações da probabilidade de que agentes biológicos estarão presentes nos alimentos, o impacto do processamento e manuseio sobre eles, e a duração e frequência da exposição. Alguns dos fatores e fontes de informações que podem ser considerados são: padrões de consumo, dados demográficos, práticas de manipulação dos consumidores, distribuições dos agentes biológicos, e modelos preditivos para estimar os efeitos do processamento, comercialização e preparação sobre o patógeno (BUCHANAN, 1997). De acordo com Buchanan e Whiting (1996), o uso dos modelos preditivos permite que o impacto das diferentes etapas do processamento sobre um patógeno (uma limitação dos estudos de avaliação quantitativa de riscos) seja adequadamente estimado. Ao se considerar nos modelos de avaliação de riscos os eventos associados aos patógenos microbianos (crescimento, inativação ou sobrevivência, por exemplo) em cada uma das diferentes operações unitárias, através do uso de modelos preditivos podem-se estimar o impacto do processamento, preparação e estocagem nos níveis dos patógenos num determinado alimento e conseqüentemente o número destes que estarão presentes nos alimentos no momento do consumo (avaliação da exposição). Todavia, é importante considerar-se que a microbiologia apresenta algumas limitações (complexidade dos sistemas biológicos, cuidado na validação dos modelos e na extrapolação além dos limites usados para gerar os modelos) que devem ser observadas quando de sua aplicação nos modelos de avaliação de riscos (McNAB, 1997).

A avaliação de dose resposta, estima a relação quantitativa entre a quantidade do agente biológico consumido e a frequência e magnitude dos efeitos adversos na população. Tipicamente, avaliações de dose-resposta estimam taxas de infecção, morbidade e mortalidade. As fontes para obtenção destes dados

podem ser: estudos com voluntários humanos, dados epidemiológicos, dados de animais modelo e estudos clínicos e laboratoriais de determinantes da virulência dos patógenos. Fatores adicionais como seqüelas, infecções secundárias, estado fisiológico de subpopulações específicas e o efeito do substrato (mudanças nas relações dose-resposta associadas com as características do alimento), devem ser considerados. A avaliação da severidade é incluída como parte da avaliação de dose-resposta, pois fornecem meios para avaliação do impacto relativo de um efeito à saúde (BUCHANAN, 1997). A probabilidade de doença é função de fatores complexos associados com o triângulo da doença: o hospedeiro (status imunológico, fisiologia, conteúdo estomacal, idade e doença pré-existente), o patógeno (dose, potencial de crescimento no alimento, potencial de colonização no trato gastrintestinal do hospedeiro, patogenicidade e virulência da espécie, cepa ou sorotipo) e o ambiente (alimento veiculador, tipo de consumo e a presença de microrganismos competidores no alimento e no trato gastrintestinal do hospedeiro) (COLEMAN e MARKS, 1998).

A caracterização do risco é a etapa final da avaliação quantitativa do risco e envolve a integração dos resultados das avaliações de dose-resposta e exposição para fornecer uma estimativa da probabilidade e magnitude do perigo. O risco é uma função da exposição vezes a dose-resposta ($\text{Risco} = \text{exposição} \times \text{dose-resposta}$). Uma parte integral da caracterização do risco é a descrição adequada das incertezas estatísticas e científicas associadas com a avaliação. Como todas as etapas, a caracterização do risco deve ser transparente e a avaliação de risco é sempre mais efetiva quando todas as suposições, resultados, análises e interpretações são adequadamente descritas e discutidas. Além de fornecer as informações necessárias para tomada de decisões dos gestores de riscos, uma

boa caracterização do risco também identifica dados chave atualmente indisponíveis que melhorariam a exatidão de futuras avaliações. Assim, avaliações de riscos para agentes biológicos podem sempre ser aumentadas ou substituídas (melhoradas) quando conhecimento científico ou fatores que influenciam o risco mudem (BUCHANAN, 1997).

A gestão do risco (*risk management*) é responsável por ponderar políticas alternativas na luz dos resultados da avaliação quantitativa do risco e, se requerido, selecionar e implementar opções de controles apropriados (LAMMERDING, 1997). Ela é o componente do processo de análise de riscos representado pelos setores governamental e produtivo de alimentos e na prática é o início do processo de análise de riscos (PAS, 2004). Desta forma, um estudo de avaliação de risco somente é útil quando claramente responde à questão da gestão do risco (LAMMERDING, FAZIL e PAOLI, 2001). A gestão de riscos é estruturada da seguinte forma (FAO, 1997): i) análise da avaliação de riscos; ii) avaliação das opções para gestão do risco; iii) implementação das opções de gestão do risco e iv) monitoramento e revisão das ações implementadas.

A troca de informações e opiniões a respeito do risco e dos fatores relacionados de uma maneira interativa entre assessores de riscos, gestores de riscos e outras partes interessadas é conhecida como comunicação do risco (*risk communication*) (LAMMERDING, 1997, FAO, 1997). A importância da comunicação do risco se deve ao fato de que antes que uma análise de riscos formal seja iniciada, as informações adequadas ao caso devem ser obtidas das partes interessadas para preparar o perfil do risco (PAS, 2004).

3.14.1. Interação entre os Elementos da Análise de Riscos:

O indivíduo responsável pela gestão de risco (gestor de risco) é quem identifica qual o perigo em questão, enquanto o assessor de risco é quem disponibiliza as informações científicas a respeito do perigo selecionado. O assessor de risco determina o nível de exposição ao perigo, tanto através da análise microbiológica dos produtos como pela descrição completa do seu processo de fabricação, desde a matéria-prima até o consumo final, incluindo processamento, armazenamento, transporte e etc.. Assim, os níveis do perigo em diferentes cenários podem ser estimados, bem como a probabilidade da população ser exposta a ele. Para a estimativa final do risco, o assessor de risco caracteriza o risco através da combinação dos dados de exposição ao perigo com os dados em relação à dose-resposta e gravidade dos efeitos, tendo como resultado a estimativa da probabilidade da enfermidade causada pelo perigo em questão, no alimento em consideração, para um consumidor específico. Após a conclusão da avaliação de riscos, tem-se a gestão do risco, onde o gestor de riscos leva em conta os dados da avaliação de riscos e verifica possíveis ações para gerir o risco (boas práticas de fabricação, APPCC) e implementa estas ações e monitora seu funcionamento para se certificar de que elas estão de fato controlando o perigo. Esta avaliação é feita não somente levando-se em conta os dados científicos, mas também questões sociais, éticas, econômicas de maneira a decidir quais ações são necessárias e quais ações são possíveis (OLIVEIRA e FRANCO, 2003). Tendo-se em vista que poucos recursos estão normalmente disponíveis para os gestores de riscos, a integração de análise de riscos e análise econômica pode auxiliá-los a tomar a melhor decisão, baseando-se no seu custo benefício (MORALES e McDOWEEL, 1998). O comunicador de risco comunica

aos interessados (consumidores, indústria e governos) qual a gravidade do problema, quando existente (OLIVEIRA e FRANCO, 2003).

3.14.2. Importância e Limitações da Análise de Riscos:

A habilidade de conduzir estudos de avaliação quantitativa de riscos mudará a forma como órgãos governamentais e a indústria de alimentos conduzem o comércio internacional, já que o maior impacto inicial da ferramenta seja provavelmente nas áreas de equivalência e harmonização. Além disso, a ferramenta irá enfatizar que nenhum alimento é livre de riscos e que cada etapa do processo de produção do campo à mesa tem um papel para garantir a segurança dos alimentos (ICMSF, 1998). Assim, a importância da avaliação de riscos está não somente na habilidade de estimarem-se os riscos de contaminantes dos alimentos e ingredientes, mas também no seu uso como uma estrutura para organizar a gestão do risco baseado em níveis de tolerância em diferentes alimentos (LUPIEN e KENNY, 1998).

Além disso, por analisar os riscos desde a obtenção da matéria-prima até o consumo, a ferramenta melhora o entendimento de pontos chave nos quais informações críticas são necessárias, permitindo sua atualização e melhoria e constantes (LAMMERDING, 1997).

Apesar das melhorias nos últimos anos no campo da microbiologia preditiva, computação, microbiologia analítica e epidemiologia terem permitido o desenvolvimento e impulsionado os estudos de modelagem quantitativa de riscos, a técnica ainda apresenta algumas limitações: i) é uma ferramenta que auxilia a tomada de decisões, mas não substitui julgamentos adequados; ii) decisões

pobres oriundas do uso inapropriado ou má interpretação desta ferramenta, impediriam a aceitação do processo de avaliação de riscos; iii) falta de treinamento dos cientistas ligados à segurança de alimentos nas técnicas de modelagem de riscos; iv) como a avaliação de riscos é baseada na identificação e caracterização dos perigos, ela não pode predizer riscos à saúde humana associados com novos patógenos, para os quais não há dados epidemiológicos, clínicos e microbiológicos. No entanto, a ferramenta pode ser considerada uma forma sistemática de se investigar as informações prioritárias requeridas em diferentes estágios do processo produtivo (ICMSF, 1998).

3.15. Modelagem de Monte Carlo e as Distribuições Estatísticas para Avaliação de Riscos:

O resultado de uma avaliação quantitativa de risco é uma estimativa numérica do risco. Tipicamente, avaliações quantitativas de risco são derivadas do uso de simples pontos como dados de entrada, por exemplo, valores estimados tais como média ou valores que representam o pior caso (“*worst-case*”), tendo-se como resultado a estimativa média do risco ou estimativa do pior caso para o risco considerado. Esta abordagem tem limitação em produzir resultados realísticos, particularmente para sistemas diversos e dinâmicos como os biológicos. Por outro lado, avaliações de riscos que incorporam a variação nos parâmetros de entrada fornecem avaliações mais profundas do risco estudado e são chamadas avaliações probabilísticas ou estocásticas (LAMMERDING, FAZIL e PAOLI, 2001). A necessidade de se considerar as distribuições dos riscos para estudos de avaliação quantitativa de riscos é considerada um desafio no desenvolvimento de

sistemas de gestão da segurança dos alimentos. Assim, os gestores de riscos terão que analisar e interpretar distribuições de riscos que levam em conta tanto a variabilidade inerente dos sistemas biológicos, quanto a incerteza dos dados disponíveis (ICMSF, 1998).

Os dois termos, variabilidade e incerteza descrevem fenômenos distintos e deles dependem o grau de confiança na estimativa definitiva do risco (CODEX, 1999). Enquanto a variabilidade representa uma verdadeira heterogeneidade de um fenômeno bem caracterizado e não pode ser reduzida com medições posteriores, a incerteza representa a falta de conhecimento sobre um fenômeno pouco caracterizado e pode ser reduzida com medições posteriores (BURMASTER e ANDERSON, 1994). Um exemplo de variabilidade (heterogeneidade) pode ser a quantidade de alimentos que as pessoas comem. Ao se conduzir pesquisas sobre os hábitos alimentares ter-se-á a informação de quanto alimento as pessoas consomem, todavia algumas pessoas sempre comerão mais ou menos que outras, independente de quantos dados sejam coletados. Uma ilustração de como a incerteza pode ser reduzida é através da descrição de quanto alimento as pessoas consomem. Com poucas informações, talvez se possam estimar as quantidades mínima e máxima de alimentos consumidos. Conduzindo pesquisas adicionais, as quantidades de alimentos consumidos e a frequência de consumo de diferentes quantidades podem ser determinadas mais precisamente (LAMMERDING, FAZIL e PAOLI, 2001). Devido à influência da incerteza e variabilidade sobre a estimativa do risco, fica patente a grande importância da sua consideração nos estudos de avaliação de riscos.

A variabilidade e incerteza têm diferentes ramificações nos resultados de uma avaliação de riscos e nas decisões da gestão de riscos. Se a variabilidade em

um parâmetro está forçando o risco, então um melhor controle do processo ou fator pode ser necessário para reduzir o risco. A caracterização quantitativa e descritiva da variabilidade fornece informações sobre os extremos das distribuições (LAMMERDING, FAZIL, e PAOLI, 2001), e conforme focado por Miller, Whiting e Smith (1997), estes extremos representam os pontos mais importantes a serem considerados em estudos de avaliação de riscos, pois relativamente poucas embalagens com elevadas contagens de um patógeno, as primeiras células a crescerem, a porção mais termoresistente de uma população bacteriana ou o pouco tempo em que os processos térmicos falham para alcançar a temperatura especificada fazem com que um processo produtivo não seja considerado seguro e destes podem resultar surtos de toxinfecções alimentares.

Se o resultado de interesse é influenciado pela incerteza em um parâmetro, a decisão da gestão pode ser focada na realização de mais pesquisas ou coleta de dados para melhor caracterizar ou entender tal fator, e a avaliação deve ser refeita. Todavia, se uma decisão para reduzir o risco é requerida sob circunstâncias onde a incerteza é significativa, e dados adicionais não estão prontamente disponíveis, então uma decisão conservadora pode ser necessária. Esta filosofia é baseada num princípio de precaução, com decisões baseadas em ações orientadas pela falta de informações suficientes que favoreceriam a segurança (LAMMERDING, FAZIL e PAOLI, 2001).

Ambas, a variabilidade e a incerteza, são inerentes em todas as estimativas usadas na avaliação de riscos e numerosas ferramentas estão disponíveis para a sua análise. Técnicas estatísticas são as mais comumente usadas para caracterizar a incerteza de uma faixa de valores. As distribuições de probabilidades são equações matemáticas ou representações gráficas da relação

entre todos os possíveis valores (ou resultados) que uma variável pode ter e da probabilidade de que certa variável tenha um determinado valor. Estas são poderosas ferramentas porque permitem que o analista considere uma faixa inteira de valores qualquer uma das variáveis em análise. Intervalos de confiança relacionados ao redor de pontos estimados e cenários melhor / pior caso podem também facilitar a consideração da variabilidade na análise (JAYKUS, 1996).

Por mais de 50 anos a modelagem de Monte Carlo vem sendo utilizada em física, química e em muitas outras disciplinas para se lidar com integrais multi-dimensionais de alta dificuldade (BURMASTER e ANDERSON, 1994).

A simulação de Monte Carlo pode ser aplicada a modelos determinísticos existentes pela substituição de pontos estimados por distribuições de probabilidades. A simulação de Monte Carlo envolve a amostragem randômica de cada distribuição de probabilidade do modelo, centenas ou milhares de vezes, produzindo um novo cenário a cada iteração. Em essência, um novo ponto estimado é gerado a cada iteração para cada parâmetro do modelo e o resultado registrado. O processo é repetido até que cada distribuição de probabilidade individual tenha sido suficientemente recriada (LAMMERDING, FAZIL e PAOLI, 2001). O grande papel e trunfo da modelagem de Monte Carlo é obter dados com erros muito pequenos e aceitáveis a partir dos dados de entrada (observados) sem desordenadamente gastar tempo e trabalho na sua obtenção (HAMMERSLEY, 1960). Em outras palavras, a modelagem de Monte Carlo seleciona um valor amostral a cada iteração que é baseada numa probabilidade de distribuição. Assim, baseando-se nos parâmetros da distribuição, os valores mais prováveis são selecionados mais freqüentemente que os valores menos prováveis, os quais refletem os eventos que aconteceriam na realidade mais

fielmente. Além desta, a modelagem de Monte Carlo permite ao modelo ser usado para determinar a magnitude da estimativa do risco, o que pode servir para focar os esforços de pesquisa, gestão ou modelagem nos fatores mais importantes a impactarem o risco. Variáveis que significativamente impactam o risco, devem ser consideradas avaliadas primeiro pelo assessor de risco e ser descritas e destacadas na caracterização de risco (LAMMERDING, FAZIL e PAOLI, 2001). A cada iteração, a área referente a toda distribuição estatística é coberta até que se atinge a convergência. O número de iterações requerido para que as distribuições de saída possam convergir depende do modelo que está sendo simulado e das funções de distribuição do mesmo. Os modelos mais complexos com distribuições altamente desviadas necessitarão de mais iterações que os modelos mais simples (PALISADE, 2007).

A difusão do uso da modelagem de Monte Carlo para avaliação de riscos à saúde pública e ambiental promete significantes melhorias no rigor científico destas avaliações e pelo fato de serem mais computacionalmente intensivos do que as técnicas determinísticas ou de pontos estimados, é importante sempre se considerar a necessidade de salvaguardas e precauções para reduzir os erros e prevenir abusos. Os 14 princípios de boas práticas para uso das técnicas de Monte Carlo foram descritos por Burmaster e Anderson (1994) e devem sempre ser considerados quando do seu uso, pois apesar de ser uma técnica valiosa e poderosa para avaliação de riscos microbiológicos em alimentos, apresenta algumas limitações que podem tornar seu uso impróprio e os resultados não confiáveis, caso não sejam conhecidas do analista.

Na prática a modelagem de Monte Carlo é facilitada pela utilização de softwares como o “@RISK” (Palisade Corp. – U.S.A.) e “Crystal Ball”

(Decisioneering Inc., USA) (CASSIN, PAOLI e LAMMERDING, 1998). @ Risk usa a simulação de Monte Carlo e possui interface com o Microsoft Excel, permitindo incluir no modelo incertezas, variáveis e tipos de distribuições para gerar todos os valores e probabilidades possíveis, que são ilustrados através de gráficos compreensíveis, permitindo-se avaliar o risco de um evento estudado (PALISADE CORP, 2006).

Para a simulação de Monte Carlo a escolha das formas das distribuições que descrevem os dados de entrada é uma importante tarefa para obter-se a mais adequada que pode caracterizar o ajuste dos dados (HAAS, 1997). Vose (2000), também suporta a importância da apropriada aplicação das distribuições de probabilidade para representar a incerteza e variabilidade do problema mais precisamente.

As distribuições estatísticas mais comumente consideradas para avaliação de riscos podem ser divididas em: discreta e contínua; unida e não unida e paramétrica e não paramétrica (VOSE, 2000). As distribuições mais comuns aplicadas à análise de riscos são (VOSE, 2000; LAMMERDING, FAZIL E PAOLI, 2001):

- Beta: Esta distribuição é usada para descrever a incerteza da probabilidade de ocorrência de um evento com um número de julgamentos feitos com um número de sucessos registrados. Na avaliação de riscos é usada para modelar a probabilidade de ocorrência de um evento, como a prevalência de patógenos (*Figura 6 - A*);

- Binomial: A distribuição binomial pode ser usada para modelar o número de sucessos de um número de julgamentos assumindo que a probabilidade de sucesso em cada julgamento é constante (*Figura 6 - B*);

- Poisson: Esta distribuição pode ser usada para modelar o número de ocorrências de um evento em um intervalo de tempo, por exemplo, se se objetiva saber quantos microrganismos serão encontrados se uma amostra de 10 g for coletada de um tanque que tem uma concentração de 0,5 UFC/g de um microrganismo (*Figura 6 - C*);

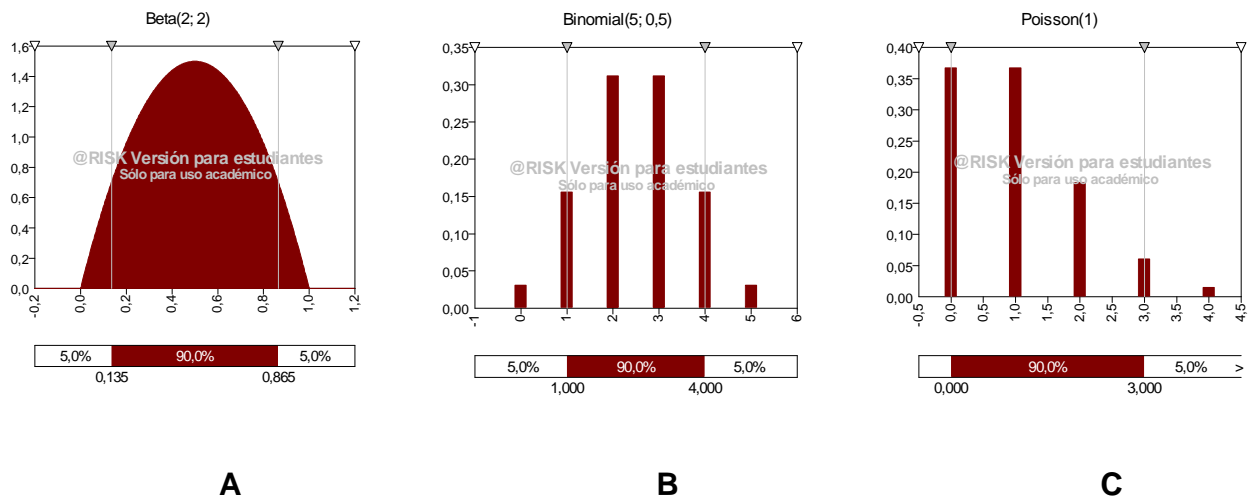


Figura 06: Formato das Distribuições Beta (A), Binomial (B) e Poisson (C).

- Exponencial: Considera que um evento que é puramente randômico com uma probabilidade constante por unidade de tempo da ocorrência. Em outras palavras, esta distribuição é usada para descrever o intervalo (tempo, volume, massa) entre a ocorrência de um evento, sendo a distribuição relacionada a Poisson. O tempo entre as ocorrências do evento é descrito por esta distribuição e

por isso ela requer o intervalo médio antes da ocorrência de um evento (*Figura 7-A*);

- Gama: A distribuição Gama é relacionada às distribuições exponencial e Poisson e pode ser usada para modelar o tempo requerido para um evento ocorrer, dado que o evento ocorre ao acaso (*Figura 7 - B*);

- LogNormal: São comumente usadas para descrever a ocorrência de fenômenos naturais, já que muitos processos físicos e biológicos seguem este tipo de distribuição. É útil para modelar variáveis de ocorrência natural que são o produto de um número de outras variáveis de ocorrência natural. Ela sempre apresenta uma curvatura positiva e na avaliação de riscos é usada para descrever a concentração de microrganismos nos substratos (*Figura 7 - C*);

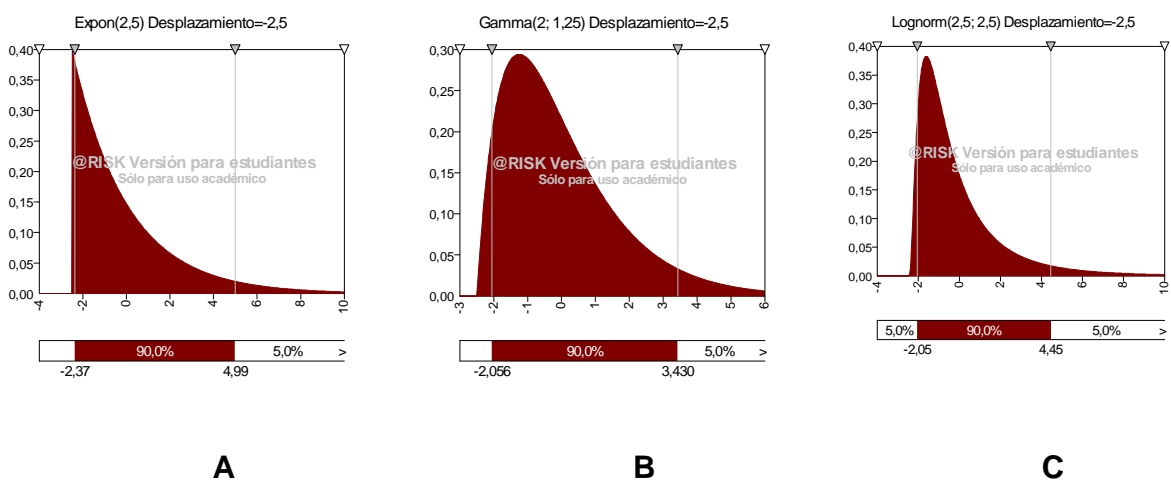


Figura 07: Formato das Distribuições Exponencial (A), Gama (B) e LogNormal (C).

-Normal: É talvez a distribuição mais reconhecida e comumente usada em todos os campos de estudo. É usada para descrição de variáveis ao acaso, assim como a distribuição lognormal, também a soma de variáveis ao acaso. Como ela

se estende de valores negativos a positivos infinitos, cuidado deve ser tomado na sua aplicação para evitar resultados extremamente grandes. Este tipo de distribuição é comumente observada em eventos naturais (*Figura 8 - A*);

- Triangular: É usada na avaliação de riscos como uma distribuição quando da ausência de dados suficientes, pois somente requer uma estimativa dos valores mínimo, máximo e mais provável que a variável pode assumir. Suas propriedades estatísticas são derivadas da sua geometria e normalmente pode ter muita flexibilidade na sua forma e junto com a natureza intuitiva da definição de seus parâmetros e velocidade de uso, sendo desta forma, bastante usada pelos avaliadores de riscos (*Figura 8 - B*);

- Uniforme: É mais grosseira do que a distribuição triangular, pois somente requer estimativas dos valores mínimo e máximo que a variável pode assumir. É uma distribuição de pobre representação da realidade, pois considera a mesma probabilidade para todos os valores de uma faixa e só é usada quando poucos dados estão disponíveis ou não existem. Todavia estes tipos de distribuição são importantes para demonstrar que pouco se sabe do parâmetro (*Figura 8 - C*);

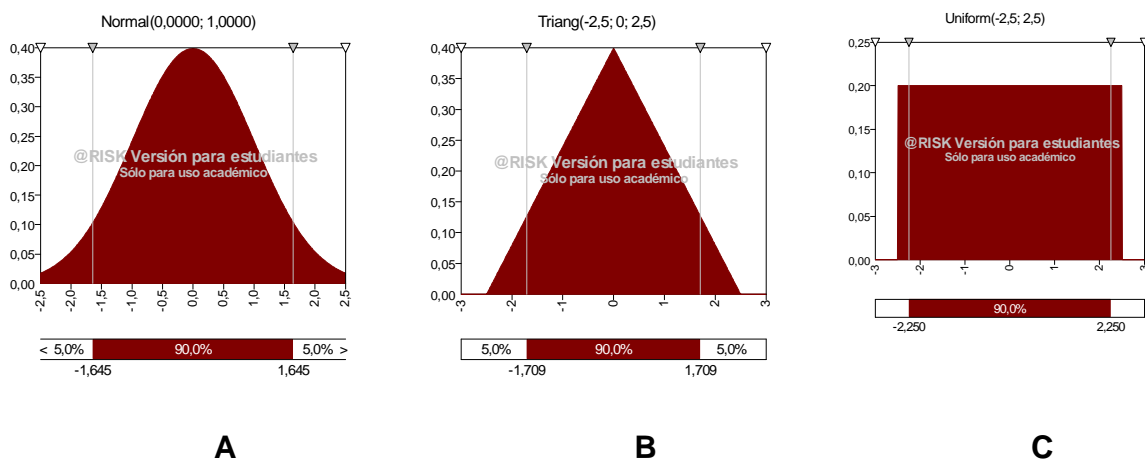
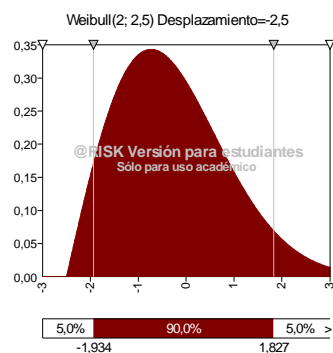


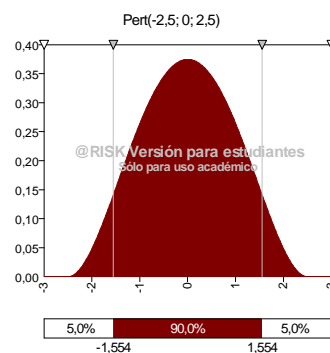
Figura 08: Formato das Distribuições Normal (A), Triangular (B) e Uniforme (C).

- Weibull: É comumente usada para modelar o tempo até a ocorrência de um evento onde a probabilidade de ocorrência muda com o tempo. Um exemplo de sua aplicação pode ser o aumento da quantidade de toxina produzida por um microrganismo com o passar do tempo e conseqüente aumento da probabilidade de uma toxinfecção alimentar (*Figura 9 - A*);

- Pert: A distribuição PERT é uma versão de quatro parâmetros da distribuição Beta e requer os mesmos parâmetros de uma distribuição triangular (valores mínimo, mais provável e máximo), no entanto, a média para a PERT é quatro vezes mais sensível ao valor mais provável do que aos valores mínimo e máximo, assim, seu desvio padrão é menor e seu uso resulta em aproximadamente 10% menos incerteza do modelo do que um equivalente usando a distribuição triangular (*Figura 9 - B*).



A



B

Figura 09: Formato da Distribuição Weibull (A) e Pert (B).

3.1. Aplicações da Análise de Risco:

As indústrias de alimentos estão em contínua mudança com respeito aos perigos e riscos microbiológicos. Isto ocorre em virtude do desenvolvimento de novos produtos e processos, mudanças nas matérias-primas e consumidores-alvos. Os microbiologistas são usualmente os responsáveis pela avaliação do impacto de tais mudanças no risco, indicando como mudanças no processamento e preparo de um determinado alimento, podem afetar as probabilidades dele causar uma toxinfecção alimentar. A avaliação de riscos permite que o impacto das matérias-primas e processamento sejam avaliados e os resultados obtidos sejam usados para gestão e comunicação do risco (BROWN *et al.*, 1998).

Tradicionalmente, avaliações dos riscos associados com perigos microbiológicos nos alimentos (grupos ou alimentos específicos) têm sido baseadas em descrições qualitativas do perigo, rotas de exposição, práticas na manipulação e/ou conseqüências da exposição. A quantificação de qualquer um dos elementos citados é uma tarefa desafiadora, pelo fato de que muitos fatores influenciam o risco de uma doença veiculada por alimento, as interpretações dos dados sobre a prevalência, número e comportamento dos microrganismos, e dados estatísticos. Assim políticas, regulamentações e outros tipos de ações preocupadas com a segurança dos alimentos têm sido largamente baseadas em especulações e informações subjetivas. Todavia, avanços no conhecimento, técnicas analíticas, dados de saúde pública, combinados com o aumento da consciência dos consumidores, considerações do comércio internacional e a percepção do real impacto das doenças causadas por microrganismos veiculados pelos alimentos, levaram a utilização da avaliação quantitativa do risco para

suportar a tomada de decisões e priorizar ações na gestão da segurança dos alimentos (LAMMERDING, FAZIL e PAOLI, 2001).

Com intuito de avaliar as mudanças durante o processamento de um produto ou matérias-primas sobre o risco associado a uma população, diversos estudos de avaliação quantitativa de riscos tem sido desenvolvidos recentemente. A maioria deles tem como microrganismo alvo da preocupação *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*, com outros poucos trabalhos tendo como patógeno estudado, *Bacillus cereus*, *Campylobacter spp*, *Staphylococcus aureus* e *E.coli* 0157:H7.

Boa parte dos trabalhos desenvolvidos considera a aplicação da abordagem multi-etapas e de modelos preditivos de crescimento ou inativação para entender o comportamento microbiano durante o processamento de um determinado alimento. Whiting e Buchanan (1997), usaram a abordagem de operações unitárias (etapa por etapa) e simulação estocástica, dados de frequência do patógeno na matéria-prima, modelos preditivos de crescimento e inativação e modelos de dose resposta para infectividade integrados, criaram um modelo quantitativo para determinação do risco de infecção por *Salmonella* Enteritidis a partir de maionese caseira feita com ovo líquido pasteurizado. Através da abordagem adotada neste estudo, foi possível identificar-se os pontos críticos de controle e avaliar o impacto da alteração das formulações ou processo na segurança do produto. Em 2000, Whiting *et al.* (2000), desenvolveram um modelo quantitativo de risco para *Salmonella* Enteritides (SE) em ovos. A abordagem multi-etapas foi utilizada, através de um modelo estocástico para o crescimento de SE desde a coleta e durante o processamento, estocagem e transporte dos ovos. O modelo continha equações para descrever a temperatura interna dos ovos, integridade da membrana da gema e taxa de crescimento exponencial de SE.

Através da utilização da modelagem de Monte Carlo, observou-se que a temperatura do ar ambiente tem grande importância na prevenção do crescimento de SE nos ovos e desta forma, se a estocagem à temperatura ambiente for prevenida ou se se refrigerar imediatamente os ovos após eles terem sido postos. Bemrah *et al.* (2002), fizeram a avaliação quantitativa do risco de salmonelose pelo consumo de “*cordon bleus*”, um produto à base de carne de peru em estabelecimentos de alimentação coletiva na França. Os autores utilizaram o software @Risk e modelaram e simularam o processo a partir da estocagem inicial sob congelamento até o consumo do produto, determinando o risco de salmonelose, risco de um surto e o número de casos. Os dados de prevalência e nível de contaminação dos “*cordon bleus*” por *Salmonella spp* foram obtidos a partir da análise dos produtos e os dados de estocagem e cozimento coletados das unidades de alimentação. Determinou-se a cinética de inativação térmica de *Salmonella spp* no produto para determinar o efeito do cozimento sobre o microrganismo e para calcular a dose do patógeno ingerida pelos consumidores. Os autores observaram que o risco de salmonelose após o cozimento em forno foi próximo a zero se o nível inicial de contaminação do produto e tempo de cozimento foram suficientes para alcançar os 63°C de temperatura média recomendadas. No entanto, o risco poderia ser importante se o produto é cozido por fritura durante um curto tempo e se a carga contaminante inicial é alta. Oscar (2004), desenvolveu um modelo de avaliação quantitativa de risco para *Salmonella* em frangos inteiros. O autor utilizou-se de modelos preditivos e dados de ocorrência do patógeno disponíveis na literatura para definir os cenários do modelo, que foi construído em uma planilha do Excel e simulado através do software @Risk. O modelo campo-mesa foi aplicado considerando uma série de

operações unitárias e o evento do patógeno associado, que incluíram: contaminação inicial, crescimento durante o transporte pelo consumidor, inativação térmica durante o cozimento, contaminação cruzada durante o consumo e dose resposta após o consumo. Para o cenário simulado, a avaliação quantitativa de risco predisse 0,44 casos anuais de salmonelose por 100.000 consumidores, estando consistente com os dados epidemiológicos disponíveis que indicam entre 0,66 e 0,88 casos anuais de salmonelose por 100.000 consumidores de frango nos Estados Unidos. Os autores ainda atentam para o fato de que muitas suposições foram feitas e, portanto, operações unitárias e eventos dos patógenos que podem ser importantes não foram considerados, indicando a necessidade de refino do modelo gerado no estudo quando estes dados estiverem disponíveis. McElroy, Jaykus e Foegeding (1999), desenvolveram um modelo quantitativo de risco para *Bacillus cereus* (cepa emética) associados com o consumo de arroz à chinesa. Os autores utilizaram a abordagem multi-etapas e dados de literatura sobre a incidência e níveis de contaminação de arroz por *B.cereus*, determinando-se a distribuição do microrganismo em um lote de arroz contaminado utilizando-se o software Crystal Ball 4.0, que faz a modelagem de Monte Carlo. Modelos de crescimento e inativação do patógeno durante as etapas de preparo do arroz foram gerados experimentalmente através do uso de três diferentes cepas do microrganismo. Os dados de dose resposta foram baseados nos dados epidemiológicos da doença provocada pelo microrganismo entre 1971 e 1985 e a caracterização do risco foi obtida através da probabilidade de exposição a cada dose combinada com a respectiva probabilidade de doença de uma dada concentração do microrganismo no arroz cozido. Pela utilização de diferentes temperaturas de manutenção do arroz após o preparo (60°C, 20°C e

30°C), os autores observaram ser o risco da doença altamente correlacionado com a temperatura de abuso na qual o alimento é exposto. Cassin *et al.* (1998), desenvolveram um modelo quantitativo de risco para *E.coli* 0157:H7 e hambúrguer bovino. Cenários de análise foram estabelecidos e modelos preditivos foram usados para fornecer uma avaliação objetiva das características higiênicas do processo de fabricação. Os autores também utilizaram a modelagem de Monte Carlo para gerar os dados de saída e foi predito que a probabilidade de síndrome urêmica hemolítica de $3,7 \times 10^{-7}$ e a de morte de $1,9 \times 10^{-7}$ por refeição para os muitos jovens. Os autores concluem ser estas estimativas altas para todos os tipos de hambúrgueres, mas razoáveis para aqueles caseiros.

Um modelo de avaliação quantitativa de risco para *Vibrio parahaemolyticus* (VP) em ostras cruas foi desenvolvido e proposto pelo *Food and Drug Administration* - FDA (FDA-CFSAN, 2000; 2005). O modelo utiliza a abordagem multi-etapas e o software @Risk para determinação da variabilidade e incerteza da descrição do processo associado com as densidades de VP nas ostras, os efeitos da captura sobre as mesmas, do consumo pelo homem e a resposta deste ao patógeno (infecção). Através da combinação destes fatores com modelos de crescimento, inativação e dose-resposta, simulou-se os dados através de modelos probabilísticos de maneira a se predizer a linha base de distribuição do risco de infecção para cada região / estação associada ao consumo de ostras.

Outra abordagem da avaliação quantitativa de risco que tem sido adotada é na avaliação da adoção de medidas para redução dos riscos associados a um determinado alimento. Maijala *et al.* (2005) desenvolveram um modelo de avaliação quantitativa do risco para *Salmonella* em frangos de corte na Finlândia de modo a avaliar o impacto das medidas adotadas no Programa Finlandês de

176

Controle da *Salmonella* (FSCP). O modelo indicou através dos resultados simulados que a remoção de aves *Salmonella*-positivas e o tratamento térmico da carne originária destas aves protegiam significativamente a saúde pública. Em adição, autores relataram que a combinação destas duas medidas foi mais efetiva do que a aplicação de uma delas sozinha quando um alto nível de contaminação esteve presente na cadeia produtiva. Um modelo de avaliação quantitativa do risco para infecção por *Salmonella spp* a partir do consumo de amêndoas cruas foi desenvolvido por Danyluk, Harris e Schaffner (2006). O modelo considerou o nível de contaminação nas matérias-primas por *Salmonella spp*, tempo e número de reduções nos níveis do patógeno durante o processamento e estocagem e quantidade de amêndoa consumida para calcular o número de salmoneloses / ano. A simulação estimou uma probabilidade de 78% de que um ou mais casos de salmonelose ocorram por ano pelo consumo de amêndoas cruas. Quando o processo comercial de aplicação de óxido de propileno foi aplicado, o risco para se adquirir salmonelose foi reduzido a 0,01% e quando outros tratamentos capazes de causar 5 reduções logarítmicas deste patógeno foram aplicados, o risco de salmonelose pôde ser reduzido até 0,21%, demonstrando a importância da aplicação dos tratamentos com óxido de propileno ou de outros capazes de causarem 5 reduções decimais para a segurança destes produtos. Miller, Whiting e Smith (1997), propuseram a utilização da avaliação de risco para reduzir a incidência de listeriose já que a ferramenta pode ser útil para estabelecer critérios para matérias-primas, práticas na manipulação e processamento e sistemas de higienização das plantas industriais. Os autores utilizaram dados de literatura, o software *Pathogen Modelling Program* para modelagem preditiva e a modelagem de Monte Carlo, através do software @Risk para o estudo de diferentes cenários e

concluíram que a avaliação de risco ensina que mesmo se poucas embalagens de um lote ou mais de um lote por uma semana excede o risco aceitável para um patógeno, o processo deveria ser considerado inseguro, já que para a avaliação de riscos os eventos mais relevantes são os extremos, como poucas embalagens com elevada carga contaminante, as primeiras células a crescerem, a porção mais termoresistente de uma população microbiana ou o pouco tempo em que o processo não atingiu a temperatura adequada para um determinado tratamento térmico.

Walls (2006), reportou o estabelecimento de objetivos de segurança alimentar (OSA) para gestão de *Listeria monocytogenes* em pratos prontos através da realização da avaliação quantitativa do risco. Neste caso, a avaliação do risco foi usada para atingir-se um determinado nível de proteção à saúde. Foi feita, a identificação e caracterização do perigo, avaliação da exposição e na caracterização do risco, considerou-se o risco por servida de um consumidor por ano, sendo os alimentos divididos em categorias de risco (muito alta, alta, moderada, baixa e muito baixa) de maneira que se pudesse prever o número de casos por servida e por ano para cada categoria. Após a avaliação do risco, ações para sua gestão foram sugeridas de forma a reduzir a probabilidade de contaminação ou crescimento de *L.monocytogenes* nos alimentos. A autora sugeriu que estratégias como boas práticas de fabricação (BPF) e o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle fossem adotados com esse intuito, para poder-se garantir que o OSA fosse atingido. Outro exemplo de aplicação de um OSA e avaliação de risco foi estudo realizado por Pérez-Rodríguez *et al.* (2006). Através do estabelecimento de uma série de cenários de contaminação cruzada, avaliaram-se e ordenaram-se os cenários de acordo com o nível de risco

de cada um, e o quanto eles excediam o OSA determinado para *Listeria monocytogenes*. Segundo os autores o uso de cenários permite modelar o processo mais efetivo e assim fornecer aos gestores de risco informações apropriadas para basearem suas decisões. Uyttendaele *et al.* (2006), utilizaram a avaliação quantitativa de risco de *Campylobacter spp* em preparações à base de carne de frango e através de uma abordagem varejo-mesa e da definição de módulos para avaliação do risco, concluíram que a ferramenta de avaliação quantitativa do risco serve também como um suporte para auxiliar os gestores de riscos a definir limites microbiológicos (como “nível apropriado”), os quais devem ser aceitáveis tanto pelas indústrias e pelas autoridades de saúde pública, com o objetivo de se controlar a presença de *Campylobacter spp* em preparações alimentícias à base de carne de frango.

A ferramenta também tem sido usada para quantificar-se o risco de infecção por diversos microrganismos. Brown *et al.* (1998), demonstraram a aplicação dos princípios desta ferramenta na determinação e comparação do risco de infecção por *Salmonella* em produtos congelados de frango. O modelo levou em conta a ocorrência e distribuição do patógeno, sensibilidade das populações à infecção (normal ou susceptível) e o efeito do cozimento (na indústria ou em casa) na concentração de *Salmonella spp* (sendo que o crescimento do microrganismo e recontaminação não foram considerados) e determinaram-se os riscos de infecção após o consumo do produto. Alban *et al.* (2002), desenvolveram um modelo quantitativo para avaliação do risco de salmonelose devido à contaminação de salsichas de carne suína por *Salmonella* Thyphimurium DT 104, uma cepa multiresistente a antibióticos. Usando o software @Risk foi estimado o número de casos devido ao consumo de salsichas contaminadas. Estimou-se que 25 g de

salsicha servidas, até duas DT 104 poderiam ser encontradas em cada uma das 245 refeições servidas, enquanto que para salsichas importadas até duas DT 104 poderiam ocorrer em cada uma das 19.260 refeições, demonstrando que raramente a *Salmonella* estará presente no produto e quando estiver, será em baixos números. Já Giovannini *et al.* (2004), utilizaram a avaliação quantitativa de risco para determinação do risco de salmonelose devido ao consumo de produtos derivados de suínos em uma região da Itália. Os autores determinaram a ocorrência e prevalência do patógeno nos produtos derivados de carne suína, avaliaram quantitativamente *Salmonella spp* nos produtos mais contaminados, avaliaram a quantidade destes produtos consumidos pela população da região de Abruzzi, Itália. A avaliação da exposição foi feita através da simulação utilizando-se a modelagem de Monte Carlo. Os resultados mostraram ser o consumo de lingüiças frescas uma importante fonte de infecção por *Salmonella spp* na região de Abruzzi e segundo os dados de validação, a incidência anual de salmonelose na região é da ordem de 3 a 8,4%. Lindqvist e Westöö (2000), determinaram o risco de infecção por *L.monocytogenes* em salmão e truta defumados na Suécia, através do uso do software@Risk (simulação de Monte Carlo) e sem a inclusão de modelos de crescimento e inativação do microrganismo, determinando e comparando o número de casos de listeriose anuais reportados.

A avaliação de riscos conforme estabelecida pelo *Codex Alimentarius* (CODEX, 1999) foi concebida para ser conduzida no nível governamental e com sua aplicação tendo como objetivo garantir a segurança dos alimentos. No entanto, a utilização de alguns elementos da avaliação de riscos (identificação sistemática do perigo e avaliação da exposição) pelas indústrias de alimentos para estimar probabilidades de ocorrência de alguns contaminantes nos produtos finais,

permite determinar para qual perigo uma avaliação mais detalhada deve ser feita e também quais fatores de risco e medidas de controle são mais importantes e tem o melhor custo benefício, respectivamente. Esta abordagem torna a avaliação quantitativa de riscos uma ferramenta poderosa para as indústrias de alimentos como uma extensão ou validação do sistema APPCC (HOORNSTRA et al., 2001).

Uma interessante abordagem de uma sistemática adotada para avaliação de riscos foi demonstrada por Sypoos, Reichart e Mészáros (2005) que desenvolveram um estudo para avaliação da probabilidade da presença e detecção de bactérias indicadoras de higiene, baseando-se no efeito da cloração para inativação de *Klebsiella oxytoca* na indústria de bebidas. O modelo levou em conta o nível inicial de contaminação, concentração de cloro, tempo de residência nos tanques de distribuição com sua distribuição de probabilidade e com a probabilidade de detecção do microrganismo na água tratada em função da concentração inicial do microrganismo. A simulação de Monte Carlo foi usada para avaliação dos dados e o modelo de risco foi validado por um período de seis meses, sendo a relação linear entre as probabilidades de detecção de *Klebsiella* previstas e observadas, caracterizada por um coeficiente de determinação (r^2) de 0,905. Nesta mesma linha de aplicação, Shorten *et al.* (2006) utilizaram modelos preditivos probabilísticos de crescimento microbiano para avaliar a probabilidade de populações microbianas de *Erwinia carotovora* excederem um nível pré-definido de deterioração. Os modelos preditivos foram incorporados aos principais fatores de riscos como variabilidade da cepa microbiana, níveis de contaminação inicial e ambiental e a incerteza entre os experimentos laboratoriais e a planta de processamento para quantificar o risco do crescimento de *Erwinia carotovora* em suco vegetal frente a condições de temperatura variáveis. Foi mostrado que

associação dos componentes de risco com diferentes fatores pode ser uma valiosa ferramenta para o desenvolvimento de estratégias para redução dos riscos de deterioração dos alimentos por microrganismos. Nestes estudos apesar de não ter sido utilizada a abordagem sistemática requerida pelo *Codex Alimentarius* (CODEX, 1999), incerteza e variabilidade foram levadas em conta para descrição dos riscos estudados. Desta forma, a consideração de incerteza e variabilidade associadas a modelos preditivos simulados usando-se a modelagem de Monte Carlo, por exemplo, poderiam garantir que um enfoque para assegurar a qualidade dos alimentos pudesse ser desenvolvido diretamente pelas indústrias, o que poderia resultar em diversos benefícios, como por exemplo: a redução da probabilidade de perdas de lotes de produtos contaminados com microrganismos deterioradores; um melhor conhecimento dos pontos do processo onde mais informações são necessárias para garantir o controle destes microrganismos; em quais etapas os controles são essenciais para evitar as perdas; estabelecimento mais racional de especificações de matérias-primas de maneira a se ter uma taxa de deterioração aceitável, além de permitir a indústria validar seus controles adotados *in loco*.

CAPÍTULO 4

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material:

4.1.1. Sucos de Maçã:

Para condução dos experimentos foram utilizadas amostras comerciais de suco pasteurizado de maçã não clarificado pronto para beber (11°Brix) e sucos concentrados de maçã, clarificado (70°Brix) e não clarificado (45°Brix).

O suco clarificado de maçã, concentrado e congelado, foi proveniente de duas indústrias localizadas respectivamente no sul e sudeste do Brasil. O suco não clarificado de maçã concentrado e congelado foi doado por outra indústria localizada no sudeste do Brasil. Os sucos concentrados foram transportados e mantidos sob congelamento (-20°C) até utilização nos experimentos, com o intuito de evitar a introdução de quaisquer outras variáveis que pudessem interferir no crescimento, resistência térmica e capacidade de produção da patulina pelos fungos testados. Na *Tabela 3* é mostrada a caracterização físico-química dos sucos concentrados de maçã utilizados para o desenvolvimento dos experimentos.

Tabela 3: Caracterização físico-química dos sucos concentrados de maçã.

Tipo de suco de maçã	pH	°Brix	Acidez (% ácido málico)
Clarificado	3,88	70,2	1,30
Não clarificado	3,66	45,5	0,81

As amostras de suco pasteurizado não clarificado pronto para o consumo foram obtidas de uma única indústria localizada no sudeste brasileiro. Os sucos foram processados entre fevereiro e maio de 2006 e recebidos em embalagens cartonadas, multicamadas, com selagem de topo, fundos e laterais intactas, sendo mantidos à temperatura ambiente até o momento da análise. Na *Tabela 4* é mostrada a composição de ingredientes dos 5 lotes analisados, de acordo como eram apresentados nas embalagens.

Tabela 4: Composição de ingredientes dos diferentes lotes de suco pasteurizado de maçã pronto para beber de acordo com as embalagens.

Lote	Composição
12/02/2006 (A2378)	Polpa e suco concentrado de maçã, água e aroma natural de maçã;
05/03/2006 (B2438)	Água, suco concentrado de maçã, ácido cítrico, aroma idêntico ao natural de maçã e antioxidante ácido ascórbico;
05/04/2006 (A2498)	Água, suco concentrado de maçã, ácido cítrico, aroma idêntico ao natural de maçã e antioxidante ácido ascórbico;
29/04/2006 (B2559)	Água, suco concentrado de maçã, ácido cítrico, aroma idêntico ao natural de maçã e antioxidante ácido ascórbico;
28/05/2006 (A2626)	Água, suco concentrado de maçã, ácido cítrico, aroma idêntico ao natural de maçã e antioxidante ácido ascórbico.

4.1.2. Microrganismos:

Três cepas de *Byssochlamys spp* de diferentes origens foram usadas (Tabela 5). A cepa de *B.nivea* ATCC 24008 e a de *B.nivea* FRR 4421, foram escolhidas por já serem reconhecidas como produtoras de patulina. No entanto, confirmou-se a sua capacidade de produção de patulina nas condições e substratos utilizados. Uma cepa de *B.fulva* foi utilizada por ser pertencente à coleção de culturas do laboratório de Termobacteriologia (FEA-UNICAMP). A cepa de *B.fulva* foi catalogada na coleção de culturas do Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, e recebeu o código **IOC 4518**.

Tabela 5: Cepas de *Byssochlamys spp* utilizadas e sua origem.

Microrganismo	Identificação da cepa	País de origem	Material de onde foi isolada	Relato de Produção Patulina
<i>B.fulva</i>	IOC [†] 4518	Brasil	Maçã	ND*
<i>B. nivea</i>	ATCC [‡] 24008	EUA	Superfície de colheitadeira mecânica de uva	Sim
<i>B. nivea</i>	FRR [†] 4421	Brasil	Morangos	Sim

*ND: não descrito na literatura. [†]IOC se refere à coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[‡]ATCC se refere à coleção de culturas da *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA. [†]FRR se refere à coleção de culturas do *Food Science Australia*, North Ryde, NSW, Austrália.

As cepas foram caracterizadas baseando-se na metodologia descrita por Pitt e Hocking (1999), sendo observadas as características macro e

micromorfológicas das colônias. O controle de identidade de duas (*B.nivea* FRR 4421 e *B.fulva* IOC 4518) das três cepas utilizadas no presente estudo foi também verificado através de ensaios genéticos realizado no *Laboratoire de Pharmacologie –Toxicologie*, do *L'Institut National de la Recherche Agronomique*, Toulouse – França pelo Dr Olivier Puel. As cepas *B.nivea* FRR 4421 e *B.fulva* IOC 4518, tiveram sua identidade confirmada através do sequenciamento genético do fragmento ITS (*internal transcribed spacer*), conforme metodologia adotada por Puel *et al.* (2007). O sequenciamento foi realizado a partir da extremidade 5' (ITS5) e a da extremidade 4' (ITS4). Optou-se pelo sequenciamento do fragmento ITS por ser um procedimento de realização mais simples do que o sequenciamento do fragmento β -tubulina, justamente por não requerer clonagem e pelo método produzir resultados em menos tempo (Puel, 2007, comunicação pessoal). Estes ensaios não foram realizados com a cepa *B.nivea* ATCC 24008 por ela já ter tido sua identidade anteriormente confirmada também por Puel *et al.* (2007).

4.1.3. Embalagens:

Garrafas PET com capacidade para aproximadamente 500 mL foram usadas nos ensaios de determinação da capacidade de produção de patulina (4.2.7) e da probabilidade de produção de patulina (4.2.12). As garrafas foram higienizadas com solução 0,05% v/v de ácido peracético. Para higienização, cada uma das garrafas foi completamente preenchida com a solução sanificante sob condições assépticas, e mantidas por um tempo de contato de 30 minutos (capela

de fluxo laminar). Após este período a solução sanificante foi descartada e as garrafas foram enxaguadas e rinsadas duas vezes com água destilada estéril, de maneira a se retirar quaisquer resíduos do sanificante que pudessem interferir no crescimento e produção da patulina pelo fungo. As tampas foram higienizadas por imersão em solução 0,01% v/v de ácido peracético, sendo posteriormente enxaguadas e rinsadas por duas vezes com água destilada estéril e fechadas nas garrafas. As garrafas fechadas foram dispostas em sacos plásticos estéreis (60L) até a utilização.

Além destas garrafas, garrafas de vidro, com capacidade para aproximadamente 170 mL foram usadas no ensaio de determinação do efeito do processo térmico equivalente (item 4.2.12). As garrafas foram esterilizadas à 121°C/30 minutos em autoclave, enquanto as tampas metálicas foram lavadas e sanificadas (no dia do experimento) com solução de ácido peracético 0,01% por 30 minutos. O enxagüe para retirada do excesso de resíduos de ácido peracético foi realizado em álcool 70%, seguido de secagem em câmara de fluxo laminar (próximo à chama de uma lamparina) e colocação nas bocas das garrafas contendo o suco pasteurizado. As garrafas foram então fechadas com o auxílio de recravadeira manual.

4.2. Métodos:

4.2.1. Determinação do pH e °Brix das amostras de suco pronto para beber, sucos concentrados e sucos inoculados com as cepas de *B.fulva* e *B.nivea*:

Os valores de pH e °Brix das amostras de suco pasteurizado de maçã pronto para beber (item 4.1.1) e dos sucos inoculados com as cepas de *B.fulva* / *B.nivea* (item 4.2.7) foram determinados com o auxílio de potenciômetro digital Digimed, modelo DMpH-2 – Tecnal e refratômetro Atago, modelo HSR – 500, sendo as medições feitas em duplicata.

4.2.2. Enumeração de bolores termoresistentes:

A enumeração de bolores termoresistentes no suco pasteurizado simples (pronto para beber obtidos na indústria), nos sucos concentrados e no suco simples processado na planta *Microthermics* da FEA-UNICAMP (item 4.2.11), foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Beuchat e Pitt (2001).

Para o suco simples (11°Brix) foram analisadas 50 amostras de 1L cada de suco pasteurizado pronto para beber de maçã, sendo 10 embalagens de 5 diferentes lotes de fabricação. Após a desinfecção e abertura das embalagens sob condições de assepsia, duas subamostras de 50 mL anteriormente homogeneizadas foram transferidas para tubos de ensaio de 25x200mm previamente esterilizados sendo então colocados em banho termostático (Polistat®, Poly Science, IL. USA, $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de precisão) para choque térmico à

80°C por 30 minutos, seguindo-se resfriamento rápido até a temperatura ambiente. Posteriormente, duas porções de 50 mL de MEA (*Malt Extract Agar*) formulado (g/L: ágar, 20; extrato de malte, 20; glicose, 20 e peptona de caseína, 1,0) em concentração 1,5 foram homogeneizadas ao suco, seguindo-se plaqueamento em 8 placas de Petri. As placas de Petri foram colocadas em sacos plásticos para prevenir ressecamento e incubadas à 30°C por até 30 dias, sendo observadas semanalmente quanto ao crescimento dos bolores termoresistentes. O isolado foi mantido em MEA, sendo a identificação realizada de acordo com as chaves de propostas por Pitt e Hocking (1999) e Klich (2002). Posteriormente, este isolado foi submetido a testes para verificação da capacidade de sobrevivência a diferentes binômios de temperatura/tempo (80°C/30 min, 85°C/15 min, 90°C/10 min, 95°C/5 min e 98°C/3 min) e faixa de temperatura para multiplicação. O teste de determinação da capacidade de sobrevivência a diferentes binômios de aquecimento foi realizado conforme o item 4.2.9. A temperatura ótima de multiplicação e a faixa de multiplicação foram determinadas através da inoculação com agulha de platina em um ponto central de placas contendo ágar suco de maçã, preparado conforme Marin *et al.* (2006b), seguindo-se incubação por 10 dias à 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C e medição do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro. Considerou-se a temperatura ótima para multiplicação, aquela na qual o diâmetro das colônias foi maior.

As amostras de suco concentrado congelado de maçã, após descongelamento em câmara frigorífica à 7°C±1°C e coleta sob condições assépticas foram analisadas conforme procedimento descrito para o suco pronto

para beber, sendo apenas diluídas na proporção 1:2 com água destilada estéril e homogeneizadas antes da aplicação do choque térmico nas amostras, conforme recomendado por Beuchat e Pitt (2001).

4.2.3. Determinação da patulina nos sucos prontos para beber e nos sucos concentrados:

Uma amostra de cada lote de um total de 5 lotes de suco de maçã provenientes de uma indústria processadora de sucos localizada no sudeste do Brasil foi analisada quanto à presença de patulina. A quantificação de patulina nestes lotes foi realizada apenas a título de informação dos sucos recebidos, não sendo objetivo avaliar a ocorrência e incidência desta micotoxina nos lotes recebidos, já que a representatividade neste caso, pode ser considerada muito pequena. Também se buscou determinar os níveis de patulina nos sucos concentrados de maneira a se evitar que níveis da micotoxina já presentes nestes sucos interferissem nos resultados dos ensaios posteriores de determinação da capacidade de produção da patulina, efeito da pasteurização e determinação da probabilidade de crescimento e efeito da carga de esporos e temperatura de estocagem na produção de patulina em suco de maçã.

Todas estas amostras de sucos de maçã foram enviadas sob congelamento para o laboratório de Micotoxinas e Micologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro para determinação da concentração de patulina. O método utilizado para determinação da concentração de patulina foi o preconizado pela AOAC 995.10 (TRUCKSESS, 2000), com limite de detecção de 20µg/L. O

processo de extração foi realizado nas amostras (5mL) com dois volumes iguais de 10mL de acetato de etila Tedia, grau HPLC (Tedia, Fairfield, USA). Em seguida realizou-se uma limpeza através da adição de extrato orgânico de 2mL de solução de carbonato de sódio 1,5% (Quimex, Porto Alegre, BR); realizado este procedimento adicionou-se ainda 5mL de acetato de etila a fim de se extrair qualquer traço de patulina ainda presente. A fase orgânica foi desidratada com o uso de 1g de sulfato de sódio anidro (Quimex, Porto Alegre, BR) e posteriormente seca por evaporação sob fluxo de nitrogênio ultra-puro (White Martins, Rio de Janeiro, BR). O conjunto cromatográfico utilizado consistiu de bomba W600 (Waters, Milford, USA) em fluxo isocrático de 0,8mL/min composto por acetonitrila:água (5:95); injetor automático W700+ (Waters, Milford, USA); coluna cromatográfica Symmetry 4,6×250mm (Waters, Milford, USA), protegida por uma coluna guarda Xterra 5×20mm (Waters, Milford, USA) e detector de ultra-violeta W2487 (Waters, Milford, USA) ajustado a 276nm. As amostras secas foram ressuspensas em 500µL de solução de água ultra-pura acidificada (pH 3) em ácido acético Tedia, grau HPLC (Tedia, Fairfield, USA) e transferidas quantitativamente para frascos de injetor automático. Desta, injetou-se uma alíquota de 20µL e os cromatogramas analisados por padronização externa, através de uma curva de calibração. Os resultados obtidos foram processados com auxílio do software Millennium (Waters, Milford, USA) que acompanha o cromatógrafo. A solução padrão de patulina foi preparada a partir de patulina na forma cristalizada (Sigma, Sigma, Saint Louis, USA) conforme descrito na

metodologia AOAC 974.18 (TRUCKSESS, 2000). A taxa de recuperação do método foi de 90%.

4.2.4 Preparo das suspensões de ascósporos de *B.fulva* e *B.nivea*:

Para cada uma das cepas de *B.fulva* (IOC 4518) e *B.nivea* (ATCC 24008 e FRR 4421) utilizadas no presente estudo, foram preparadas suspensões de ascósporos, por serem estas as formas mais termoresistentes produzidas por estes fungos. Cada cepa foi repicada para dez placas de Petri contendo o Agar Extrato de Malte (MEA) e incubadas à 30°C por 7 dias (pré-esporulação). Após este período de incubação, o crescimento foi recolhido com o auxílio de 2 mL de água destilada por placa e alça de Drigalsky estéreis. Desta suspensão, 0,5 mL, foi inoculado em dez garrafas de Roux contendo 200 mL de MEA, espalhando-se este conteúdo com o auxílio de baqueta de vidro de ponta esférica, estéril, sendo o excesso escorrido posteriormente. As garrafas foram incubadas na posição horizontal à 30°C por 30 dias, com observações semanais quanto à formação de ascósporos, através de coloração com lacto-fucsina 0,1% (PITT e HOCKING, 1999) e microscópio óptico Carl Zeiss Axiostar (aumento de 400 vezes). Após os 30 dias de incubação (quando mais do que 90% da lâmina estava tomada por ascósporos ou ascos com parede rígida) foi realizada a lavagem de cada uma das garrafas. Para raspagem do crescimento, usou-se 20 mL de água destilada estéril por garrafa de Roux e baqueta de vidro de ponta esférica, estéreis. A suspensão obtida foi filtrada através de 3 camadas de gaze estéreis, sendo coletada em frascos também estéreis, homogeneizada e submetida ao processo de

centrifugação a 11962,6xg à 4°C por 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e observações microscópicas com coloração com lacto-fucsina 0,1% foram feitas para se verificar a necessidade de nova centrifugação devido à presença de hifas. O processo de centrifugação foi repetido por no máximo mais duas vezes, evitando-se assim danos à parede dos esporos, o que culminaria com a perda da resistência térmica do fungo. Após este procedimento, a sonicação das suspensões foi realizada em temperatura entre 0-4°C, por até 4 minutos (SPLITTSTOESSER e SPLITTSTOESSER, 1977). As suspensões finais foram transferidas para garrafas de vidro estéreis com capacidade de 250 mL contendo 30 pérolas de vidro, ambos previamente estéreis. As suspensões foram mantidas em geladeira a 2-3°C até o uso. A suspensão de cada uma das cepas preparadas foi suficiente para realização dos ensaios de determinação do tempo e temperatura ótimos de ativação, determinação da capacidade de produção da patulina, determinação da cepa mais termoresistente.

Para os ensaios finais (determinação da resistência térmica em tubos TDT, determinação do efeito da pasteurização em sistema contínuo e determinação da probabilidade de produção de patulina), uma nova suspensão foi preparada a partir da inoculação de 70 garrafas de Roux, para a cepa mais termoresistente produtora de patulina (*B.fulva* IOC 4518).

4.2.5. Padronização e contagem das suspensões de ascósporos dos *B.fulva* e *B.nivea*:

Cada suspensão produzida teve sua concentração ajustada após contagem com o auxílio de câmara de Neubauer e coloração de lacto-fucsina 0,1%, sendo diluídas até se obter uma contagem de 10^7 esporos/mL. Isto se fez necessário para que todas as cepas estivessem sob as mesmas condições (número de esporos/mL) para o ensaio de determinação da cepa de *Byssochlamys spp* mais termoresistente. Como na contagem em câmara de Neubauer, não se pode distinguir entre os ascósporos que são viáveis e os que não são, a confirmação da quantidade de ascósporos viáveis foi feita através da aplicação do melhor binômio de ativação dos esporos (determinação da temperatura e tempo ótimos de ativação - item 4.2.6).

4.2.6. Determinação da temperatura e tempo ótimos de ativação dos ascósporos de *B.fulva* e *B.nivea*:

Para os choques térmicos, foram utilizadas as temperaturas de 75°C e 80°C (TOURNAS, 1994) e tempos variando de 5 em 5 minutos, de 0 à 30 minutos. Para cada tempo e temperatura, 0,4 mL da suspensão de cada fungo (diluída à 10^{-6} esporos/mL, ajustados em câmara de Neubauer) foram adicionados em tubos de ensaio de 13x100mm em duplicata preenchidos com 3,6 mL de suco de maçã clarificado 11°Brix previamente esterilizado conforme item 4.1.1. A seguir, os tubos foram expostos aos binômios, tempo e temperatura considerando-se o tempo de atraso térmico, seguindo-se resfriamento por um minuto em banho de gelo até a

temperatura ambiente e plaqueamento em profundidade em MEA com incubação à 30°C por 5-7 dias e contagem posterior. Considerou-se o binômio adequado para cada fungo aquele no qual se observou um aumento da população do fungo diferenciado das demais contagens (pico).

O tempo de atraso térmico foi medido em tubos de ensaio de 13x100mm preenchidos com 3,6 mL de suco de maçã e 0,4 mL de água destilada, simulando o mesmo volume presente nos tubos contendo as suspensões. Para as medidas dos tempos de atraso térmico, foram usados termopares flexíveis Ômega tipo T, AWG 36, TT-T-36, com dimensões de 0,017"x 0,028", inseridos na parte do tubo correspondente à 1/3 do seu volume total e acoplados à uma unidade aquisitora de dados de temperatura portátil Ômega, modelo CL526 (Connecticut, USA). O tempo de atraso correspondeu ao intervalo de duração do aquecimento até o termopar inserido atingir a temperatura programada e foi acrescido a cada tempo de ativação quando da aplicação dos choques térmicos.

4.2.7. Avaliação da capacidade de produção de patulina pelas cepas de B.fulva e B.nivea:

Para cada fungo estudado, foram preparadas três garrafas PET de 500 mL, preenchidas com 400 mL de cada suco de maçã (pH = 3,6 e 11° Brix) (clarificado e não clarificado) previamente pasteurizados a 105°C/10 minutos, objetivando-se verificar a influência do suco na produção de patulina.

As garrafas contendo o suco foram individualmente inoculadas em câmara de fluxo laminar com a suspensão de esporos ativados (conforme o melhor binômio determinado no item 4.2.6), adicionando-se o volume necessário (0,2 mL) para atingir-se uma concentração de 10^3 esporos/mL de suco (RICE, BEUCHAT & WORTHINGTON, 1977).

As embalagens inoculadas foram incubadas a 21°C e 30°C por 14 dias. A escolha destes valores de temperatura é justificada pelo fato do produto ser comercializado à temperatura ambiente e por elas representarem uma aproximação das condições médias de temperatura durante o ano das regiões sul e sudeste do Brasil (21°C) e norte e nordeste (30°C), segundo dados do CPTEC-INPE (www.cpte.inpe.br). Desta forma, buscou-se ter um panorama do comportamento dos fungos neste produto em diferentes regiões do país e nas condições de estocagem/comercialização normalmente praticadas, evitando-se aproximações para condições não estudadas.

O conteúdo de duas embalagens foi filtrado após os períodos de incubação com o auxílio de três camadas de gaze para retirada dos micélios. A determinação do peso seco foi feita por secagem do micélio em estufa à 55°C/36 hs (até peso constante) para quantificação da biomassa fúngica. O conteúdo destas embalagens foi analisado para se verificar a presença e quantificar a patulina (conforme metodologia indicada no item 4.2.8), sendo as amostras mantidas congeladas até o momento da análise. A partir da terceira embalagem, determinou-se a variação do pH e do teor de sólidos solúveis durante o período de incubação (0, 5, 10 e 14 dias).

Paralelamente seis embalagens cartonadas de suco comercial não clarificado de maçã de 200 mL (o tipo mais comumente comercializado no Brasil e fabricado no ano de 2006) também foram utilizadas para avaliação da capacidade de produção da patulina por cada fungo, nas condições encontradas no interior destas embalagens. Para inoculação, foram utilizadas seringas estéreis de 1 mL, sendo a área inferior à aba superior previamente higienizada com álcool 70%, seguindo-se a perfuração, inoculação (0,2 mL para se ter 10^3 esporos/mL) e fechamento com peletes de polietileno de baixa densidade (PEBD) derretidos na chama do bico de Bunsen. Logo após, o conteúdo interno foi homogeneizado e as embalagens foram incubadas nas mesmas condições de temperatura utilizadas para as garrafas PET (21°C e 30°C/14 dias).

As embalagens PET e cartonadas utilizadas no presente estudo tiveram sua taxa de permeabilidade ao oxigênio determinada para se verificar sua influência sobre a multiplicação e produção de patulina pelas cepas de *Byssochlamys* spp. A taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO₂) (cc/embalagem.dia.atm.) foi determinada pelo método coulométrico em aparelho de transmissão de oxigênio, do tipo OX-TRAN 2/20 (Mocon/Modern Controls, INC) com acessório para fixação da embalagem no aparelho e sensor coulométrico sensível ao oxigênio, operando com eficiência constante para monitorar a quantidade de oxigênio que permeava a embalagem.

Como todas as cepas mostraram capacidade de produção da patulina nos sucos de maçã e condições de incubação (temperatura e tipo de embalagem)

estudados, elas foram posteriormente submetidas ao teste de determinação daquela mais termoresistente, conforme item 4.2.9.

4.2.8. Determinação de patulina nos sucos de maçã:

As amostras de sucos clarificados e não clarificados de maçã correspondentes aos ensaios de determinação da capacidade de produção da patulina (itens 4.2.7 e 4.2.12) foram enviadas sob congelamento para o laboratório de análises micotoxicológicas (LAMIC), na Universidade Federal de Santa Maria - RS para determinação da concentração de patulina. A escolha deste laboratório foi baseada no limite de detecção e quantificação da metodologia implementada (respectivamente 0,5 µg/L e 2,0 µg/L), que foram considerados relevantes em virtude da tendência mundial de redução dos limites aceitáveis de patulina nos derivados de maçãs e para que se pudesse acompanhar a produção desta micotoxina durante a estocagem do suco (item 4.2.12). O método utilizado para determinação da concentração de patulina foi o desenvolvido por Mallmann *et al* (2006), sendo a análise realizada em triplicata.

A patulina foi extraída das amostras (5 mL) com acetato de metila (Merck, Darmsdat, GE) 20 mL, colocados em banho de ultrassom modelo Ultrasonic Cleaner 1440D (Odontobrás, Ribeirão Preto, BR) por 15 minutos. Posteriormente, recolheu-se a camada superior e evaporou-se a 40 – 45°C, sendo o frasco não mantido mais que 10 minutos em aquecimento, após evaporação completa do líquido. O conteúdo do frasco foi ressuspenso com 0,5 mL de solução acetonitrila (Tedia, Fairfield, USA)/água/ácido acético (Merck, Darmsdat, GE)

(840:160:5, v/v/v) para a análise cromatográfica. A fase orgânica foi evaporada sob nitrogênio. A fase móvel empregada foi água-ácido acético 1%: Acetonitrila (99:1, v/v) a uma vazão de 0,3 mL/min. Utilizou-se uma coluna Synergi 4 μ m Fusion-RP80 (250 x 2 mm), (Phenomenex, Torrance, USA), detector de UV de 276 nm (Agilent, Santa Clara, USA), bomba de cromatografia líquida (Agilent, Santa Clara, USA) e um integrador (Agilent, Santa Clara, USA). Um volume de 2 μ L foi injetado com uma seringa (Agilent, Santa Clara, USA) no cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, Santa Clara, USA). A solução padrão de patulina foi preparada a partir de patulina na forma cristalizada (Sigma, Saint Louis, USA) conforme descrito na metodologia da AOAC (TRUCKSESS, 2000). Amostras de suco de maçã com concentração zero de patulina foram inoculadas com diferentes níveis de patulina: 20.7, 31, 51.8, 51.8, 103.6 e 207.2 μ g/L, para determinação da recuperação do procedimento de extração, que foi igual a 87%.

4.2.8.1 Confirmação do pico cromatográfico da patulina:

Como existem controvérsias sobre a capacidade de produção de patulina por cepas de *B. fulva* (RICE, BEUCHAT e WORTHINGTON, 1977; RICE, 1980; DOMBRINK e ENGBERG, 2006; HOUBRAKEN, SAMSON e FRISVAD, 2006; PUEL et al. 2007), houve a necessidade de confirmação do pico cromatográfico da patulina, anteriormente determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (*item 4.2.8*) para a cepa *B. fulva* IOC 4518, utilizada no presente estudo.

As amostras enviadas sob congelamento ao laboratório de análises micotoxicológicas (LAMIC da Universidade Federal de Santa Maria - RS foram

também utilizadas para a confirmação do pico cromatográfico da patulina. Após a determinação da patulina por cromatografia líquida de alta eficiência (conforme item 4.2.8) utilizou-se a análise espectral 3D através do programa HP com software ChemStation®, o qual realiza a varredura de arranjo de diodos (DAD). Com o detector por DAD utilizaram-se os comprimentos de onda de 270 nm, 276 nm e 280 nm para confirmação. Além disso, o pico foi confirmado por UV em outro comprimento de onda (280 nm). As condições cromatográficas neste caso, são as mesmas descritas no *item 4.2.8*.

A análise de pureza da amostra suspeita foi feita pela comparação do analito com um padrão de patulina através da biblioteca espectral. O cromatograma obtido foi comparado pela sobreposição de espectros de um padrão de patulina e da amostra suspeita. Também, usando o sistema cromatográfico, pôde-se fazer a confirmação através do “scan” da isoabsorbância, comparando-se o espectro dos tempos de retenção do analito com o da solução padrão de patulina.

4.2.9. Determinação da cepa de *B.fulva* e *B.nivea* mais termoresistente:

A seleção da cepa de *Byssochlamys* mais termoresistente foi feita através da utilização de tubos TDT (*thermal death tubes*) (8mm de comprimento, 6mm de diâmetro interno e 0,2mm de largura da parede) contendo 1,8 mL de suco de maçã pasteurizado à 105°C/10 minutos em autoclave (meio de aquecimento) (conforme item 4.1.1), sendo que cada tubo foi inoculado com 0,2 mL de suspensão de esporos ajustada para 10⁶ esporos/mL. Os tubos foram

posteriormente homogeneizados e utilizando-se um banho termostático (Polystat®, com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$), aplicaram-se os choques térmicos de acordo com binômios pré-estabelecidos (80°C - 110°C) (*Tabela 6*). Ao tempo programado foi adicionado o tempo de atraso térmico do tubo. Após o choque térmico, os tubos foram resfriados imediatamente, até temperatura ambiente e o conteúdo de cada tubo foi transferido para placas de Petri estéreis. Após, agar extrato de malte formulado foi semeado assepticamente em profundidade, seguindo-se homogeneização e incubação das placas à 30°C por até 10 dias. O crescimento do fungo neste período foi um indicativo de sua capacidade de sobreviver ao binômio tempo/temperatura aplicado. A cepa confirmada como mais termoresistente foi usada como inóculo para os ensaios posteriores de determinação da resistência térmica em tubos TDT e para os ensaios na unidade UHT (itens 4.11, 4.12).

O tempo de atraso foi determinado após preenchimento dos tubos com a quantidade de amostra (1,8 mL de suco e 0,2 mL de água destilada) e acoplamento de um termopar flexível (tipo T) de cobre/constantan que foi mantido na posição 1/3 do volume ocupado pela amostra. O termopar foi ligado a um registrador de temperatura (Ômega, modelo CL526 (Connecticut, USA)). Os tubos assim montados foram colocados num banho termostático ajustado à temperatura de tratamento e um cronômetro foi acionado ao mesmo tempo. Quando a temperatura atingiu a temperatura alvo, o tempo marcado pelo cronômetro foi registrado (tempo de subida ou lag) e este valor foi acrescido ao tempo de choque térmico aplicado aos tubos TDT posteriormente.

Tabela 6: Valores de temperatura (°C) e tempo (minutos) aplicados para determinação da cepa mais termoresistente.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
80°C	20
85°C	15
90°C	5
90°C	10
95°C	5
95°C	10
100°C	5
105°C	5
110°C	3

4.2.10. Determinação da resistência térmica em tubos TDT da cepa de *Byssochlamys spp* produtora de patulina mais termoresistente:

A resistência térmica do isolado mais termoresistente produtor de patulina foi determinada utilizando-se tubos TDT estéreis preenchidos com 1,0 mL de suco clarificado de maçã (pasteurizado à 105°C por 10 minutos) à 11°Brix e inoculados com 1,0 mL da suspensão de ascósporos com sua concentração ajustada em 10^7 esporos/mL. Este procedimento permitiu que se partisse de uma contagem inicial

de 10^7 esporos/mL e desta forma, mais pontos e dados pudessem ser coletados, já que o comportamento de inativação esperado, poderia ser de cinética não linear. Após a homogeneização, os tubos foram selados com auxílio de maçarico e colocados em banho termostático (Polystat®, Poly Science, IL, USA, com $\pm 0,1^\circ\text{C}$ de precisão), previamente ajustado às temperaturas de 85°C , 90°C , 92°C e 95°C . A escolha destes valores é justificada pelo fato de representarem a faixa de temperatura de pasteurização de sucos de frutas (entre 85°C e 98°C). O tempo de atraso térmico foi determinado previamente, conforme item 4.2.9, sendo adicionados 1,0 mL de suco clarificado de maçã e 1,0 mL de água destilada nos tubos TDT's.

Após cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram rapidamente retirados do banho termostático e resfriados imediatamente em banho de gelo, até a temperatura ambiente. Então, os tubos TDT foram assepticamente abertos, e em seguida, diluições decimais sucessivas foram preparadas, sendo inoculadas em profundidade no meio MEA formulado estéril. As placas em duplicata foram incubadas sem inverter à 30°C por até 10 dias, sendo as contagens realizadas entre o terceiro e o décimo dia de incubação e expressas como número de esporos/mL. O período para contagem foi utilizado, pois garantia que os sobreviventes fossem contados sem haver interferente pelo espalhamento das colônias. Apesar das placas nas quais o crescimento não foi observado terem sido mantidas incubadas por até 30 dias para garantir a contagem de esporos injuriados, o período máximo da faixa de contagem igual a 10 dias foi selecionado,

pois representou o tempo a partir do qual observou-se estabilidade nas contagens (não houve aumento da contagem de sobreviventes).

Através do número de sobreviventes e dos respectivos tempos de aquecimento, foram construídas as curvas de sobreviventes regressando os dados do logaritmo da população contra o tempo. Como o comportamento cinético de inativação observado foi não-logarítmico, utilizou-se o método de linearização de Alderton e Snell (1970).

A fórmula empírica proposta por Alderton & Snell (1970) é mostrada na *Equação 2*.

$$(\log N_0 - \log N_t)^a = kt + C \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

“ N_0 ” é a concentração inicial de ascósporos ativada por mL;

“ N_t ” é a concentração de ascósporos sobreviventes por mL de suco aquecido por um dado tempo;

“ a ” é o expoente para linearização obtido pelo inverso da inclinação de $\log(\log N_0 - \log N_t)$ contra $\log t$;

“ C ” é o intercepto;

“ k ” é constante de velocidade de reação;

“ t ” é o tempo de aquecimento em minutos.

O valor de “a” obtido na menor temperatura (85°C) foi utilizado para linearizar as curvas dos tratamentos mais severos (90°C, 92°C e 95°C). Considerando-se que a taxa de destruição segue exatamente esta expressão e que não haja erros experimentais, o valor de C deveria ser zero. O valor 1/k é derivado da equação 3:

$$\frac{1}{k} = \frac{t}{(\log N_0 - \log N_l)^a} \quad (\text{Equação 3}).$$

Assumindo C=0, o valor de 1/k é igual a equação 4 para o caso de comportamento linear:

$$D^* = \frac{t}{(\log N_0 - \log N_l)} \quad (\text{Equação 4}).$$

O valor 1/k (D*) é definido como a taxa de destruição não logarítmica e corresponde a D em cinéticas de destruição logarítmicas. O valor de $-(\log k)$, representado contra a temperatura pode fornecer um parâmetro comparável a Z, chamado Z* (coeficiente térmico do microrganismo), calculado pelo negativo do inverso da inclinação desta curva.

Posteriormente, calculou-se o valor F de pasteurização (tempo de processo em minutos, equivalente à temperatura de referência) para o suco clarificado de maçã, de maneira a se verificar se o processo aplicado industrialmente era suficiente para destruir ascósporos de *Byssochlamys* spp. O valor F de pasteurização foi calculado a partir da equação 5:

$$F = \gamma \cdot D^*$$

(Equação 5).

onde γ é o número de reduções decimais e D^* é equivalente à $1/k$. Como os processos comerciais mais comumente aplicados correspondem a 95°C/20s e 95°C/30s, utilizou-se o valor de D^* obtido para esta temperatura para o cálculo de F . Como atualmente, algumas indústrias têm aplicado também o processo de 105°C/30s, obteve-se o valor referente a D^* para 105°C, usando-se o valor de Z^* . O cálculo do valor F considerou 10 ascósporos de *B.fulva* para cada embalagem de suco de maçã de 1 L (1 ascósporo/100 mL de suco), de acordo com a carga de contaminação encontrada comercialmente (HOCKING e PITT, 1984; MASSAGUER, 2003) e a taxa de defeitos foi fixada em 1 embalagem contaminada para cada 10^4 fabricadas (4 reduções decimais), o que corresponde a probabilidade de unidades não estéreis (PUNE) de 10^{-4} .

4.2.11. Determinação do efeito da pasteurização em sistema contínuo sobre os ascósporos de *Byssochlamys spp* produtor de patulina mais termoresistente:

Cada 20 L de suco de maçã clarificado 11°Brix e pH 3,7 no qual se determinou a ausência de bolores termoresistentes (*item 4.2.2*) foram inoculados com 10 mL da suspensão do fungo produtor de patulina mais termoresistente contendo $1,07 \times 10^7$ esporos/mL, de maneira a se ter uma carga inicial (N_0 de 10^3 - 10^4 esporos/mL de suco) e foi pasteurizado na planta piloto de esterilização contínua *Microthermics* existente na FEA-UNICAMP. Para o preparo do suco,

utilizaram-se recipientes e água destilada previamente esterilizados em autoclave (121°C/30min).

Um processo equivalente ao aplicado por uma indústria brasileira processadora de suco de maçã (**A**) foi utilizado e correspondeu a 94,26°C/53,07 segundos na planta piloto *Microthermics* da FEA. Outros dois processos (**B** e **C**) foram também adotados de maneira a se verificar a influência da flutuação de temperatura sobre a letalidade do processo e número de reduções decimais obtidas. O tempo de retenção dos três processos foi de 30s. As temperaturas de entrada (alimentação) do suco e de envase foram de 24°C±1°C, havendo diferenças entre os processos com relação à temperatura das seções de aquecimento e retenção. As condições de temperatura adotadas nas seções de aquecimento e retenção na unidade *Microthermics* são descritas na *Tabela 7*.

Tabela 7: Processos de pasteurização do suco de maçã aplicados.

Processos	Seções	Temperatura (°C)
A	Aquecimento	95
	Retenção	93
B	Aquecimento	96
	Retenção	94
C	Aquecimento	94
	Retenção	92

Utilizou-se a unidade *Microthermics* UHT/HTST Lab-25-DH (*Figura 10-A*), equipada com um trocador de calor de aquecimento tipo tubular em espiral. O sistema de aquecimento do trocador de calor é o do tipo indireto, sendo alimentado com água previamente aquecida pelo vapor proveniente da caldeira. O tubo de retenção flexível utilizado possuía diâmetro de ¼". Após a retenção, o produto seguiu para o trocador de calor de resfriamento e posteriormente foi envasado na unidade de enchimento asséptico (SPO) em câmara de fluxo laminar classe 100 *Microthermics* (*Figura 10-B*). O volume de suco envasado por garrafa foi de 400 mL para o experimento correspondente ao item 4.2.11 e a 150 mL para o experimento correspondente ao item 4.2.12, sendo o enchimento desta unidade programável, automático e intermitente.



A



B

Figura 10: Unidade *Microthermics* UHT/HTST Lab-25-DH (A) e câmara de fluxo laminar classe 100 *Microthermics* (B).

Para o monitoramento da temperatura, termopares calibrados foram instalados na saída de cada seção (aquecimento, retenção, saída do resfriamento

e antes do enchimento). Além disso, dois sensores foram instalados para o controle da pressão, o primeiro na entrada do pré-aquecedor e o segundo na saída do resfriador.

Antes de cada processo, a unidade foi esterilizada pela manutenção da temperatura de 121°C por no mínimo 15 minutos no ponto mais frio do equipamento (após o sistema de enchimento-*Sterile product outlet*), de maneira a garantir esterilidade de todo o sistema após este procedimento. Depois de cada processamento, o equipamento foi submetido a higienização através do sistema CIP (*clean-in-place*). Este procedimento consistiu das seguintes etapas, produtos e condições de tempo e temperatura, para cada linha de enchimento:

- Enxágüe da unidade com água potável à temperatura do processo e vazão de 2 L/min, por 10 minutos;
- Limpeza com solução alcalina MIP 2% v/v (Ecolab[®]) (detergente alcalino) à 50°C, por 10 minutos;
- Enxágüe com água potável por 10 minutos à 50°C;
- Limpeza com solução ácida Elsolve 1,3% p/v (Ecolab[®]) (detergente ácido) à 40°C (procedimento realizado uma vez a cada mês);
- Enxágüe com água potável por 10 minutos à 40°C;
- Sanificação com solução Divosan Forte (ácido peracético e peróxido de hidrogênio) (Johnson Diversey[®]), 1,5% v/v (sanificante) à 35°C por 10 minutos;
- Enxágüe final do sistema por 10 minutos com água potável à temperatura ambiente.

Para verificação da eficiência do CIP, após este procedimento, circulou-se 12 litros de água estéril na unidade *Microthermics*, seguindo-se coleta sob condições assépticas de 2 litros da última água de enxágüe e contagem de bolores termoresistentes por filtração em membranas e inoculação em MEA, após choque térmico de 80°C/30 min segundo Hocking e Pitt (2001).

Os três experimentos realizados nesta etapa da pesquisa tiveram como objetivo simular as condições industriais e todo histórico de temperatura pelo qual o suco é submetido para se avaliar o número de reduções causadas pelo processo térmico sobre o microrganismo. A carga de esporos presente no suco antes da pasteurização (N_0) e a contagem final (N_F) foram confirmadas após aplicação de choque na temperatura ótima de ativação do fungo (conforme item 4.2.6). A contagem foi realizada por plaqueamento em profundidade em MEA, a partir da análise de 20 garrafas, seguindo-se incubação à 30°C por até 30 dias e observação das características macroscópicas e microscópicas das colônias segundo Pitt e Hocking (1999). Pela diferença entre N_0 e N_F , determinou-se o número de reduções decimais de cada processo (γ). Paralelamente, 16 L de suco foram envasados em garrafas de 150 mL (para cada um dos experimentos) sob condições assépticas na cabine de fluxo laminar classe 100 da unidade de enchimento e, posteriormente, as garrafas foram incubadas a 30°C/30 dias. Este procedimento teve como objetivo observar a multiplicação de esporos de fungos sobreviventes ao processo térmico diretamente no suco, determinando-se a taxa de defeitos relacionada a cada processo. A partir de 10% das garrafas pertencentes ao processo A (equivalente ao industrial) que apresentaram

crescimento fúngico (sobreviventes) após 12 dias de incubação à 30° (período de máxima produção de patulina), analisou-se a quantidade de patulina (conforme item 4.2.8).

Os dados de temperatura dos processos foram obtidos através de um multi-registrador de temperatura Fluke Hydra Series II, modelo 2625A (Fluke, Everett, USA), conectado a termopares tipo T Ômega (Omega Inc., Stamford, USA) localizados no final de cada uma das seções utilizadas (aquecedor, tubo de retenção, resfriador e envase). O registro de temperatura ocorreu a cada 10s de intervalo.

Conhecendo-se a vazão do processo (1,05 L/min) e dimensões (comprimento e raio interno) (*Tabela 8*) de cada seção e das conexões do sistema, determinou-se o tempo de residência em cada seção, a partir do cálculo da velocidade média e da distância entre os termopares.

Tabela 8: Dimensões de cada seção e das conexões da unidade UHT/HTST Microthermics utilizada para realização dos experimentos.

Seção	Seções e conexões	Comprimento (m)	Diâmetro (m)	Área interna (m²)
Pré-aquecedor	Pré-aquecedor	11,5824	0,007	0,00003848
	Conexão	1,935	0,0072	0,00004072
	Conexão	1,66	0,0072	0,00004072
Retenção	EH2	5,0498	0,0104	0,00008495
	Conexão	1,031	0,0072	0,00004072
	Conexão	1,198	0,0072	0,00004072
Resfriador	Cooler 1	11,5824	0,007	0,00003848
	Conexão	2,61	0,0072	0,00004072

Considerando-se que o fluido em questão (suco de maçã 11°Brix) aquecia-se e resfriava-se de maneira isotérmica e tendo-se as temperaturas do meio de aquecimento/resfriamento (vapor ou água quente/fria) em cada etapa, utilizou-se a relação de Deindoerfer e Humphrey (1959) para cálculo de temperatura em trocadores de calor espirais. Esta relação é apresentada na *equação 6*.

$$T_t = T_{(H,C)} \left[1 + \frac{T_0 - T_{(H,C)}}{T_{(H,C)}} e^{-\left(\frac{U_t \cdot A}{\bar{w}_p \cdot c_p}\right) \cdot t} \right]$$

(Equação 6)

Onde,

U_t = coeficiente global de transferência de calor;

A = área de troca térmica;

\bar{w}_p = relacionado à vazão mássica;

C_p = calor específico do produto;

$T_{H,C}$ = temperatura do meio de aquecimento ou resfriamento numa etapa específica;

T_0 = temperatura do produto na entrada da etapa em estudo;

T_t = temperatura do produto na saída da etapa em estudo (estimada através da *equação 6.2*).

Devido à complexidade de se obter uma solução para a *Equação 6*, e considerando que o coeficiente global de transferência de calor, assim como as propriedades físicas dos alimentos (calor específico, densidade, viscosidade, e coeficiente de condução de calor) são funções de temperatura, que por si só é

função do tempo, Swartzel (1982), fez uma transformação desta equação aplicando o logaritmo natural em ambos os lados, transformando-a em uma reta (*Equação 6.1*):

$$\ln(T_t) = \ln(T_{H,C} - T_0) - \frac{U_t \cdot A}{\omega_p \cdot C_p} \cdot t \quad (\text{Equação 6.1})$$

A partir da *Equação 6*, através de regressão linear, encontrou-se o valor

$\left(\frac{U_t \cdot A}{\omega_p \cdot C_p} \right)$ como coeficiente angular desta regressão, denominando-o de J, em

função das condições operacionais do processo, isto é, das temperaturas iniciais de cada seção, e das temperaturas dos meios de aquecimento ou resfriamento, as quais são consideradas constantes em cada seção. Assim, Swartzel (1986) contornou a falta de dados de características térmicas já que estas variam com a temperatura para produtos alimentícios e existem poucos dados na faixa de temperatura de esterilização, porém desta maneira, assume-se que a variação do coeficiente global de transferência de calor (U_t) seria diretamente proporcional à do calor específico (c_p), pois o valor J é constante em cada seção do processo térmico.

Rearranjando a *Equação 6*, de maneira a isolar-se $T_{s(t)}$, temperatura em função do tempo, tem-se:

$$T_s(t) = T_{H,C} + (T_0 - T_{H,C}) \cdot e^{-J \cdot t} \quad (\text{Equação 6.2})$$

A partir desta equação, pôde-se encontrar a temperatura do produto a qualquer tempo, dentro da etapa em estudo, desde que se conheça o comprimento de cada seção e os valores inicial e final de temperatura nestas etapas. Este tempo foi então dividido em 20 intervalos iguais, a partir dos quais foram construídos os gráficos de história térmica dos processos. De posse da história térmica, calculou-se a letalidade do processo (equação 7) para *B.fulva* (IOC 4518) em cada intervalo de tempo e após integração da curva, obteve-se a letalidade do processo (L, min à 95°C).

$$L = 10^{\frac{T - T_{ref}}{Z}}$$

(Equação 7)

Onde,

T= temperatura do processo;

T_{ref}= temperatura de referência;

Z= variação de temperatura (°C) necessária para redução de 1 ciclo logarítmico no valor de D.

Os valores de letalidade de cada etapa dos processos A, B e C e a letalidade global foram calculados considerando-se 95°C como temperatura de referência (T_{ref}) e um valor Z* de 7,4°C (determinado conforme item 4.2.11). Neste caso, a temperatura de 95°C foi considerada como referência, pelo fato de se ter

determinando experimentalmente o valor $1/k$ (D) em tubos TDT, o que evitaria extrapolações à temperatura de 98°C (considerada normalmente como de referência para pasteurização de sucos), temperatura na qual o comportamento cinético poderia ser muito diferente do obtido à 95°C. Os valores de F integrados obtidos na unidade UHT *Microthermics* foram comparados com os valores de F calculados a partir das curvas de resistência térmica (item 4.2.10).

4.2.12. Determinação da probabilidade de crescimento de *B.fulva* IOC 4518 e do efeito da carga de ascósporos e temperatura de estocagem na produção de patulina em suco clarificado de maçã:

Este ensaio verificou a probabilidade de crescimento de *B.fulva* IOC 4518, além da produção da patulina no suco clarificado de maçã em duas temperaturas diferentes de estocagem (21°C e 30°C). Para o preparo do suco, utilizaram-se recipientes e água destilada previamente esterilizados em autoclave (121°C/30min). O suco de maçã reconstituído (pH= 3,7 e 11° Brix) e pasteurizado conforme processo (item 4.1.11) foi inoculado para se ter uma contagem de 10^0 e 10^1 esporos/100 mL do fungo mais termoresistente produtor de patulina, respectivamente. Utilizou-se como material de embalagem 30 garrafas PET (higienizadas conforme item 4.1.3), para cada carga de esporos, preenchidas com 400 mL de suco. Após a inoculação, metade das embalagens contendo o suco de maçã foi estocada à 21°C e a outra metade a 30°C. Acompanhou-se diariamente, observando-se o aparecimento dos micélios fúngicos, até um período máximo de 90 dias (prazo de validade do suco de maçã). Três dias após observação do 1^0

sinal de crescimento, três garrafas foram coletadas. Posteriormente a cada três dias, mais três garrafas foram retiradas até que se completasse o número de garrafas inoculadas (15 para cada carga de esporos) ou se atingisse 90 dias de estocagem. O período de três dias após a detecção do fungo referiu-se ao tempo para que o fungo pudesse produzir a micotoxina a um nível detectável (limite de detecção do método= 0,5 µg/Kg), conforme fizeram Whiting e Call (1993) em seu estudo relacionado ao tempo para crescimento e produção de toxina por *C.botulinum*. O conteúdo das garrafas foi então filtrado para retirada do crescimento micelial, seguindo-se congelamento e quantificação do nível de patulina, conforme item 4.2.8. Pelo fato das últimas três garrafas de cada condição de temperatura *versus* carga de esporos avaliada, apresentarem sinais visíveis de deterioração (material micelial bastante difundido, além de estufamento), presumiu-se que o suco seria rejeitado pelo consumidor e não representaria risco à sua saúde, e desta forma, limitou-se em quatro o número de pontos de análise e medição da patulina.

Os dados da fração de garrafas apresentando crescimento (micélio visível) *versus* o tempo de incubação para o crescimento, foram usados para modelagem preditiva primária utilizando-se a abordagem adotada por Whiting e Call (1993), estabelecendo-se o tempo para crescimento de *B.fulva* IOC 4518, além do acompanhamento da produção de patulina durante a estocagem à 21°C e 30°C deste suco. Como o tempo (t) para $P_{(t)}=0,1$ é mais importante para fornecer uma estimativa de quando as primeiras garrafas que serão deterioradas (com conseqüente produção de patulina) e considerando-se os valores de $P_{máx}$, κ e

τ para cada condição e usando a *equação 8* rearrajanda, calculou-se o tempo para 10% das garrafas apresentarem deterioração ($P_{(t)=0,1}$).

A probabilidade de crescimento do fungo ($P_{(t)}$) foi calculada pelo número de embalagens mostrando crescimento (micélio visível) num determinado tempo para cada condição de temperatura, dividido pelo número total de embalagens do tratamento. A probabilidade $P_{(t)}$ em função do tempo de estocagem foi ajustada à *equação 8* usando-se o software *Statística versão 6.0* (Statsoft, Inc), sendo determinados os parâmetros $P_{m\acute{a}x}$, κ e τ .

$$P_{(t)} = \frac{P_{m\acute{a}x}}{1 + e^{\kappa(\tau - t)}}$$

(Equação 8)

Onde:

$P_{(t)}$ = probabilidade de crescimento do fungo em função do tempo;

t = tempo (dias);

$P_{m\acute{a}x}$ = máxima probabilidade de crescimento (até 90 dias);

κ = taxa de crescimento (garrafas apresentando crescimento x dia⁻¹);

τ = tempo para metade das replicatas que se tornarão deterioradas, mostrarem crescimento.

$P_{(t)}$ tem inicialmente um valor de 0,0 e pode aumentar até 1,0, se todas as embalagens apresentarem crescimento.

Além disso, para se avaliar a qualidade do modelo preditivo, calculou-se os fatores bias e exatidão, de acordo com as equações 9 e 10. O fator Bias atesta o quanto os valores preditos pelo modelo, encontram-se na região denominada segura ou região perigosa de predição. Dependendo da variável em estudo, um valor do fator Bias igual a 1, indica perfeita concordância entre os valores preditos e os observados. Valores maiores que 1 indicam que o modelo encontra-se na região perigosa da predição e menores que 1 indicam que se encontra na faixa segura. Já o fator exatidão indica a precisão dos valores preditos pelo modelo em relação aos valores observados. Para este fator, valores acima de 1 indicam a porcentagem de variação média entre os dados preditos e observados (ROSS, 1996).

$$bias = 10^{(\sum \log(predito / observado) / n)} \quad \text{Equação 9.}$$

$$exatidão = 10^{(\sum |\log(predito / observado)| / n)} \quad \text{Equação 10.}$$

Os dados de concentração de patulina em cada ponto de coleta foram associados ao modelo de avaliação de riscos da patulina e suco de maçã, conforme descrito no item 4.2.13.

Para comprovação da eficiência da pasteurização na unidade *Microthermics*, 5 garrafas contendo o suco de maçã pasteurizado foram mantidas nas mesmas condições de incubação das garrafas inoculadas com *B.fulva* IOC 4518 descritas acima durante os 90 dias de estocagem. Ao final deste período, nenhuma das 5 garrafas apresentou sinais de deterioração. Deve-se ressaltar que o suco

concentrado nos experimentos foi primeiramente avaliado quanto a patulina e contagem de bolores termoresistentes (*itens 4.2.2 e 4.2.3*).

4.2.13. Avaliação Quantitativa do Risco da Patulina em Suco de Maçã:

4.2.13.1. Descrição geral do modelo:

O modelo de avaliação quantitativa de riscos da patulina em suco de maçã (*Figura 11*) utilizou a modelagem de Monte Carlo e foi construído em uma planilha de Excel e foi simulado usando o software @Risk “para estudantes” (versão 4.5, Palisade, Ithaca, NY) e levou em conta as etapas compreendidas entre a recepção das frutas na planta processadora até a estocagem do suco pronto para beber (11°Brix), que foram modeladas em série e incluíram os eventos associados a micotoxina (aumento ou redução) e a possibilidade de sobrevivência à pasteurização de espécies de fungos termoresistentes (*Byssochlamys spp*), com capacidade de produzirem a patulina durante a estocagem do suco.

Dois principais cenários foram avaliados: (1) Diferentes níveis de patulina presentes na matéria-prima (conforme descrito no ítem *4.2.13.2 – Etapas do processo*), e o efeito das etapas de lavagem das frutas, seleção das frutas, filtração e pasteurização do suco sobre a micotoxina, além da inativação pela pasteurização dos fungos termoresistentes capazes de produzirem a patulina e (2) Diferentes níveis de patulina que são introduzidos pela matéria-prima (conforme mencionado acima) e o efeito das etapas de lavagem das frutas, seleção das frutas, filtração e pasteurização do suco sobre a micotoxina, além da sobrevivência à pasteurização de fungos termoresistentes capazes de produzirem

a patulina durante a estocagem do suco pronto para beber. Neste caso, foram estudados o impacto de duas diferentes cargas de esporos de bolores termoresistentes que poderiam sobreviver ao processo térmico (10^0 e 10^1 esporos/100mL de suco) e duas diferentes temperaturas de estocagem (21°C e 30°C) sobre os níveis de patulina no suco pronto para beber. O objetivo do modelo em cada um dos cenários estabelecidos, foi estimar a probabilidade da quantidade de patulina ultrapassar o limite internacionalmente estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (50 ppb) (WHO, 1996 e CODEX, 2003).

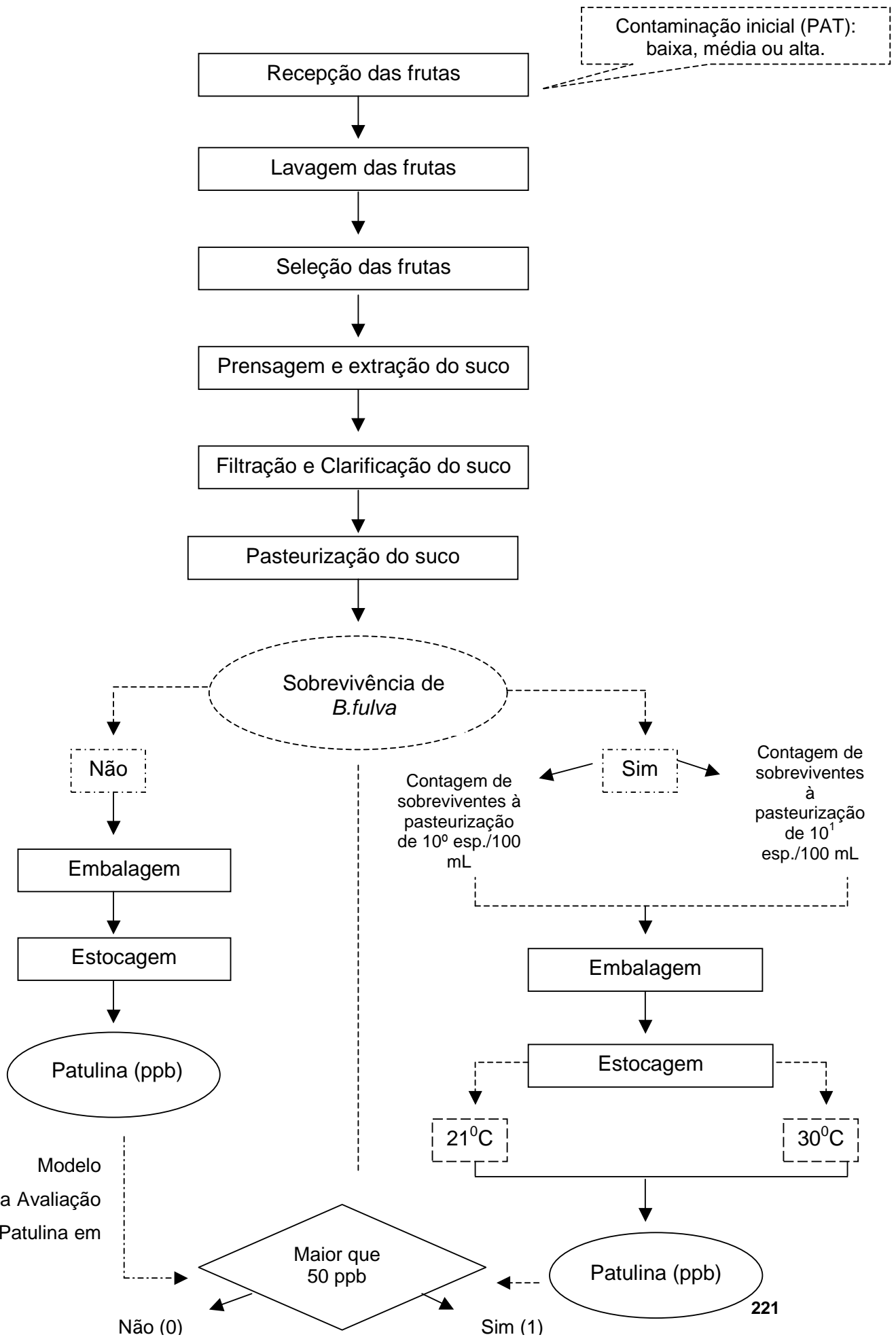


Figura 11: Modelo Esquemático da Avaliação de Risco para Patulina em Suco de Maçã

4.2.13.2. Seleção das distribuições estatísticas e dos limites de patulina para etapa do processamento do suco de maçã:

O modelo de risco proposto é baseado em uma extensa revisão de estudos publicados e em dados experimentais sobre os efeitos das etapas do processo de produção do suco de maçã sobre a patulina.

Os eventos associados a patulina em cada etapa do processamento foram modelados usando distribuições estatísticas. Dentre as etapas do processo apresentadas na *Figura 11*, somente foram modeladas aquelas nas quais algum evento associado (redução ou aumento) aos níveis da patulina foi reportado na literatura, como será discutido a seguir.

Para transparência do modelo, foram descritas as razões para a escolha dos valores utilizados como parâmetros das distribuições, as distribuições selecionadas e as suposições feitas durante o seu desenvolvimento.

Para a etapa de recepção das frutas utilizaram-se dados obtidos a partir do levantamento da incidência da patulina em uma indústria brasileira processadora de suco de maçã (dados referentes às safras de 2003, 2005 e 2006 - não publicados). Os dados foram agrupados em três diferentes faixas de contaminação, de acordo com os níveis de patulina encontrados nas frutas no momento da recepção na indústria processadora, para que se pudesse avaliar a influência desta etapa sobre os níveis da micotoxina presentes no produto final. As faixas estabelecidas foram as seguintes ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou ppb): “baixa” (5-25), “média” (26-50) e “alta” (51 a 400). Considerou-se o valor de $5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ como o valor mínimo para a faixa de contaminação “baixa” por representar o limite de detecção do

método utilizado pela indústria (AOAC Official Method 995.10 - TRUCKSESS, 2000). Nesta faixa também está compreendido o limite máximo de patulina para suco e produtos de maçã destinados às crianças, determinado pela União Européia - 10µg/Kg (EUROPEAN UNION, 2003). Apesar da maioria dos países do mundo adotarem o padrão de 50 µg/Kg, como o máximo para patulina em suco de maçã, o padrão de 25 µg/Kg é adotado pela Lituânia, que pode ser o pioneiro na tendência de redução dos níveis aceitáveis de micotoxinas nos alimentos que deve ocorrer nos próximos anos (FAO, 2004), em virtude de melhorias nos sistemas produtivos e metodologias de detecção. O valor 400 µg/Kg foi considerado máximo (faixa “alta”), por estar marginalmente acima do máximo valor (394 µg/Kg) encontrado em um lote em levantamento feito pela indústria em questão durante os três anos (2003, 2005 e 2006). Apesar de na literatura serem reportados valores mais elevados de patulina nas frutas na etapa da recepção do que os considerados para a faixa “alta”, acima de 1000 µg/Kg, por exemplo (LEGGOTT et al., 2000; SYDENHAM et al., 1995; SYDENHAM et al., 1997; ACAR et al., 1998), tais valores não foram utilizados no presente estudo por se considerar que eles indicam falhas grosseiras no cuidado das frutas desde a colheita, transporte até estocagem, condições estas que devem e podem ser controladas pelas boas práticas agrícolas (BPA) e pelo sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC). Assim, seguindo-se a recomendação da FAO (FAO, 2003), se um critério de aceitação de no máximo 10% de frutas deterioradas para o processamento for estabelecido, níveis aceitáveis de patulina poderão estar presentes nas etapas posteriores à recepção.

Esta hipótese é reforçada pelo estudo de Kadakal e Nas (2002) que reportaram que os sucos produzidos a partir de maçãs sãs estiveram livres de patulina na maioria dos casos e somente uma amostra apresentou-se contaminada (15,85 ppb). Já, para maçãs com 30, 60 e 100% de sua área deteriorada, concentrações de patulina variando entre 47,1-500,3, 156,4-2257,5 e 54,9-2508,6 ppb forem encontradas. Assim, o modelo de risco cobriria através da faixa “alta” de contaminação das maçãs, variações nos níveis de patulina encontradas quando de 30% de cada fruta se apresentasse deteriorada (podridão fúngica).

Além do exposto anteriormente, sabe-se que a presença de danos causados por *Penicillium* spp nem sempre implica na presença de patulina (TANIWAKI *et al.*, 1992), e, também, nem sempre há correlação entre o diâmetro das áreas de deterioração e a quantidade de patulina presente nas frutas, e conseqüentemente no suco (MARTINS *et al.*, 2002). Por isto para o presente estudo, não se utilizou a abordagem de determinação de uma relação entre a porcentagem de frutas apresentando defeitos e níveis de patulina, ou qualquer abordagem de microbiologia preditiva que relacionasse diâmetro das feridas nas frutas com produção de patulina. A utilização dos dados obtidos da indústria torna o modelo mais real e leva em conta a heterogeneidade dos três diferentes níveis de contaminação das frutas, fornecendo base para a adoção de estratégias de gestão efetivas para o controle desta micotoxina na fabricação do suco de maçã.

Os dados de quantidade de patulina das três faixas de contaminação da matéria-prima foram ajustados a uma distribuição probabilística usando Bestfit (Palisade, Ithaca, NY). Os testes de bondade de ajuste de Chi-2, Kolmogorov-

Smirnof e Anderson-Darling foram utilizados para verificação do ajuste dos dados à distribuição probabilística mais adequada a representá-los. As distribuições logística (média, parâmetro de escala contínua) e lognormal (média, desvio padrão) sempre estiveram ranqueadas entre as três primeiras distribuições de acordo com pelo menos dois dos três testes de bondade de ajuste, para os níveis “baixo”, “médio” e “alto”, respectivamente, e desta forma, foram selecionadas e incluídas no modelo de risco. Cada distribuição foi truncada de maneira a impedir que valores fora das faixas consideradas pudessem ser utilizados durante as iterações realizadas.

Na *Tabela 9*, são mostradas fórmulas de distribuição para cada uma das faixas de contaminação das frutas por patulina (baixa, média e alta) na etapa de recepção.

Tabela 9: Fórmulas das distribuições probabilísticas utilizadas no modelo geral de riscos para patulina e suco de maçã.

Faixa de contaminação das frutas na recepção na indústria	Fórmula da distribuição
Baixa	=RiskLogistic(10,8249; 3,1519; RiskTruncate(5; 25))
Média	=RiskLognorm(8,931; 5,32; RiskTruncate(26; 50))
Alta	=RiskLognorm(101,92; 122,83; RiskTruncate(51; 400))

Nas etapas de lavagem e seleção das frutas, filtração, clarificação e pasteurização do suco, utilizaram-se dados disponíveis na literatura. Devido ao grande número de variáveis que podem influenciar na eficiência das etapas de lavagem (por exemplo: pressão dos jatos d'água, presença ou não de agentes sanitizantes), seleção das frutas (por exemplo: número de operadores, automação do sistema de seleção) e filtração e clarificação do suco (tipos de materiais usados e combinação de processos de clarificação, como ultrafiltração, por exemplo), procurou-se obter a distribuição do efeito destas etapas sobre a patulina a partir dos histogramas construídos usando os valores de redução (%) reportados na literatura para cada etapa. Esta abordagem já foi anteriormente empregada por Whiting e Buchanan (1997) e Cassin et al. (1998).

Neste caso, a distribuição normal (média, desvio padrão) foi usada para descrever o efeito destas etapas (lavagem das frutas, seleção das frutas e filtração e clarificação do suco) sobre a patulina, já que os parâmetros obtidos a partir destes dados indicaram simetria dos mesmos em torno da média e curtose próxima a zero. Para a etapa de lavagem, conforme indicam os dados obtidos por Leggott et al. (2000), Jackson et al. (2003), Sydenham et al. (1995) e Sydenham et al. (1997), a % de remoção da patulina, variou de 6,25% a 96% e desta forma, estes dados foram usados para modelagem dos efeitos desta etapa sobre a patulina. Na etapa de seleção das frutas, os dados de Lovett et al. (1975), Sydenham et al. (1995), Acar et al. (1998), Sydenham et al. (1997), Leggott et al. (2000) foram utilizados para modelagem. A porcentagem de redução da patulina

reportada variou de 10 a 97,7%. Valores mínimo e máximo, iguais a 10 e 99% de redução foram reportados. Na etapa de filtração e clarificação do suco os valores reportados (LEGGOTT et al., 2000, BISSESSUR et al., 2001, KADAKAL e NAS, 2002, ACAR et. al., 1998 e LEGGOTT et al., 2001), variaram de 10,8% e 83%. Os valores mínimo e máximo de redução observados em cada etapa foram adicionados como valores mínimo e máximo de truncamento para as distribuições, de maneira a evitar potenciais resultados incorretos, visto que a distribuição normal teoricamente abrange de valores negativos a valores positivos (VOSE, 2000).

Na etapa de pasteurização do suco, Wheeler et al. (1987) e Kadakal et al. (2002) reportaram que a redução da patulina varia entre 5,56% a 18,8%, para tratamentos à 90°C de poucos segundos a 10 min. No entanto, as condições de pasteurização atualmente empregadas nas indústrias brasileiras estão na faixa de 92°C à 105°C, sendo a temperatura de 95°C mais comumente utilizada para o suco de maçã e havendo tendência de elevação da temperatura para no mínimo 105°C, em virtude da presença de contaminantes alvos mais termoresistentes, como fungos e *Alicyclobacillus* spp. Lovett e Peeler (1973) foram os únicos a determinarem os parâmetros cinéticos (valores D à 105°C, 110°C, 115°C, 120°C e 125°C e o valor Z) para inativação da patulina. No entanto, estes autores utilizaram tampão McIlvaine's (tampão a base de ácido cítrico e fosfato de sódio) com pH ajustado como substrato, o que pode justificar valores D tão elevados obtidos, como D à 105°C de 1058 minutos em pH 3,5, valor próximo ao pH do suco de maçã ao utilizado neste estudo. Como as variações nos níveis de patulina

em suco de maçã mostraram-se altamente dependentes do teor de sólidos solúveis presente no suco de maçã (KADAKAL e NAS, 2003), a utilização destes dados levaria a uma extrapolação grosseira do efeito da pasteurização sobre a patulina. Assim, os dados do efeito do tratamento térmico do suco de maçã à 90°C e 100°C sobre a patulina reportados por Kadakal e Nas (2003) foram utilizados para representar esta etapa. Considerando que a tendência da curva de inativação da patulina nas condições descritas por estes autores era de redução linear nos níveis da toxina com o passar do tempo, estimaram-se os valores D à 90°C (224,1 min) e à 100°C (212, 7 min) a partir dos dados destes autores. Plotando-se os valores de log de D e as respectivas temperaturas, determinou-se a equação que representa a resistência térmica da micotoxina ($y=2,55-0,0023T$, onde T= temperatura em °C). Um modelo de inativação térmica foi utilizado para se adicionar variabilidade e incerteza da etapa de pasteurização sobre a patulina, que foi rodado no software @Risk (Figura 12). A distribuição PERT (mínimo, mais provável, máximo) foi usada para modelagem do efeito da pasteurização sobre a patulina na faixa de temperatura de desenvolvimento do modelo de inativação térmica (90 a 100°C), permitindo que os valores de temperatura mais comumente utilizados pelas indústrias (95 e 98°C fossem considerados). Os valores 90°C, 95°C e 100°C foram considerados respectivamente o valor mínimo, mais provável e valor máximo da distribuição Pert. Os tempos de pasteurização do suco considerados foram respectivamente de: 15 s (mínimo), 30 s (mais provável) e 45 s (máximo), em virtude do processamento ser do tipo HTST (“*high temperature, short time*”). Após a simulação do modelo da etapa da pasteurização no @Risk, os resultados indicaram que as reduções decimais causadas pela pasteurização

seriam em média $2,31 \times 10^{-3}$, com valores mínimo e máximo de $1,19 \times 10^{-3}$ e $3,46 \times 10^{-3}$, respectivamente.

Esta abordagem para avaliação do efeito da etapa de tratamento térmico foi baseada no estudo de Oscar (2004) de avaliação de risco para *Salmonella* e frangos inteiros, e tem a vantagem de não se fazer suposições a respeito das condições (temperatura, tempo, efeito da etapa) sobre o microrganismo ou toxina alvo do estudo.

	A	B	C
1		Fórmulas	Saídas
2	Temperatura final (°C)	=RiskPert(92; 95; 100)	95
3	Valor D (min)	=10^(2,55-(0,0023*C2))	216,4
4	Tempo de pasteurização (min)	=RiskPert(0,25; 0,5; 0,75)	0,5
5	Reduções decimais logarítmicas	=RiskOutput()+C4/C3	0,00231

Figura 12: Exemplo da Planilha de Excel apresentando o modelo simulado no @Risk para determinação dos parâmetros mínimo, mais provável e máximo de redução da patulina durante a pasteurização do suco de maçã.

Para a etapa de estocagem, como a produção de patulina *versus* tempo de estocagem à 21°C e 30°C (determinada conforme item 4.2.12), seguiu uma tendência linear, se determinou o coeficiente angular e linear a partir de cada condição de temperatura e carga de esporos (10^0 e 10^1 esporos/100mL de suco) estudada, que representam situações em que há sobrevivência dos bolores

termoresistentes à pasteurização. A carga de 10⁰ esporos/100 mL de suco foi escolhida por ser a carga de contaminantes de bolores termoresistentes ocasionalmente encontradas em sucos de frutas prontos para beber (MASSAGUER, 2003; PITT & HOCKING, 1984). A carga de contaminação de 10¹ esporos/100mL simula uma condição em que uma contaminação alta das frutas por bolores termoresistentes e sobrevivência do fungo, representando a utilização de matérias-primas de baixa qualidade. Os valores de temperatura utilizados para estocagem do suco (21°C e 30°C), foram escolhidos por abrangerem a temperatura média anual das regiões sul e sudeste (21°C) e norte e nordeste (30°C) do Brasil, respectivamente, tendo-se desta forma, um panorama geral da situação. Os valores dos coeficientes angular e linear foram inseridos no modelo de riscos e desta forma, foi possível se modificar o “tempo” (em dias) de estocagem (até 12 dias; tempo no qual as embalagens já apresentaram alteração visual e conseqüentemente o produto não seria consumido) e se determinar os riscos de se ultrapassar o limite de 50 µg/Kg para cada cenário avaliado.

Na *Tabela 10* são apresentados os coeficientes angulares e lineares da *equação 11* obtidos referentes à produção de patulina para cada carga de esporos de *B.fulva* IOC 4518 (10⁰ e 10¹/100 mL) e temperatura (21°C e 30°C) estudadas.

$$C_{pat} = CA \cdot T + CL \quad (\text{Equação 11}).$$

Onde:

C_{pat}= concentração de patulina (ppb);

CA= coeficiente angular da equação de regressão linear da produção de patulina para determinada carga de esporos e temperatura de estocagem *versus* tempo;

T= Temperatura (°C);

CL= coeficiente linear da equação de regressão linear da produção de patulina para determinada carga de esporos e temperatura de estocagem *versus* tempo.

Tabela 10: Coeficientes angulares e lineares obtidos para produção de patulina por *B.fulva* IOC 4518 inoculado em suco de maçã com diferentes cargas de esporos de (10^0 e $10^1/100$ mL) e temperatura (21°C e 30°C).

Carga de esporos (esp./100mL)	Temperatura de estocagem (°C)	Coeficiente angular	Coeficiente linear	R ²
10 ⁰	21°C	3,8423	-9,43	0,9964
	30°C	2,6253	1,75	0,9695
10 ¹	21°C	13,046	-39,587	0,9461
	30°C	22,266	-23,35	0,8834

Na *Figura 13* é apresentado um exemplo da planilha geral do modelo de risco para patulina e suco de maçã simulado usando o software @Risk, considerando carga de esporos sobreviventes à pasteurização de $10^0/100$ mL, sendo apresentadas as distribuições e fórmulas usadas. Para uma carga de esporos de $10^1/100$ mL, os valores dos coeficientes angular e linear são substituídos pelos valores referentes à esta carga de esporos, conforme *Tabela 10*. Da mesma forma, o nível de contaminação inicial das matérias-primas foi alterado de acordo com as fórmulas das distribuições estatísticas apresentadas na

Tabela 9. Assim, um total de quinze diferentes cenários foram rodados no ambiente do @Risk (Tabela 11).

Tabela 11: Diferentes cenários rodados no ambiente do @Risk para modelagem de risco da patulina em suco de maçã.

Carga de esporos sobreviventes à pasteurização (esporos/100 mL)	Temperatura de estocagem (°C)	Faixas de contaminação por patulina das frutas na recepção na indústria processadora (ppb) (dados de entrada) ¹		
		Baixa (5-25)	Média (26-50)	Alta (51-400)
Sem sobreviventes	Sem estocagem	1	2	3
10 ⁰	21°C	4	5	6
	30°C	7	8	9
10 ¹	21°C	10	11	12
	30°C	13	14	15

¹Números referentes a cada cenário estudado.

			Etapas	Distribuições e Fórmulas					
	A	B	C	D		E	F	G	H
1			Recepção das frutas	Faixa baixa	=RiskLogistic(10,8249; 3,1519; RiskTruncate(5; 25))				
2			Lavagem das frutas	=RiskNormal(56,79; 25,78; RiskTruncate(6,25; 96,03))					
3				=D1*(1-D2)					
4			Seleção das frutas	=RiskNormal(48,03; 25,46; RiskTruncate(7,3; 83))					
5				=D3*(1-D4)					
6			Filtração do suco	=RiskNormal(46,52; 23,89; RiskTruncate(10; 97,7))					
7				=D5*(1-D6)					
8			Pasteurização do suco	=RiskPert(0,00119; 0,00231; 0,00346)			Carga de esporos (10 ⁰ /100 mL)		
9				=D7*(1-D8)					
10		T* (°C)	21	=D9			T* (°C)	Coeficiente angular (CA)	Coeficiente linear (CL)
11		T* (dias)	12				21	3,8423	-9,43
12			Estocagem do suco	=SE(C10=F11;G11*C11+H11;SE(C10=F12;G12*C11+H12))			30	2,6253	1,75
13			Quantidade final	=RiskOutput("Quantidade Final (ppb)") + D12+D10					
14			Limite Patulina (µg/L)	50					
15			Ultrapassou?	=RiskOutput("Acima do limite") + SE(D13>D14;1;0)			<i>*Referentes à estocagem do suco.</i>		

Figura 13: Exemplo de planilha do modelo de risco para patulina e suco de maçã com 10⁰ esporos/100 mL de sobreviventes à pasteurização.

4.2.13.3. Simulação do modelo:

Os cenários de riscos definidos na *Figura 11* foram simulados usando a seguinte configuração de simulações: 10.000 iterações usando diferentes valores de sementes. Segundo Oscar (2004), ao se simular o modelo de risco com diferentes sementes geradoras ao acaso, se pode avaliar a incerteza das saídas do modelo, o que é importante para avaliação quantitativa de riscos pelo fato dele muitas vezes conter eventos raros.

O modelo pode ser simulado considerando o número de iterações e simulações necessárias para se atingir a convergência. A convergência é alcançada quando os dados gerados por cada célula de saída indicarem que a porcentagem de mudança nos percentis, média e desvio padrão pouco se alteram com iterações adicionais (<1,5%). Assim, o impacto de se correr iterações adicionais é menor e as distribuições de saída se tornam mais estáveis. No entanto, para que se pudesse cobrir todo o campo da distribuição estatística, o número de simulações e iterações acima descritos, foram corridos no ambiente do @Risk (PALISADE, 2007).

4.2.14. Análise estatística:

A análise estatística foi conduzida utilizando-se o software *Statística 7.0* (Statsoft, Inc) para verificação de diferenças entre as médias dos valores. A análise foi realizada através do Teste de Tukey com valores de probabilidade $p < 0,05$ sendo considerados significativos.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do pH e °Brix das amostras de suco pronto para beber e sucos concentrados:

Os resultados das análises de pH e °Brix nas amostras de sucos prontos para beber e nos sucos concentrados são apresentados na *Tabela 12*. Todas as amostras de sucos prontos para beber apresentaram valores médios de pH na faixa dos valores obtidos por Rizzon, Bernardi e Miele (2005) (3,44 e 3,74 para os sucos das variedades Golden Delicious e Fuji, respectivamente). De acordo com a análise estatística não há diferença significativa ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey entre os valores de pH dos diferentes lotes analisados. Apesar de haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras B e D, o teor de sólidos solúveis esteve sempre acima de 11°Brix. As diferenças no teor de sólidos entre alguns lotes pode ter sido devido a pequenas variações durante o processamento do suco (diluição do concentrado, por exemplo), mas são consideradas aceitáveis, visto que corroboram o preconizado pela Instrução Normativa 1 de 2000 (BRASIL, 2000), que estabelece que o suco de maçã deve ter um teor mínimo de sólidos de 10,5.

Tabela 12: Valores de pH e °Brix obtidos a partir das amostras de suco de maçã: pronto para beber, suco concentrado clarificado e não clarificado.

Amostra	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)
	Média* (desvio-padrão)	Média* (desvio-padrão)
Sucos prontos para beber		
A	3,60 ± (0,006) ^a	11,43 ± (0,115) ^{ab}
B	3,58 ± (0,006) ^a	11,53 ± (0,058) ^a
C	3,58 ± (0,015) ^a	11,40 ± (0,100) ^{ab}
D	3,58 ± (0,015) ^a	11,17 ± (0,153) ^b
E	3,57 ± (0,021) ^a	11,30 ± (0,100) ^{ab}
Sucos concentrados		
F	3,55 ± (0,015)	70,10 ± (0,100)
G	3,60 ± (0,010)	69,90 ± (0,265)
H	3,66 ± (0,015)	45,23 ± (0,306)

*Valores com a mesma letra indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.

5.2. Enumeração de bolores termoresistentes:

Das 50 embalagens de sucos prontos para beber nas quais se avaliou a ocorrência de bolores termoresistentes, apenas uma amostra (2,0%), apresentou-se contaminada (1,0 esporo/100 mL). A contagem obtida está dentro da faixa de contaminação por bolores termoresistentes normalmente encontrada ou aceitável para sucos de frutas no Brasil ou em países como a Austrália, que é de menos do que 10 esporos/100 mL (BEUCHAT & PITT, 1992; HOCKING & PITT, 1984, MASSAGUER, 2001). Para as amostras de suco concentrado de maçã, nenhum ascósporo de fungo foi encontrado.

Os resultados obtidos indicaram que há um controle de qualidade bastante eficiente tanto na empresa na qual o suco concentrado foi fabricado quanto na empresa processadora do suco pronto, podendo ser considerado um reflexo da utilização de matéria-prima de boa qualidade (maçãs), adequada lavagem e seleção das frutas, além do processo térmico adequadamente estabelecido e mantido sob controle com relação ao binômio tempo/temperatura.

O fungo isolado a partir da amostra de suco pronto para beber pertencente ao primeiro lote (A) foi identificado como ***Aspergillus carneus*** Blochwitz, 1933, subgênero Nidulantes, seção Flavipedes e recebeu o número de catálogo **IOC 4519** da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ). É importante ressaltar que o produto não apresentou sinais de alteração que pudessem ser verificados através das medidas de pH e Brix. A descrição das características macroscópicas e microscópicas é mostrada na *Tabela 13*.

Tabela 13: Descrição das características macroscópicas e microscópicas de *A.carneus* IOC 4519 isolado de suco de maçã.

Característica	Descrição
Diâmetro das colônias	20-42 mm após 7 dias de incubação
Macroscópica (em MEA)	Conídios brancos a rosa, abóbora acinzentado pálido a abóbora amarronzado; micélio aéreo branco esparso; reverso sem cor ou algumas vezes marrom pálido ou amarelo; pigmento solúvel, quando presente, amarelo a amarelo amarronzado. Colônias baixas, granulares e planas.
Microscópica (após crescimento em MEA)	Cabeças conidiais radiadas a fracamente colunar. Estipes de parede lisa, hialinas a marrom bem pálido, com 500 (700) x 3.5-7 µm. Vesículas variando de clavadas a piriformes 9-15 µm, bisseriada, métula cobrindo somente a parte superior da vesícula. Conídios lisos, esféricos com 3 µm de tamanho.

Na *Figura 14*, se observa o crescimento de *A.carneus* IOC 4519 em Czapek ágar, ágar extrato de malte e G25N ágar.



Czapek Ágar

Ágar Extrato de Malte

G25N Ágar

Figura 14: Crescimento de *A.carneus* em meios de cultura para identificação de fungos.

De acordo com Klich (2002), *A.carneus* é normalmente encontrado em solo de regiões tropicais e subtropicais e algumas cepas desta espécie são produtoras de citrinina. Mais uma vez se confirma que o solo é a principal fonte de contaminação de bolores isolados e associados a surtos de deterioração de frutas e seus derivados tratados termicamente.

A suspensão de *A.carneus* IOC 4519 preparada continha uma população de $3,4 \times 10^5$ UFC/mL, o que permitiu a realização do teste de determinação do binômio tempo/temperatura de sobrevivência. Neste teste, *A.carneus* não foi capaz de resistir ao menor choque aplicado (80°C/30 min) e desta forma, algumas hipóteses podem ser consideradas: o isolado produziu um esporo menos resistente (perda da resistência térmica) no meio sintético usado (ágar extrato de malte) ou o isolado não produziu a forma termoresistente no meio sintético dentro do tempo de incubação estipulado (BAGLIONI, 1998). Esta última hipótese foi reportada por Samson *et al* (1992) que em estudos com linhagens de *Eupenicillium* spp, constataram que algumas cepas não produziram ascósporos, mesmo dentro de um tempo de incubação de 6 semanas. Outra

possibilidade é a contaminação ambiental, que pode ser muito comum neste tipo de análise. De fato, no presente estudo, um período de incubação de 2 meses à 25°C foi utilizado para permitir a produção dos esporos e mesmo assim, esta foi bem restrita. Outra possibilidade seria a elevada contaminação das matérias-primas e sobrevivência dos fungos à pasteurização. Silva (2006), obteve uma contagem de até $7,6 \times 10^3$ UFC/mL a partir da análise de bolores termoresistentes de 50 amostras de néctar de manga produzidos na região sudeste do Brasil. Assim, o isolamento deste fungo a partir da análise de bolores termoresistentes poderia ser devido à elevada contaminação das matérias-primas e sobrevivência ao tratamento térmico do que à sua resistência térmica.

Apesar de não haverem relatos na literatura do isolamento de *A.carneus* a partir de alimentos, sabe-se que espécies termoresistentes de *Aspergillus spp* têm sido isoladas a partir de sucos de frutas. O primeiro a reportar o isolamento de *Aspergillus spp* a partir de sucos foram Splittstoesser e Splittstoesser (1977), os quais reportaram que uma cepa de *Aspergillus* (WR1) foi capaz de resistir a aquecimento à 85°C por até 60 minutos. Recentemente no Brasil, Silva (2006), reportou o isolamento a partir de néctar de manga de uma cepa de *A.niger* capaz de sobreviver a choque térmico de 100°C/15 min. Apesar destes microrganismos não possuírem estruturas que conhecidamente lhes confirmam capacidade de sobreviver ao aquecimento acima de 80°C, como por exemplo, os ascósporos, seu isolamento a partir de sucos termoprocessados em temperaturas compreendidas na faixa entre 95°C a 105°C, chama a atenção para a necessidade de estudos de composição química das hifas ou conidióforos, os quais podem auxiliar na explicação de sua habilidade em não sucumbir ao aquecimento.

Após a inoculação em ágar suco de maçã, pôde-se observar que *A.carneus* IOC 4519 isolado a partir do suco de maçã apresentou temperatura ótima de multiplicação de

25°C, com crescimento ocorrendo na faixa compreendida entre 10°C e 30°C, entretanto, maiores diâmetros das colônias foram notados entre 20°C e 25°C, demonstrando tendência psicrotrófica deste isolado (*Tabela 14*).

Tabela 14: Diâmetro das colônias de *A.carneus* IOC 4519 em ágar suco de maçã em diferentes valores de temperatura (°C).

Temperatura (°C)	Diâmetro da colônia (mm médio)
10°C	7,0
15°C	15,2
20°C	28,2
25°C	35
30°C	23,7
35°C	0,0*

*Não houve crescimento.

5.3. Determinação de patulina nos sucos prontos para beber e nos sucos concentrados:

A patulina não foi detectada em nenhuma das 5 embalagens de sucos prontos para beber e nos 3 sucos concentrados analisados (< 20 µg/L de suco, que foi o limite de detecção do método utilizado neste item da pesquisa). É importante ressaltar que o objetivo destas análises não foi o de realizar um estudo quantitativo da ocorrência desta micotoxina nos sucos de maçã prontos para beber, já que o número de amostras pode ser considerado baixo e não representativo dos lotes de produção, mas tiveram um caráter informativo. Em estudos realizados no Brasil, diversos autores (MANCHISKY e MÍDIO, 1996; SYLOS e RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; PRADO *et al.*, 2000; MASSAGUER, 2003, CELLI *et al.*, 2006, MALLMAN *et al.*, 2006 e IHA e SABINO, 2007) reportaram baixa

incidência da patulina em sucos de maçã produzidos no país, com poucas amostras apresentando-se contaminadas (3,3% a 15%) e com níveis abaixo de 50 ppb na maioria das amostras. No entanto, medidas contínuas de melhoria e controle da qualidade das frutas utilizadas na produção do suco devem ser adotadas.

A análise de patulina nas amostras de suco concentrado teve por objetivo determinar a presença desta micotoxina no suco que pudesse ser adicionada àquela produzida pelos fungos termoresistentes nos ensaios de capacidade de produção da patulina (itens 4.6, 4.9 e 4.10). Como em nenhuma das amostras detectou-se a patulina (LD: 20 µg/L), o suco foi considerado adequado para utilização nestes ensaios. Nas *Figuras 15 e 16* são apresentados os cromatogramas do padrão de patulina e de uma amostra de suco concentrado clarificado de maçã analisada (unidades de absorvância - AU x tempo de retenção), mostrando ausência da patulina.

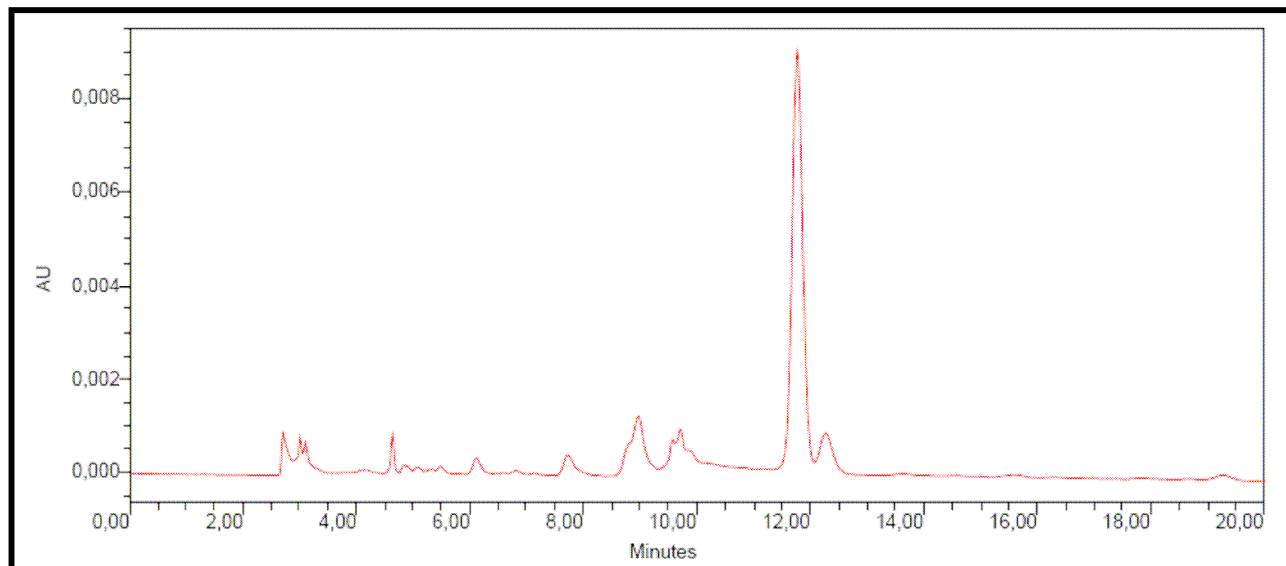


Figura 15: Perfil cromatográfico para análise de patulina (HPLC com detector de UV, $\lambda=276\text{nm}$). O perfil refere-se a amostra F (suco concentrado clarificado de maçã).

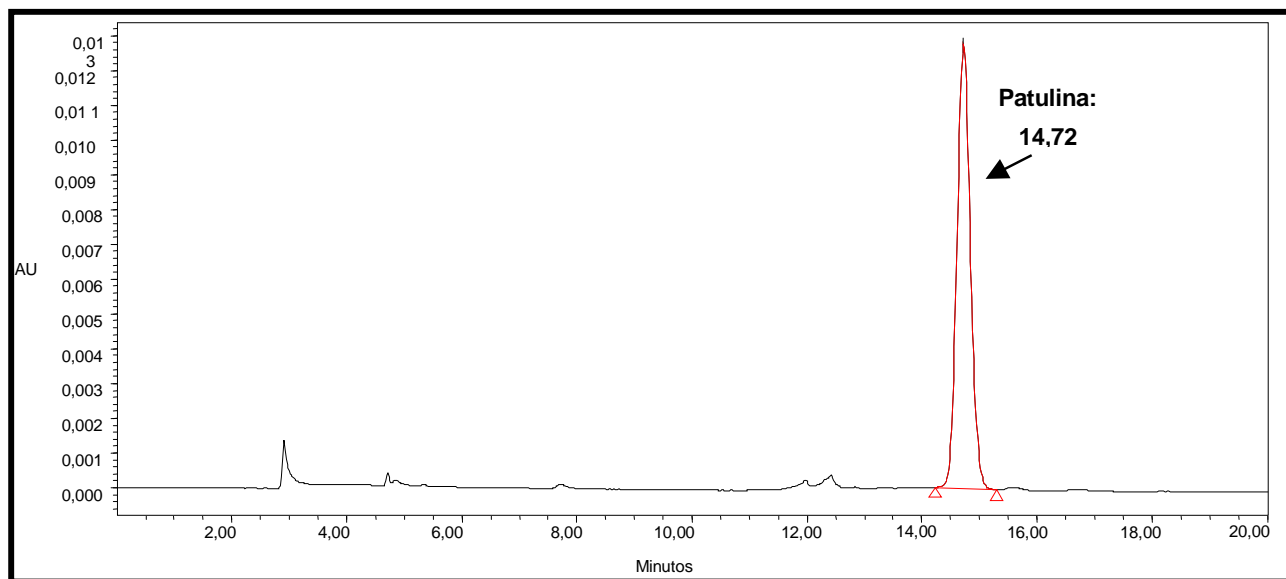


Figura 16: Perfil cromatográfico (HPLC) mostrando o pico do padrão de patulina obtido usando-se detector de UV ($\lambda=276\text{nm}$). O pico refere-se à solução padrão (suco de maçã), inoculado com $2,016\ \mu\text{g/mL}$ de patulina.

5.4. Controle de identidade das cepas de *B.fulva* e *B.nivea* utilizadas no estudo:

As cepas ATCC 24008 e FRR 4421 apresentaram as características macro e micromorfológicas descritas por Pitt e Hocking (1999) para *B.nivea*, enquanto a cepa IOC 4518, apresentou as características descritas para *B.fulva* (Tabela 15).

Tabela 15: Características macro e microscópicas observadas na diferenciação de *B.fulva* IOC 4518 e *B.nivea* ATCC 24008 e FR 4421.

Espécie	Características observadas
<i>B.nivea</i>	Ascospores pouco menores do que os de <i>B.fulva</i> . Aleuroconídios e penicílios estiveram presentes. Fiálides cilíndricas se afinando gradualmente e conídios elipsoidais a piriformes, com paredes lisas. Macroscopicamente, colônias brancas foram observadas.
<i>B.fulva</i>	Ascospores formados a partir de hifas brancas retorcidas, não estando, no entanto, envelopadas por elas. Ascospores esféricos a subesféricos, com os ascóspores elipsoidais com paredes lisas. Penicílios são as estruturas reprodutivas anamórficas. Fiálides com aparência não uniforme e formato de garrafa, estreitando-se gradualmente até os ápices. Os conídios com paredes lisas são cilíndricos ou em formato de barril, usualmente estreitos ou mais longos e largos ou elipsoidais. Macroscopicamente, colônias amarronzadas/douradas foram observadas.

Os resultados do seqüenciamento genético do fragmento ITS (*internal transcribed spacer*) das cepas *B.fulva* IOC 4518 e *B.nivea* FRR 4421, indicaram 100% de similaridade com as demais espécies de cada espécie testada (*Figuras 17 e 18*), corroborando os resultados obtidos para os testes microscópicos e macroscópicos. Estes ensaios não foram realizados com a cepa *B.nivea* ATCC 24008 por ela já ter tido sua identidade anteriormente confirmada também por Puel et al. (2007).

	1				60
BFanderson		G GAAGGATCAT	TACCGAGTGC	GGGTCCCTCG	TGGCCCAACC
BfNRR1125	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG	GAAGGATCAT	TACCGAGTGC	GGGTCCCTCG
BfNRR13493	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG	GAAGGATCAT	TACCGAGTGC	GGGTCCCTCG
BfNRR12975	TTTCCGTAGG	TGAACCTGCG	GAAGGATCAT	TACCGAGTGC	GGGTCCCTCG
BfNRR12614			GAGTGC	GGGTCCCTCG	TGGCCCAACC
Consensusg	gaagatcat	taccGAGTGC	GGGTCCCTCG	TGGCCCAACC
	61				120
BFanderson	TCCCACCCGT	GTTGACCGAC	ACCTGTTGCT	TCGGCGGGCC	CGCCAGGGCT
BfNRR1125	TCCCACCCGT	GTTGACCGAC	ACCTGTTGCT	TCGGCGGGCC	CGCCAGGGCT
BfNRR13493	TCCCACCCGT	GTTGACCGAC	ACCTGTTGCT	TCGGCGGGCC	CGCCAGGGCT
BfNRR12975	TCCCACCCGT	GTTGACCGAC	ACCTGTTGCT	TCGGCGGGCC	CGCCAGGGCT
BfNRR12614	TCCCACCCGT	GTTGACCGAC	ACCTGTTGCT	TCGGCGGGCC	CGCCAGGGCT
Consensus	TCCCACCCGT	GTTGACCGAC	ACCTGTTGCT	TCGGCGGGCC	CGCCAGGGCT
	121				180
BFanderson	CGCCGGGGGG	CCCCGTGCGC	CCCGGGCCCG	CGCCCGCCGA	AGACCCCTCG
BfNRR1125	CGCCGGGGGG	CCCCGTGCGC	CCCGGGCCCG	CGCCCGCCGA	AGACCCCTCG
BfNRR13493	CGCCGGGGGG	CCCCGTGCGC	CCCGGGCCCG	CGCCCGCCGA	AGACCCCTCG
BfNRR12975	CGCCGGGGGG	CCCCGTGCGC	CCCGGGCCCG	CGCCCGCCGA	AGACCCCTCG
BfNRR12614	CGCCGGGGGG	CCCCGTGCGC	CCCGGGCCCG	CGCCCGCCGA	AGACCCCTCG
Consensus	CGCCGGGGGG	CCCCGTGCGC	CCCGGGCCCG	CGCCCGCCGA	AGACCCCTCG
	181				240
BFanderson	CGAAGGTTGC	CGTCTGAGTA	TGAAATCAAT	CGTTAAACT	TCAACAACG
BfNRR1125	CGAAGGTTGC	CGTCTGAGTA	TGAAATCAAT	CGTTAAACT	TCAACAACG
BfNRR13493	CGAAGGTTGC	CGTCTGAGTA	TGAAATCAAT	CGTTAAACT	TCAACAACG
BfNRR12975	CGAAGGTTGC	CGTCTGAGTA	TGAAATCAAT	CGTTAAACT	TCAACAACG
BfNRR12614	CGAAGGTTGC	CGTCTGAGTA	TGAAATCAAT	CGTTAAACT	TCAACAACG
Consensus	CGAAGGTTGC	CGTCTGAGTA	TGAAATCAAT	CGTTAAACT	TCAACAACG
	241				300
BFanderson	TTCCGGCATC	GATGAAGAAC	CGAGCGAAAT	CGGATAAGTA	ATGTGAATTG
BfNRR1125	TTCCGGCATC	GATGAAGAAC	CGAGCGAAAT	CGGATAAGTA	ATGTGAATTG
BfNRR13493	TTCCGGCATC	GATGAAGAAC	CGAGCGAAAT	CGGATAAGTA	ATGTGAATTG
BfNRR12975	TTCCGGCATC	GATGAAGAAC	CGAGCGAAAT	CGGATAAGTA	ATGTGAATTG
BfNRR12614	TTCCGGCATC	GATGAAGAAC	CGAGCGAAAT	CGGATAAGTA	ATGTGAATTG
Consensus	TTCCGGCATC	GATGAAGAAC	CGAGCGAAAT	CGGATAAGTA	ATGTGAATTG
	301				360
BFanderson	TGAATCATCG	AATCTTTGAA	CGCACATTGC	GCCCCTGGC	ATTCCGGGGG
BfNRR1125	TGAATCATCG	AATCTTTGAA	CGCACATTGC	GCCCCTGGC	ATTCCGGGGG
BfNRR13493	TGAATCATCG	AATCTTTGAA	CGCACATTGC	GCCCCTGGC	ATTCCGGGGG
BfNRR12975	TGAATCATCG	AATCTTTGAA	CGCACATTGC	GCCCCTGGC	ATTCCGGGGG
BfNRR12614	TGAATCATCG	AATCTTTGAA	CGCACATTGC	GCCCCTGGC	ATTCCGGGGG
Consensus	TGAATCATCG	AATCTTTGAA	CGCACATTGC	GCCCCTGGC	ATTCCGGGGG
	361				420
BFanderson	CCGAGCGTCA	TTGCTAACC	TCCAGCCCGG	CTGGTGTGTT	GGGCCGCCGT
BfNRR1125	CCGAGCGTCA	TTGCTAACC	TCCAGCCCGG	CTGGTGTGTT	GGGCCGCCGT
BfNRR13493	CCGAGCGTCA	TTGCTAACC	TCCAGCCCGG	CTGGTGTGTT	GGGCCGCCGT
BfNRR12975	CCGAGCGTCA	TTGCTAACC	TCCAGCCCGG	CTGGTGTGTT	GGGCCGCCGT
BfNRR12614	CCGAGCGTCA	TTGCTAACC	TCCAGCCCGG	CTGGTGTGTT	GGGCCGCCGT
Consensus	CCGAGCGTCA	TTGCTAACC	TCCAGCCCGG	CTGGTGTGTT	GGGCCGCCGT
	421				480
BFanderson	GGACGGGCC	GAAAGGCAGC	GGCGGGCCCG	CGTCCGGTCC	TCGAGCGTAT
BfNRR1125	GGACGGGCC	GAAAGGCAGC	GGCGGGCCCG	CGTCCGGTCC	TCGAGCGTAT
BfNRR13493	GGACGGGCC	GAAAGGCAGC	GGCGGGCCCG	CGTCCGGTCC	TCGAGCGTAT
BfNRR12975	GGACGGGCC	GAAAGGCAGC	GGCGGGCCCG	CGTCCGGTCC	TCGAGCGTAT
BfNRR12614	GGACGGGCC	GAAAGGCAGC	GGCGGGCCCG	CGTCCGGTCC	TCGAGCGTAT
Consensus	GGACGGGCC	GAAAGGCAGC	GGCGGGCCCG	CGTCCGGTCC	TCGAGCGTAT
	481				540
BFanderson	CACGGCTCT	GTTAGGCCCG	GCCGGCTTGC	TGGCCAACGA	CCTCACGGTC
BfNRR1125	CACGGCTCT	GTTAGGCCCG	GCCGGCTTGC	TGGCCAACGA	CCTCACGGTC
BfNRR13493	CACGGCTCT	GTTAGGCCCG	GCCGGCTTGC	TGGCCAACGA	CCTCACGGTC
BfNRR12975	CACGGCTCT	GTTAGGCCCG	GCCGGCTTGC	TGGCCAACGA	CCTCACGGTC
BfNRR12614	CACGGCTCT	GTTAGGCCCG	GCCGGCTTGC	TGGCCAACGA	CCTCACGGTC
Consensus	CACGGCTCT	GTTAGGCCCG	GCCGGCTTGC	TGGCCAACGA	CCTCACGGTC
	541				587
BFanderson	TCTCTTAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGG	ATACCCGCTG	AACCTTA
BfNRR1125	TCTCTTAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGG	ATACCCGCTG	AACCTTA
BfNRR13493	TCTCTTAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGG	ATACCCGCTG	AACCTTA

Figura 17: Seqüência do fragmento

ITS para a cepa *B.fulva* IOC 4518.

```

1                               60
BnAnderson                      G TCGGGTCCC TCGTGGCCA
NRRL35592 AGGTTTCCGT AGGTGAACCT GCGGAAGGAT CATTACCGAG TCGGGTCCC TCGTGGCCA
NRRL2615                      CGGAAGGAT CATTACCGAG TCGGGTCCC TCGTGGCCA
Consensus ..... .cggaaggat cattaccgaG TCGGGTCCC TCGTGGCCA

61                               120
BnAnderson ACCTCCAC CCGTGTGACC GACACCTGTT GCTTCGGCGG GCCCGCCAGG GCTCCCGCCC
NRRL35592 ACCTCCAC CCGTGTGACC GACACCTGTT GCTTCGGCGG GCCCGCCAGG GCTCCCGCCC
NRRL2615 ACCTCCAC CCGTGTGACC GACACCTGTT GCTTCGGCGG GCCCGCCAGG GCTCCCGCCC
Consensus ACCTCCAC CCGTGTGACC GACACCTGTT GCTTCGGCGG GCCCGCCAGG GCTCCCGCCC

121                              180
BnAnderson GGCCGCCGGG GGGCCTCGTC GCCCCCGGGC CCGCGCCCGC CGAAGACCCC TCGAACGCTG
NRRL35592 GGCCGCCGGG GGGCCTCGTC GCCCCCGGGC CCGCGCCCGC CGAAGACCCC TCGAACGCTG
NRRL2615 GGCCGCCGGG GGGCCTCGTC GCCCCCGGGC CCGCGCCCGC CGAAGACCCC TCGAACGCTG
Consensus GGCCGCCGGG GGGCCTCGTC GCCCCCGGGC CCGCGCCCGC CGAAGACCCC TCGAACGCTG

181                              240
BnAnderson CCTTGAAGGT TGCCGTCTGA GTATAAAATC AATCGTTAAA ACTTCAACA ACGGATCTCT
NRRL35592 CCTTGAAGGT TGCCGTCTGA GTATAAAATC AATCGTTAAA ACTTCAACA ACGGATCTCT
NRRL2615 CCTTGAAGGT TGCCGTCTGA GTATAAAATC AATCGTTAAA ACTTCAACA ACGGATCTCT
Consensus CCTTGAAGGT TGCCGTCTGA GTATAAAATC AATCGTTAAA ACTTCAACA ACGGATCTCT

241                              300
BnAnderson TGGTTCGGCG ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATCGGATAA GTAATGTGAA TTGCAGAATT
NRRL35592 TGGTTCGGCG ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATCGGATAA GTAATGTGAA TTGCAGAATT
NRRL2615 TGGTTCGGCG ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATCGGATAA GTAATGTGAA TTGCAGAATT
Consensus TGGTTCGGCG ATCGATGAAG AACGCAGCGA AATCGGATAA GTAATGTGAA TTGCAGAATT

301                              360
BnAnderson CCGTGAATCA TCGAATCTTT GAACGCACAT TCGCCCCCTT GGCATTCCGG GGGGCATGCC
NRRL35592 CCGTGAATCA TCGAATCTTT GAACGCACAT TCGCCCCCTT GGCATTCCGG GGGGCATGCC
NRRL2615 CCGTGAATCA TCGAATCTTT GAACGCACAT TCGCCCCCTT GGCATTCCGG GGGGCATGCC
Consensus CCGTGAATCA TCGAATCTTT GAACGCACAT TCGCCCCCTT GGCATTCCGG GGGGCATGCC

361                              420
BnAnderson TGTCCGAGCG TCATTGCTAA CCTCCAGCC CGGCTGGTGT GTTGGGCCGC CGTCCCCTCC
NRRL35592 TGTCCGAGCG TCATTGCTAA CCTCCAGCC CGGCTGGTGT GTTGGGCCGC CGTCCCCTCC
NRRL2615 TGTCCGAGCG TCATTGCTAA CCTCCAGCC CGGCTGGTGT GTTGGGCCGC CGTCCCCTCC
Consensus TGTCCGAGCG TCATTGCTAA CCTCCAGCC CGGCTGGTGT GTTGGGCCGC CGTCCCCTCC

421                              480
BnAnderson GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGCGGGC CCGGTCCCG TCCTCGAGCG TATGGGGCTT
NRRL35592 GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGCGGGC CCGGTCCCG TCCTCGAGCG TATGGGGCTT
NRRL2615 GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGCGGGC CCGGTCCCG TCCTCGAGCG TATGGGGCTT
Consensus GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGCGGGC CCGGTCCCG TCCTCGAGCG TATGGGGCTT

481                              540
BnAnderson TGTACACGC TCTGGTAGGC CCGCCCGGCT TGCTGGCCAA CGACCTCAGG GTCACCTAAC
NRRL35592 TGTACACGC TCTGGTAGGC CCGCCCGGCT TGCTGGCCAA CGACCTCAGG GTCACCTAAC
NRRL2615 TGTACACGC TCTGGTAGGC CCGCCCGGCT TGCTGGCCAA CGACCTCAGG GTCACCTAAC
Consensus TGTACACGC TCTGGTAGGC CCGCCCGGCT TGCTGGCCAA CGACCTCAGG GTCACCTAAC

541                              600
BnAnderson TTCTCTCTTA GGTGACCTC GGATCAGGTA GGGATACCCG CTGAACTT
NRRL35592 TTCTCTCTTA GGTGACCTC GGATCAGGTA GGGATACCCG CTGAACTTAA GCATATCAAT
NRRL2615 TTCTCTCTTA GGTGACCTC
Consensus TTCTCTCTTA GGTGACCTc ggatcaggta gggatacccg ctgaaactt..

```

Figura 18: Sequência do fragmento ITS para a cepa *B.nivea* FRR 4421.

5.5. Preparo, padronização e contagem em câmara de Neubauer das suspensões de ascósporos/ascos de *B.fulva* e *B.nivea*:

Suspensões contendo ascos e ascósporos com paredes rígidas, cobrindo mais de 90% das lâminas foram obtidas após 30 dias de incubação das Garrafas de Roux à 30°C (Figura 19). Apesar da aplicação de três centrifugações a 10.000 RPM e sonicação de até

6 minutos em temperatura de 1°C, nem sempre se obteve suspensões somente de ascósporos.

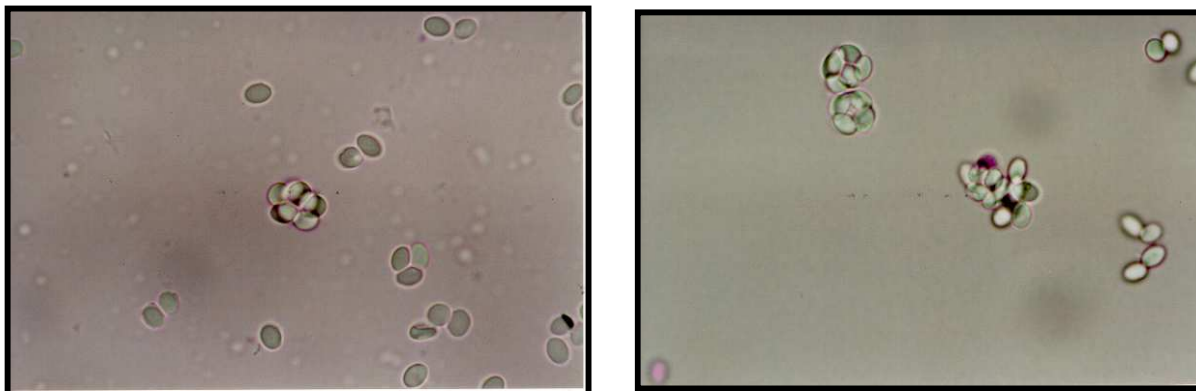


Figura 19:

Suspensões de *Byssochlamys* spp mostrando a presença de ascos e ascósporos (aumento de 1400 vezes em microscópio óptico).

Apesar de se saber que a obtenção de suspensões homogêneas apresentando ascósporos livres pode permitir melhores e mais fáceis interpretações das curvas de sobreviventes do que quando os ascósporos estão dentro dos ascos (CASELLA *et al.*, 1990), isto não foi conseguido no presente estudo mesmo após três centrifugações das suspensões e a aplicação de até 6 minutos de sonicação à temperatura de 0-4°C. O tempo de sonicação não foi mais estendido pela possibilidade de ocorrerem danos à parede dos ascósporos com conseqüente perda de sua resistência térmica. Como não se têm relatos na literatura de qual destas estruturas prevalece, a utilização de suspensões contendo ascos e ascósporos, pode representar uma situação mais realista.

Através da contagem direta (câmara de Neubauer), obtiveram-se os resultados reportados na *Tabela 16*. É importante enfatizar que esta contagem corresponde à contagem de ascósporos/ascos viáveis e não viáveis e somente através da determinação

do tempo e temperatura ótimos de ativação (contagem por plaqueamento em MEA após choque ótimo de ativação de acordo com o *item 5.7*), pôde-se confirmar a contagem de ascósporos viáveis presentes na suspensão. Ao se comparar as duas contagens, observou-se uma queda de aproximadamente um ciclo logarítmico para cada suspensão ao se considerar o método de plaqueamento em MEA (ascósporos viáveis).

As suspensões obtidas continham em média 10^7 ascósporos/mL, o que facilitou a realização dos experimentos de determinação da resistência térmica e ensaios na planta piloto de esterilização contínua por ser possível se trabalhar com menores volumes, garantindo a realização de todo o estudo com somente uma suspensão mãe.

Tabela 16: Contagem direta de ascósporos/ascos (Câmara de Neubauer) das suspensões de *B.nivea* FRR 4421, *B.fulva* IOC 4518 e *B.nivea* ATCC 24008.

Cepa de Fungo	Contagem em Câmara de Neubauer (Ascósporos/ascos por mL)
<i>B.nivea</i> (FRR 4421)	$2,54 \times 10^8$
<i>B.fulva</i> (IOC 4518)	$3,4 \times 10^8$
<i>B.nivea</i> (ATCC 24008)	$3,9 \times 10^8$

5.6. Determinação da temperatura e tempo ótimos de ativação de ascósporos/ascos de *B.fulva* e *B.nivea*:

Ascósporos de fungos termoresistentes comumente mostram dormência, a qual é normalmente interrompida após choque térmico em temperaturas variando entre 60°C e 80°C (CASELLA et al., 1990). De acordo com o sumarizado por Tournas (1994), a faixa de ótima ativação de *Byssochlamys* spp encontra-se entre 70 e 80°C. Dentre as duas condições de temperatura (75°C e 80°C) avaliadas no presente estudo, pode-se observar,

que à 80°C (*Figura 20*), houve inativação térmica dos ascósporos a partir do primeiro tempo de exposição (5 min) com redução da contagem, comportamento que se repetiu com os demais tempos (até 35 min). No entanto, para a cepa de *B.fulva* IOC 4518, apesar de ter-se observado uma queda na contagem de ascósporos/ascos após 5 min de aquecimento, houve um aumento após o décimo minuto, com tendência estável na faixa de 10⁶ ascósporos/ascos por mL durante todo o tempo do choque de ativação (35 min). Este comportamento foi considerado como um indicativo de maior resistência térmica desta cepa, sendo este fato confirmado na etapa posterior do estudo (*item 5.8*).

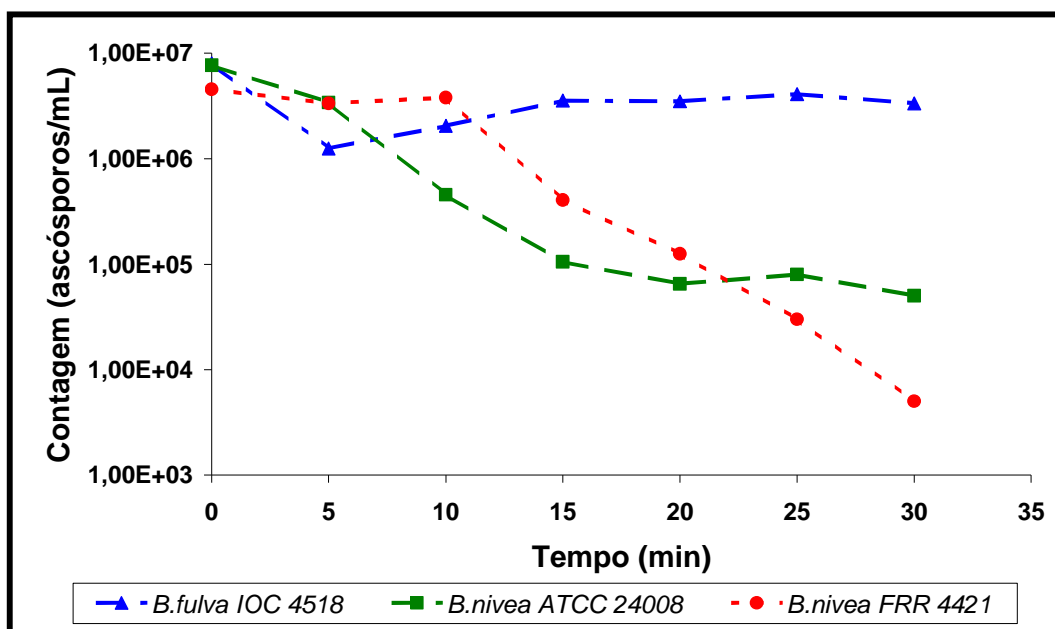


Figura 20: Curva tentativa de ativação de ascósporos de *B.fulva* IOC 4518, *B.nivea* ATCC 24008 e *B.nivea* FRR 4421 à 80°C.

Em virtude da queda das contagens de ascósporos/ascos observada à 80°C, reduziu-se à temperatura de ativação para 75°C na tentativa de se encontrar o binômio no qual maior porcentagem de recuperação de ascósporos germinados fosse obtida. Neste caso, tempos variando entre “0” à “30” minutos foram aplicados e como se pode observar na *Figura 21*, a ativação das três suspensões foi obtida. Para as cepas de *B.nivea* FRR

4421 e *B.nivea* ATCC 24008 um tempo ótimo de ativação de 20 minutos foi obtido, enquanto para *B.fulva* IOC 4518, este tempo igual de 5 minutos.

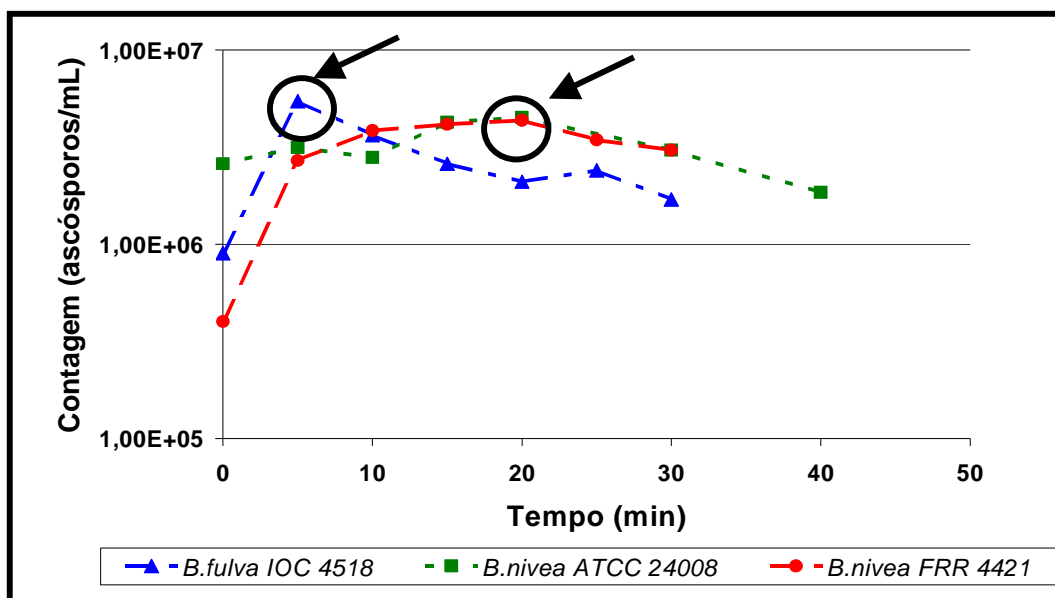


Figura 21: Curva de ativação de ascósporos de *B.fulva* IOC 4518, *B.nivea* ATCC 24008 e *B.nivea* FRR 4421 à 75°C.

Os valores das contagens (ascósporos/mL) após o choque ótimo de ativação à 75°C são mostrados na *Tabela 17*. Os dados aqui obtidos corroboram aos sumarizados por Tournas (1994) que descreve ser a temperatura ótima de ativação destes microrganismos compreendida na faixa de 70°C a 80°C. É importante enfatizar que para realização deste experimento todas as suspensões tiveram sua concentração ajustada para 10^6 ascósporos/mL.

Tabela 17: Contagem por plaqueamento em MEA das suspensões de *B.nivea* FRR 4421, *B.fulva* IOC 4518 e *B.nivea* ATCC 24008.

Cepa de Fungo	Contagem por Plaqueamento em MEA após choque ótimo de ativação (ascósporos e ascos por mL)
<i>B.nivea</i> (FRR 4421)	$2,4 \times 10^7$
<i>B.fulva</i> (IOC 4518)	$1,07 \times 10^7$
<i>B.nivea</i> (ATCC 24008)	$1,8 \times 10^7$

A importância da determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos de fungos termoresistentes está no fato destas serem usadas para obtenção da máxima germinação dos ascósporos quando da realização de estudos de determinação da resistência térmica. A contagem inicial (N_0) é utilizada para os cálculos de inativação térmica durante os períodos de tempo estudados e resultados reprodutíveis e confiáveis são extremamente dependentes da precisão na determinação da população inicial. Desta forma, a determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos de fungos termoresistentes deve sempre preceder os estudos de determinação de resistência térmica, visto que ela pode ser influenciada por diversos fatores, como a composição do meio de aquecimento, tipos de ácidos presentes ou pH da solução, entre outros (CASELLA *et al.*, 1990).

5.7. Determinação da capacidade de produção de patulina pelas cepas de *B.fulva* e *B.nivea*:

5.7.1. Produção da patulina por *Byssochlamys* spp:

A patulina é uma micotoxina produzida por aproximadamente 60 espécies de fungos pertencentes a mais de 30 diferentes gêneros (LAI *et al.*, 2000). Dentre estas, destacam-se espécies de *Penicillium* spp e de *Byssochlamys* spp. Os primeiros são importantes por serem produtores da podridão azul de frutas pomáceas (CHEN *et al.*, 2004) e os segundos por sua resistência térmica e capacidade de multiplicação sob baixas tensões de oxigênio (TANIWAKI *et al.*, 2001).

Estudos indicam que a produção da patulina por *Byssochlamys* spp já é detectável com 3 dias de incubação, dependendo da temperatura sob a qual o crescimento se dá (ROLAND *et al.*, 1984; PUEL *et al.*, 2007). O período no qual ocorre a máxima produção desta micotoxina pode variar de 7 à 21 dias, dependendo do microrganismo, substrato, espaço-livre na embalagem e temperatura de crescimento (RICE, 1980; ROLAND *et al.*, 1984; PUEL *et al.*, 2007), todavia, um período entre 10 e 14 dias é considerado adequado para se detectar a patulina (HOUBRAKEN *et al.*, 2006; DOMBRINK-KURTZMAND e ENGBERG, 2006). Como o objetivo desta parte da pesquisa foi determinar a capacidade de produção da patulina pelas três diferentes espécies de *Byssochlamys*, um período de 14 dias foi selecionado e considerado adequado para permitir que cepas com capacidade tardia de produção da patulina tivessem tempo suficiente para produzir a micotoxina e ao mesmo tempo, este período não foi extenso demais (por exemplo, 21 a 25 dias), de maneira a impedir a degradação da micotoxina, o que levaria a obtenção de falsos resultados negativos. Somer *et al.* (1974) sugeriram em seu estudo que a redução dos

níveis de patulina em caldo batata dextrose após se ter atingido um pico máximo, seria devido à sua destruição. Uma das responsáveis por esta destruição seria a enzima m-hidroxi-benzil álcool desidrogenase, que faz parte da rota biossintética da patulina e é uma enzima altamente reversível (FORRESTER e GAUCHER, 1972).

As três cepas de *Byssoschlamys* spp (*B.nivea* FRR 4421, *B.nivea* ATCC 24008 e *B.fulva* IOC 4518) avaliadas no presente estudo, mostraram capacidade de produção da patulina nos sucos de maçã. A produção desta micotoxina variou ($p < 0,05$) de acordo com a cepa, tipo de suco, tipo de embalagem e temperatura de incubação (*Figuras 22 e 23*). Maior variação na produção de patulina ($p < 0,05$) se deu quando o crescimento dos fungos ocorreu à 21°C em comparação à 30°C.

À 21°C todas as cepas foram capazes de produzir a patulina nos dois tipos de embalagens (PET e cartonada) e nos dois tipos de sucos (clarificado e não clarificado) (*Figura 22*). Nesta temperatura, o suco de maçã clarificado embalado em garrafa PET foi o melhor substrato para produção da patulina independente da cepa de *Byssoschlamys* spp ($p < 0,05$). Para o suco não clarificado embalado em garrafa PET, *B.nivea* ATCC 24008 foi maior produtor de patulina (143,5 ppb) ($p < 0,05$), enquanto que no suco não clarificado embalado em embalagens cartonadas, a produção da micotoxina não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre nenhuma das cepas estudadas. No entanto, pôde-se observar que a produção da micotoxina por *B.nivea* ATCC 24008 no suco não clarificado embalado em embalagem cartonada, foi sensivelmente reduzida (22,7 ppb) se comparada às quantidades produzidas nos sucos clarificado (146,5 ppb) e não clarificado (143,5 ppb) embalados em garrafas PET, demonstrando influência do ambiente interno da embalagem na produção de patulina e maior dependência desta cepa com relação aos níveis residuais de oxigênio nas embalagens para sua produção.

A produção de biomassa (peso seco micelial) não apresentou diferença ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$) entre nenhuma das cepas, tipos de sucos, tipos de embalagem tanto para a temperatura de incubação 21°C quanto para a de 30°C (Figuras 24 e 25). Também não houve correlação para todas as cepas com relação à produção de patulina e produção de biomassa. Todavia, valores médios de biomassa de 0,028 g/400 mL de suco de maçã não clarificado embalado em embalagem cartonada foram produzidos à 21°C, enquanto nos sucos clarificado e não clarificado incubados à esta mesma temperatura valores médios de biomassa de 0,06 e 0,062 g/400 mL foram produzidos, respectivamente. Este fato demonstra que a multiplicação dos fungos (*Byssoschlamys* spp) à 21°C na embalagem cartonada é limitada. Já à 30°C a produção média de biomassa ficou entre 0,17 g/400 mL para os sucos não clarificado embalados em garrafas PET e embalagem cartonada e 0,22 g/400 mL para o suco clarificado embalado em garrafas PET. Estes resultados corroboram os encontrados por Roland e Beuchat (1984a), Rice *et al.*, (1977), Roland *et al.* (1984), os quais reportaram que a produção de biomassa por *B.nivea* e *B.fulva* em sucos de uva e maçã é diretamente proporcional à temperatura, com maiores quantidades sendo produzidas em temperaturas próximas aos 30°C e menores em temperaturas próximas aos 21°C ou 18°C.

A produção de biomassa à 30°C (Figura 25) pelas cepas de *B.nivea* ATCC 24008 e FRR 4421 inoculadas no suco não clarificado embalado em embalagem cartonada comprovam capacidade de multiplicação do fungo, no entanto, inabilidade de produção da patulina no ambiente encontrado dentro destas embalagens. Desta forma, pode-se concluir que a produção de patulina pelas cepas de *B.nivea* utilizadas no presente estudo se vê afetada pela atmosfera dentro das embalagens, particularmente devido à diferença de espaço-livre entre as embalagens cartonadas (nas quais o espaço não deve existir ou

é mínimo) e as garrafas PET (nas quais um espaço-livre de 4 cm da altura da garrafa a partir do topo, foi deixado em virtude do volume de suco adicionado nas embalagens). Outra consideração que deve ser feita é com relação à permeabilidade ao oxigênio das embalagens. Enquanto as garrafas PET apresentaram uma permeabilidade ao oxigênio de 0,05cc/embalagem.dia.atm, as embalagens cartonadas apresentaram permeabilidade de 0,0021cc/embalagem.dia.atm. De fato, Rice (1980) reportou que a produção de patulina por *Byssochlamys* pode ser afetada pelo espaço-livre presente nas embalagens onde o fungo cresce e que ela parece ser dependente da cepa em estudo. Em seu estudo, o autor observou que maior produção de patulina ocorreu quando maior espaço-livre (5,1 cm) esteve presente nas embalagens do que quando estes foram de 2,5 cm ou 1,3 cm, respectivamente. Desta forma, o reduzido espaço livre presente nas embalagens cartonadas em comparação ao das embalagens PET, pode explicar em parte a menor produção de patulina nestas últimas embalagens. Todavia a existência de cepas com variada capacidade de produção da micotoxina não permite assegurar que o ambiente encontrado dentro das embalagens influencie por si só a produção da patulina. Assim, a diversidade entre as cepas com relação ao aparato metabólico, capacidade de multiplicação sob maiores ou menores tensões de oxigênio e produção da patulina sob estas condições, é o fator mais importante a ser considerado.

No presente estudo, observou-se que o crescimento das cepas de *Byssochlamys* foi caracterizado pelo desenvolvimento do micélio no fundo da embalagem (menor tensão de oxigênio), com posterior dispersão pela embalagem até atingir a superfície após 10 a 14 dias após a inoculação, confirmando a tendência microaerofílica destas espécies. Nas embalagens cartonadas, um fato interessante ocorreu, com o crescimento se dando no fundo das embalagens, no entanto, grande concentração de micélio ficando aderida a

junção da solda transversal inferior. O motivo pelo qual estes fungos ficaram mais aderidos a esta região deve ser investigado, no entanto, pode ser um mecanismo de fixação, já que nesta área há a dobra da solda com uma parte que permite sua fixação.

Com relação à produção de patulina à 30°C (*Figura 23*) pôde-se observar que todas as três cepas foram capazes de produzir a patulina no suco clarificado e não clarificado embalado em garrafas PET, com quantidades superiores no primeiro. *B.fulva* IOC 4518 destacou-se como maior produtor de patulina, sendo detectados até 212,5 ppb no suco clarificado embalado em garrafa PET e 153,5 ppb no suco não clarificado embalado em embalagem cartonada. *B.nivea* FRR 4421 produziu até 94,5 ppb de patulina no suco não clarificado embalado em garrafa PET. É relevante se ressaltar que nesta temperatura de incubação, somente a cepa *B.fulva* IOC 4518 foi capaz de produzir a patulina e em níveis elevados (153,5 ppb) demonstrando alta potencialidade de produção desta micotoxina nestas condições e reforçando a variabilidade entre as cepas de *Byssochlamys* com relação à sua capacidade de produção de patulina e aos fatores que a influenciam.

A maior produção de patulina no suco clarificado pode estar associada a diferenças nos substratos disponíveis para a metabolização da micotoxina. Damaglou, Campbell e Button (1985) reportaram que a produção de patulina se vê afetada pelo tamanho das moléculas de carboidratos presentes no substrato, com redução na produção da micotoxina ocorrendo com a medida que há o aumento do comprimento da cadeia da molécula. Assim, como moléculas grandes fontes de carboidratos (por ex., como a pectina) estão presentes no suco de maçã não clarificado, esta pode ser uma explicação para as menores quantidades médias de patulina encontradas neste suco em comparação ao suco clarificado. Outra possibilidade é a ligação da micotoxina à proteínas

presentes em maior quantidade no suco não clarificado com a formação de adutos, levando a uma subestimação da detecção da micotoxina (BAERT et al., 2007).

Nas Figuras 26 a 29 são apresentadas as variações do pH e teor de sólidos solúveis durante o crescimento de *B.fulva* e *B.nivea* em diferentes tipos de suco de maçã e de embalagens à 21°C e 30°C. As variações nos valores de pH e teor de sólidos solúveis corresponderam à extensão da acumulação de biomassa, corroborando os dados reportados por Roland et al. (1984), Roland and Beuchat (1984a) e Rice (1980). Pôde-se observar que independente da cepa estudada e temperatura de incubação, sempre houve queda sensível no teor de sólidos solúveis e valor de pH dos sucos. Maiores espectros de variação de queda do pH e teor de sólidos foram observados quando o crescimento dos fungos ocorreu à 30°C, indicando metabolismo mais ativo, com maior consumo de açúcares e substratos presentes no suco do que quando o crescimento se deu à 21°C. Pequenas variações no pH (de até 0,3 unidades) conforme as observadas neste estudo indicam que as cepas de *Byssochlamys* utilizaram preferencialmente açúcares como fonte de energia durante sua multiplicação e não os ácidos orgânicos, caso em que maiores variações seriam observadas (Roland et al., 1984). Sensíveis aumentos nos valores de pH (de até 0,05 unidades) observados em alguns pontos podem ser explicados pela produção de pequenas quantidades de amônia pelas cepas de *Byssochlamys* (Roland e Beuchat, 1984a). No entanto, conforme reportado por estes autores, aumentos nos valores de pH somente ocorrem com 10 e 15 dias de inoculação, atingindo um valor máximo aos 25 dias. Normalmente nos substratos dos quais se recuperam altas quantidades de patulina, possuem valores de pH entre 4 e 5 e naqueles onde a recuperação desta micotoxina é menor ou não ocorre, valores maiores de pH são observados (DOMBRINK-KURTSMAN e ENGBERG, 2006). Desta forma, pode-se afirmar

com segurança que fatores como a atmosfera presente dentro das embalagens e/ou à temperatura de incubação influenciaram a produção da patulina por *Byssochlamys* spp nos sucos de maçã inoculados.

A partir dos resultados aqui apresentados, pode-se concluir que quando a estocagem dos sucos se deu à 30°C, *B.fulva* IOC se destacou como maior produtor de patulina, enquanto que as cepas de *B.nivea* (FRR 4421 e ATCC 24008) se destacaram como maiores produtoras desta micotoxina à 21°C.

Apesar das cepas de *B.nivea* apresentarem maior potencial de produção da patulina do que as cepas de *B.fulva* deve-se levar em conta que a incidência de uma ou outra espécie pode variar de região para região e também devido a condições não bem conhecidas (JESENSKÁ, PIECKOVÁ e BERNÁT, 1992; TOURNAS, 1994). Além disso, o fato das cepas de *B.fulva* apresentarem resistência térmica marginalmente superior que as cepas de *B.nivea*, lhes conferindo habilidade para sobreviver ao processamento térmico (BEUCHAT e RICE, 1979, TOURNAS, 1994), deve ser considerado de maneira a não se afirmar que uma das duas cepas é mais relevante para a segurança dos sucos de maçã pasteurizados. De fato, o controle da contaminação e incidência destes fungos nos produtos finais deve ser sempre focado nos dois microrganismos.

Adicionalmente, a pequena variação nos valores de pH e do teor de sólidos solúveis, a pequena produção de biomassa e elevada produção de patulina nos sucos de maçã indicam potencial capacidade de produção da patulina por *Byssochlamys* spp nos sucos após a etapa de pasteurização (considerando-se as condições de temperatura e carga de esporos sobreviventes aqui estudadas) sem que necessariamente alterações visuais da embalagem (principalmente as cartonadas) ou do produto sejam notadas pelo consumidor em até 10 dias após o processamento do produto. Este fato indica grande risco à saúde

dos consumidores visto que a patulina pode apresentar efeitos agudos ou crônicos (MAHFOUD *et al.*, 2002; WICHMANN *et al.*, 2002) e desta forma, grande atenção deve ser dada às etapas nas quais a aplicação de medidas de controle (recepção das frutas, seleção e lavagem das frutas e filtração do suco com terra diatomácea) que podem reduzir o risco de produção de patulina através da eliminação dos esporos de *Byssochlamys* presentes nas frutas.

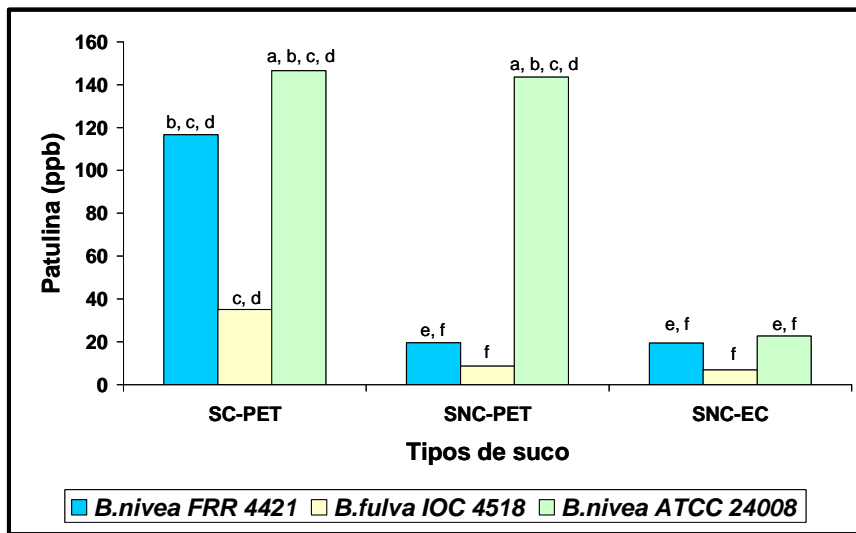


Figura 22: Produção de patulina por *Byssochlamys spp* em diferentes tipos de suco de maçã em embalagens PET e cartonada à 21°C*.

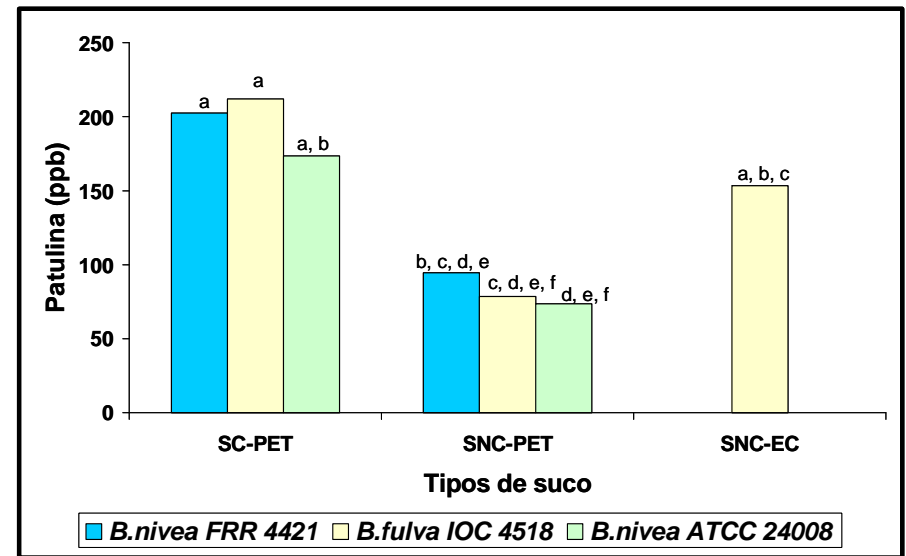


Figura 23: Produção de patulina por *Byssochlamys spp* em diferentes tipos de suco de maçã em embalagens PET e cartonada à 30°C*.

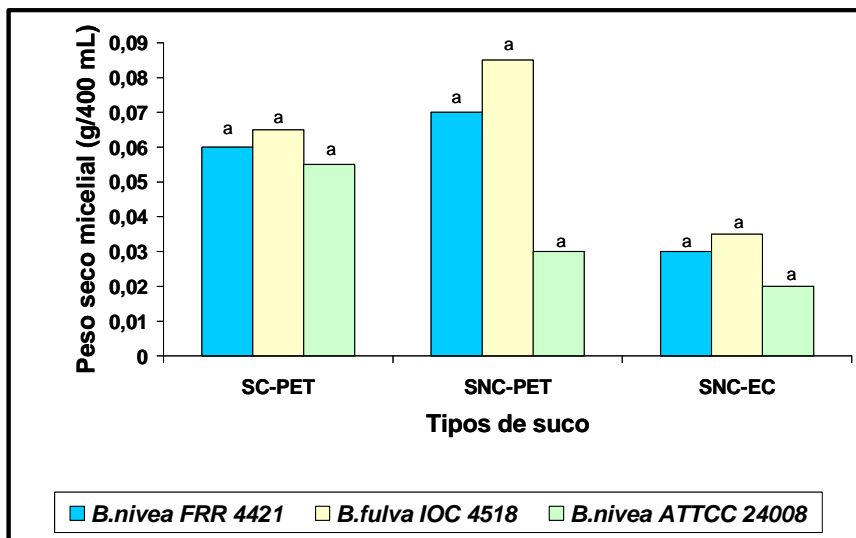


Figura 24: Produção de biomassa por *Byssochlamys spp* em diferentes tipos de suco de maçã em embalagens PET e cartonada à 21°C*.

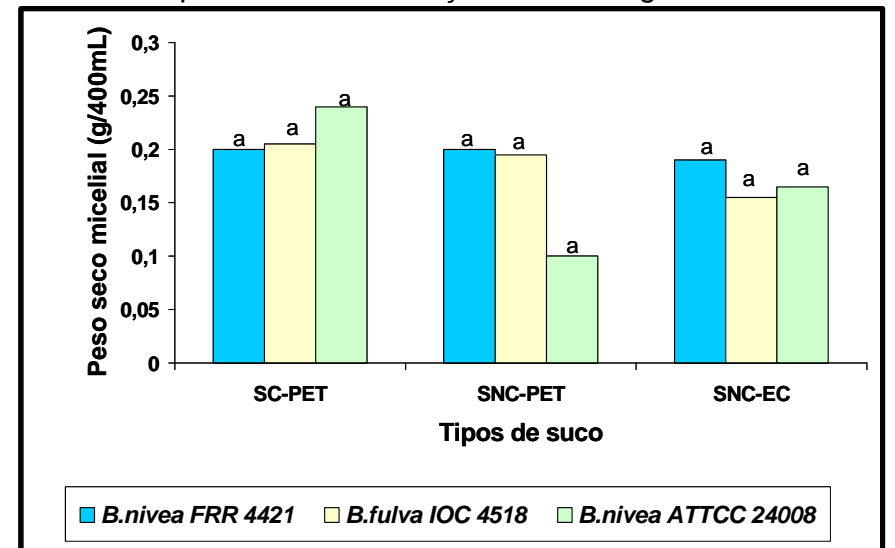


Figura 25: Produção de biomassa por *Byssochlamys spp* em diferentes tipos de suco de maçã em embalagens PET e cartonada à 30°C*.

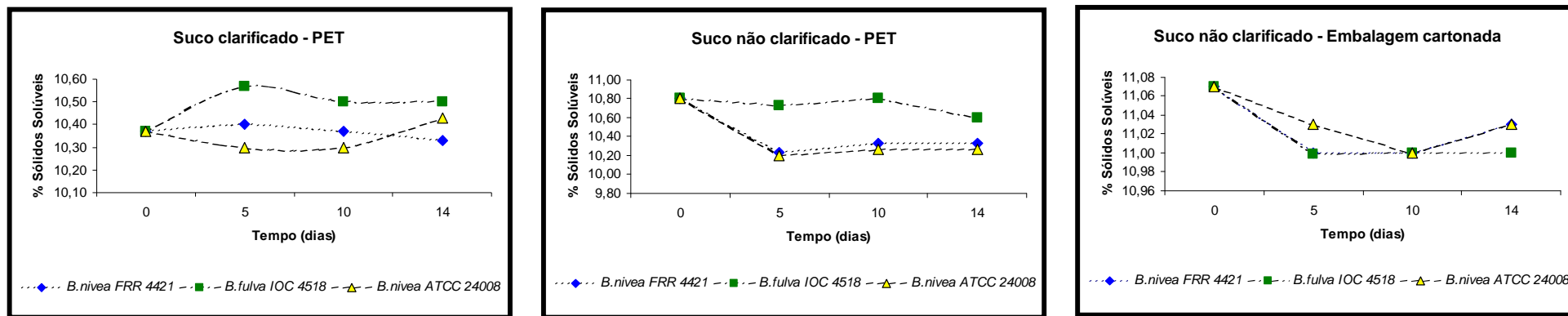


Figura 26: Variação na porcentagem de Sólidos Solúveis (°Brix) em diferentes sucos inoculados com *Byssochlamys spp* e incubados à 21°C.

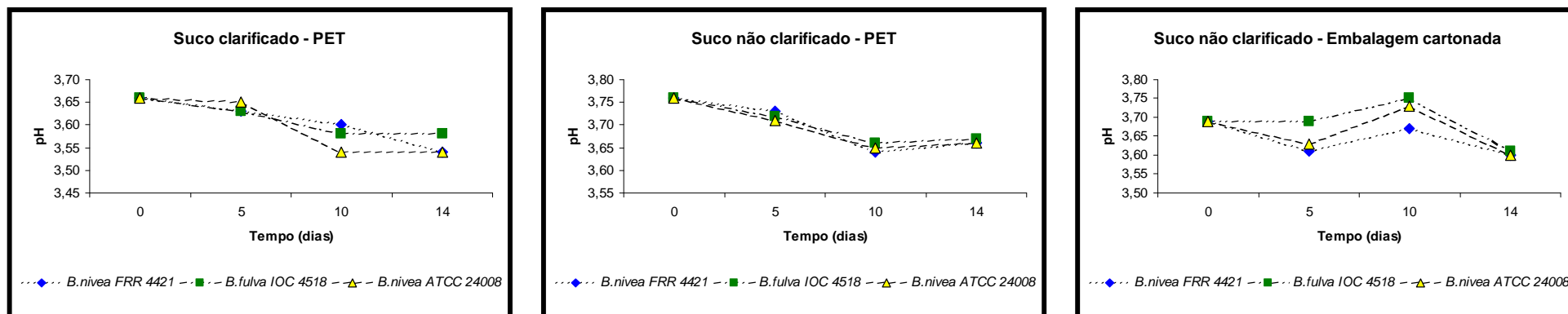


Figura 27: Variação de pH em diferentes sucos inoculados com *Byssochlamys spp* e incubados à 21°C.

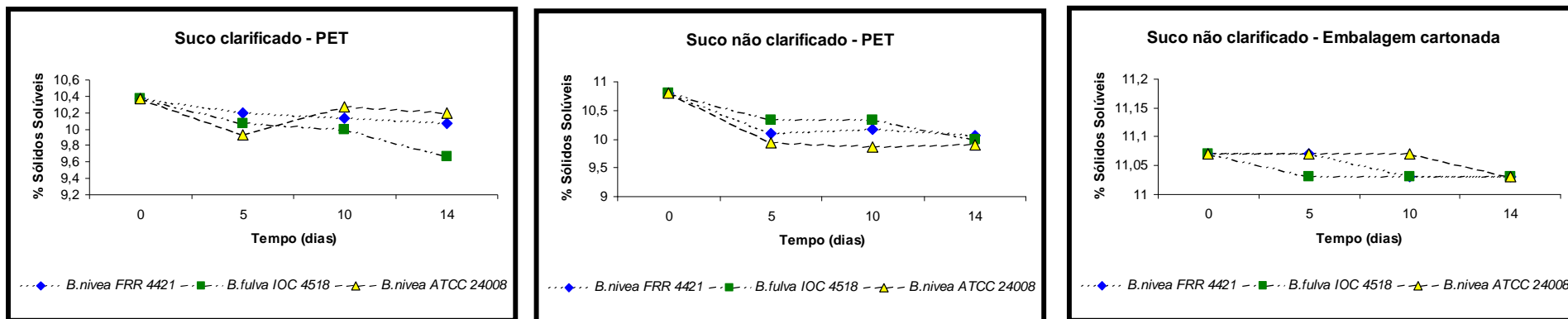


Figura 28: Variação na porcentagem de Sólidos Solúveis (°Brix) em diferentes sucos inoculados com *Byssochlamys spp* e incubados à 30°C.

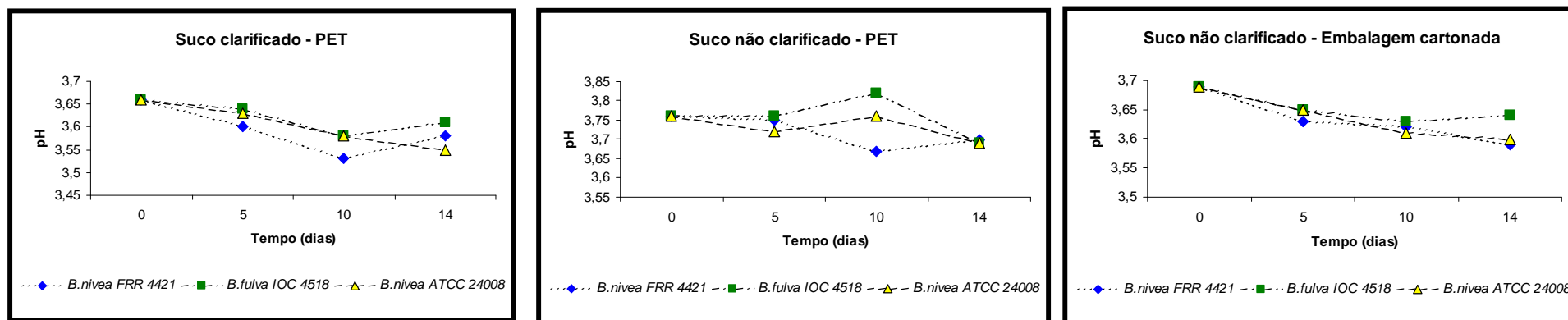


Figura 29: Variação de pH em diferentes sucos inoculados com *Byssochlamys spp* e incubados à 30°C.

Nas Figuras 30, 31 e 32, respectivamente, são apresentados os perfis cromatográficos (em mAU x tempo de retenção) para detecção de patulina na amostra controle (suco utilizado nos experimentos), solução padrão (suco de maçã inoculado com 0,5 µg/Kg de patulina) e em uma amostra de suco de maçã, utilizando-se detector de fluorescência (λ 276 nm).

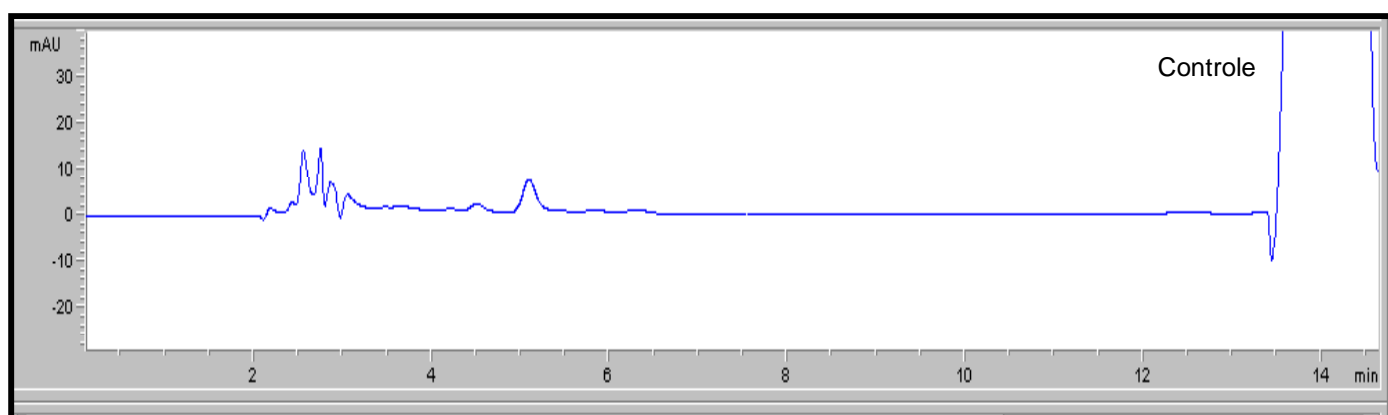


Figura 30: Perfil cromatográfico (HPLC) da amostra controle de suco de maçã obtido usando-se detector de UV (λ =276nm).

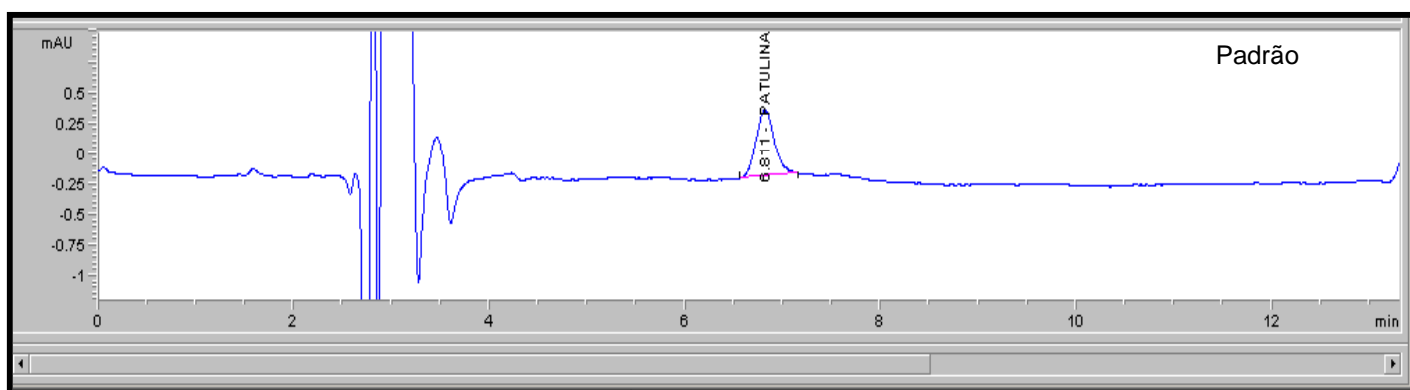


Figura 31: Perfil cromatográfico (HPLC) mostrando o pico do padrão de patulina obtido usando-se detector de UV (λ =276nm). O pico refere-se à solução padrão (suco de maçã), inoculada com 0,5µg/mL de patulina.

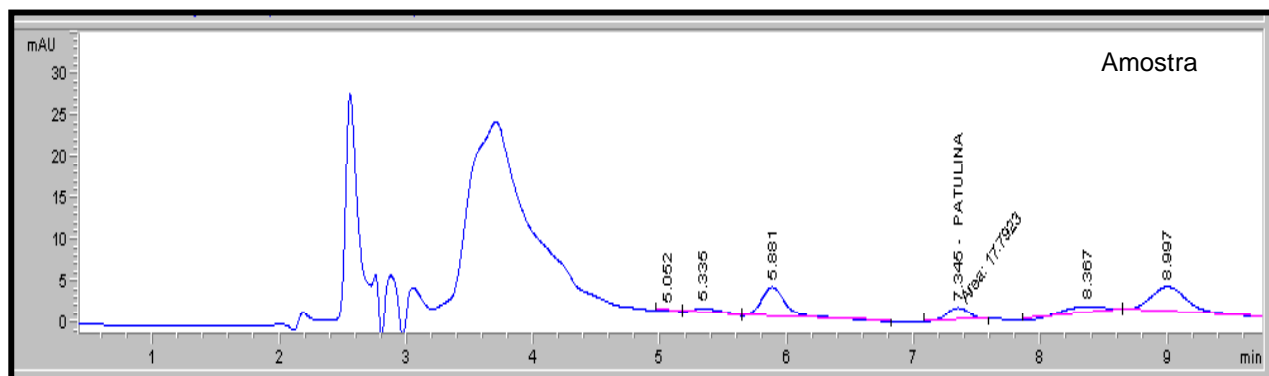


Figura 32: Perfil cromatográfico (HPLC) mostrando o pico de patulina (211µg/Kg) obtido usando-se detector de UV ($\lambda=276\text{nm}$) para a amostra de suco clarificado de maçã em garrafa PET inoculado com *B.fulva* IOC 4518 após 14 de incubação à 30°C.

Como pode ser observado no perfil cromatográfico representado pela *Figura 30*, a amostra controle de suco clarificado de maçã utilizada para a realização dos experimentos apresentou-se livre de patulina (<0,5µg/Kg – limite de detecção do método), sendo assegurado que a patulina presente nas amostras de suco de maçã foi produzida pelas espécies de *Byssochlamys* inoculadas.

Conforme já revisado, existe certa controvérsia em torno da capacidade de cepas de *B.fulva* produzirem a patulina (RICE, BEUCHAT e WORTHINGTON, 1977; RICE, 1980; DOMBRINK e ENGBERG, 2006; HOUBRAKEN, SAMSON e FRISVAD, 2006; PUEL et al. 2007). Desta forma, houve a necessidade de se confirmar o pico cromatográfico obtido para uma amostra na qual se suspeitava da presença de patulina.

5.7.2- Confirmação do pico cromatográfico da patulina produzida por *B.fulva* IOC 4518:

Na *Figura 33* é mostrada a análise espectral 3D da patulina feita através do software ChemStation® realizando a varredura de arranjo de diodos (DAD).

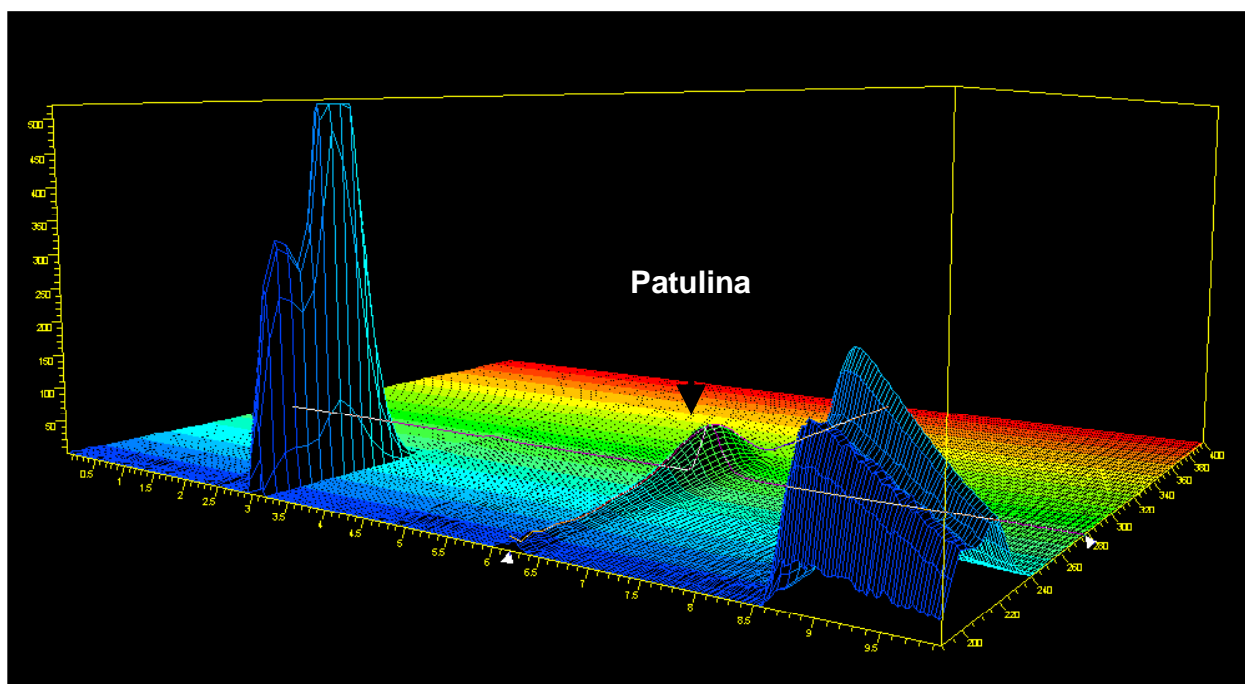


Figura 33: Análise espectral 3D da patulina através do programa HP com software ChemStation® e varredura de arranjo de diodos (DAD), onde eixo X= tempo de retenção (min), eixo Y= comprimento de onda de maior intensidade (nm) e eixo Z= intensidade do sinal.

Através da análise espectral por comparação entre o padrão da patulina através da biblioteca espectral com a amostra suspeita, pôde-se observar que os espectros do padrão de patulina e da amostra suspeita foram semelhantes, e um match de 795.026 foi obtido. Assim, existe 79,5% de chance da amostra suspeita ser a mesma que o padrão.

Além disso, os picos cromatográficos foram confirmados em diferentes comprimentos de onda por DAD ($\lambda = 270, 276$ e 280nm) e por UV ($\lambda = 280\text{nm}$), onde “norm” significa espectro de normalização. Nas Figuras 34 a 39 são apresentados os perfis cromatográficos para o padrão de patulina ($1,2\mu\text{g/mL}$) e para a amostra 14592, inoculada com *B.fulva* IOC 4518.

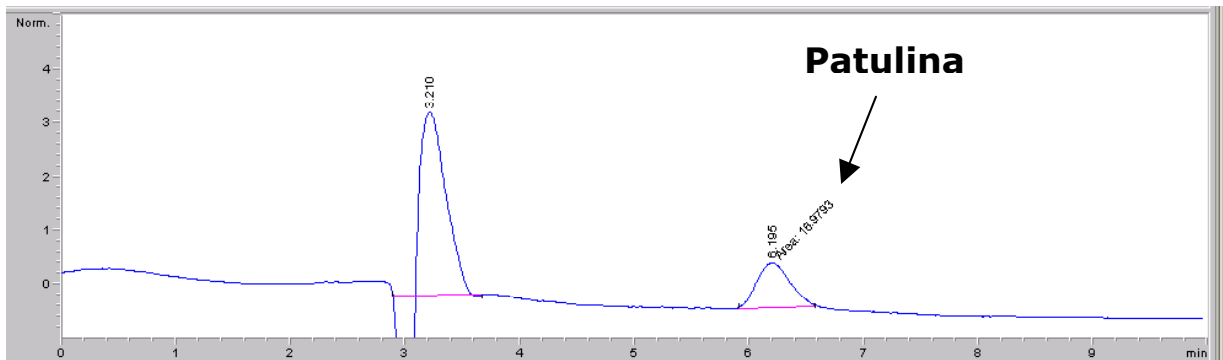


Figura 34: Perfil cromatográfico do padrão de patulina (1,2μg/mL) ($\lambda=270\text{nm}$ – DAD).

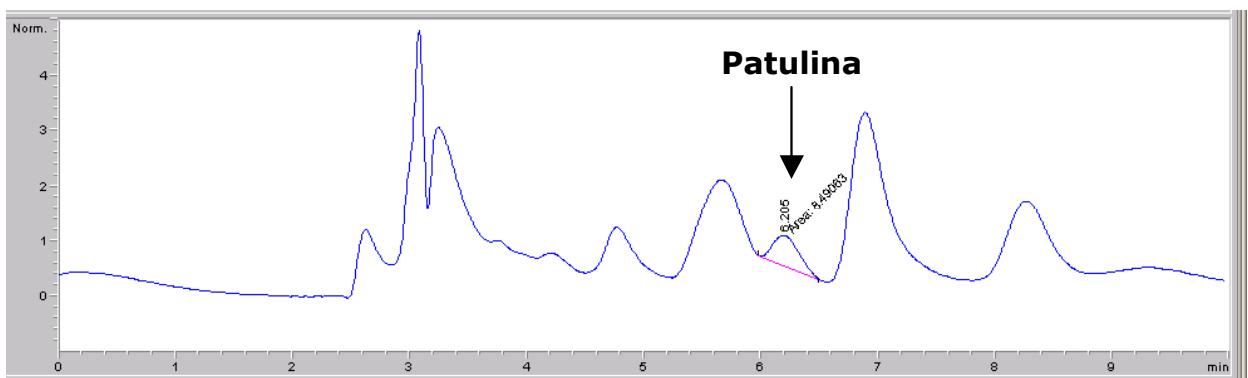


Figura 35: Perfil cromatográfico da amostra 14592 ($\lambda=270\text{nm}$ – DAD).

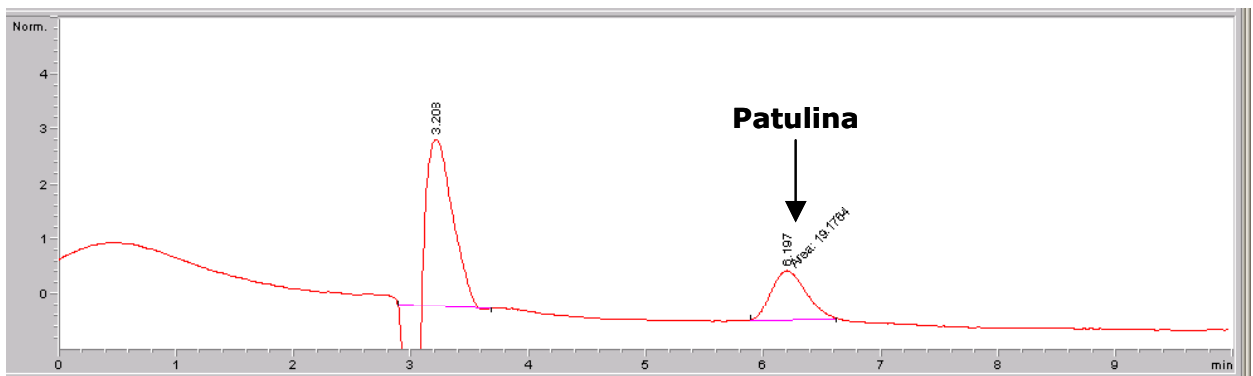


Figura 36: Perfil cromatográfico do padrão de patulina (1,2μg/mL) ($\lambda=276\text{nm}$ – DAD).

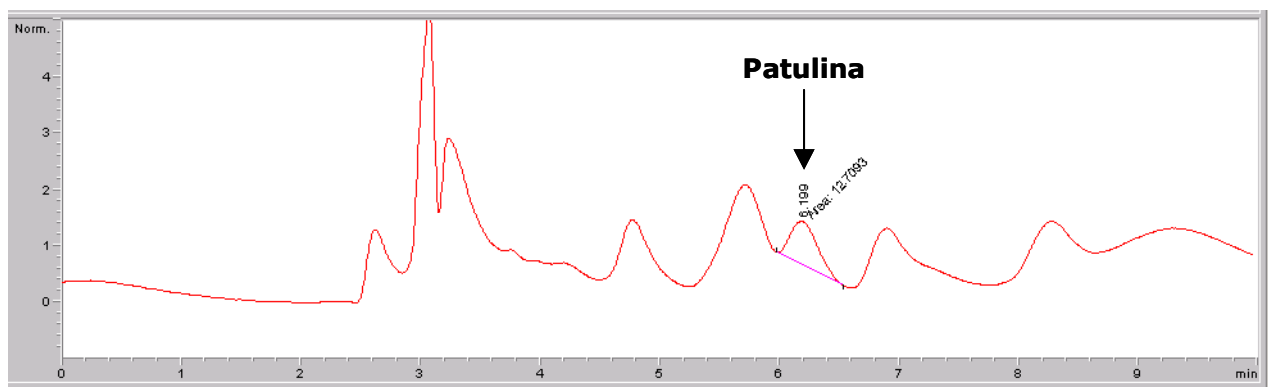


Figura 37: Perfil cromatográfico da amostra 14592 ($\lambda=276\text{nm}$ – DAD).

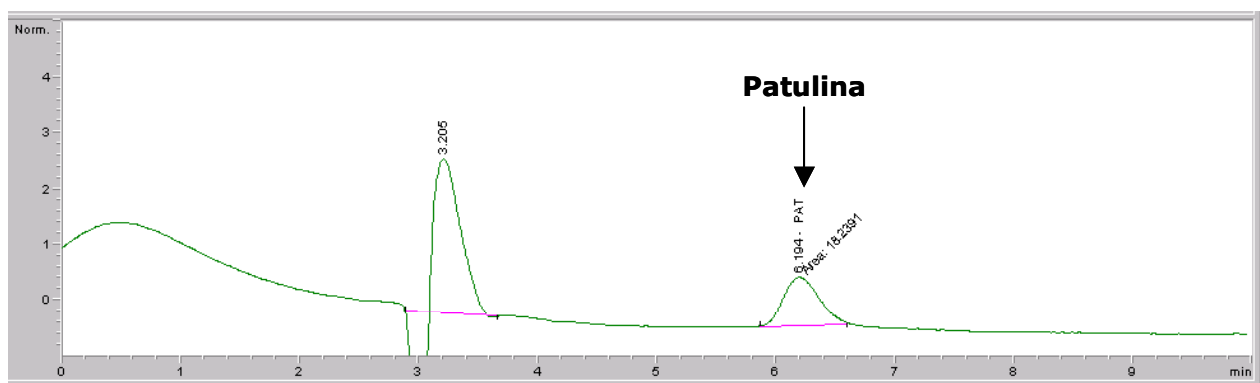


Figura 38: Perfil cromatográfico do padrão de patulina (1,2 $\mu\text{g/mL}$) ($\lambda=280\text{nm}$ – DAD).

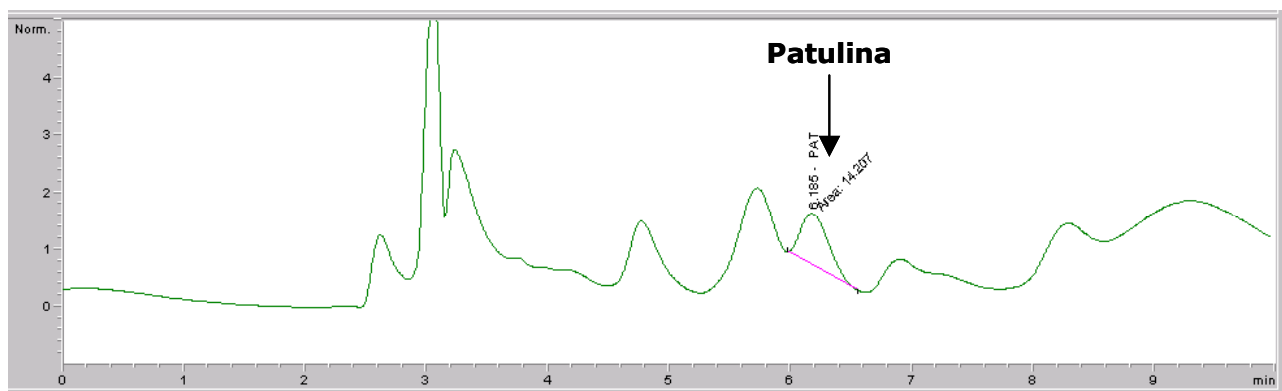


Figura 39: Perfil cromatográfico da amostra 14592 ($\lambda=280\text{nm}$ – DAD).

Nas Figuras 40 e 41 são apresentados os perfis cromatográficos para o padrão de patulina e para a amostra 14592, inoculada com *B.fulva* IOC 4518.

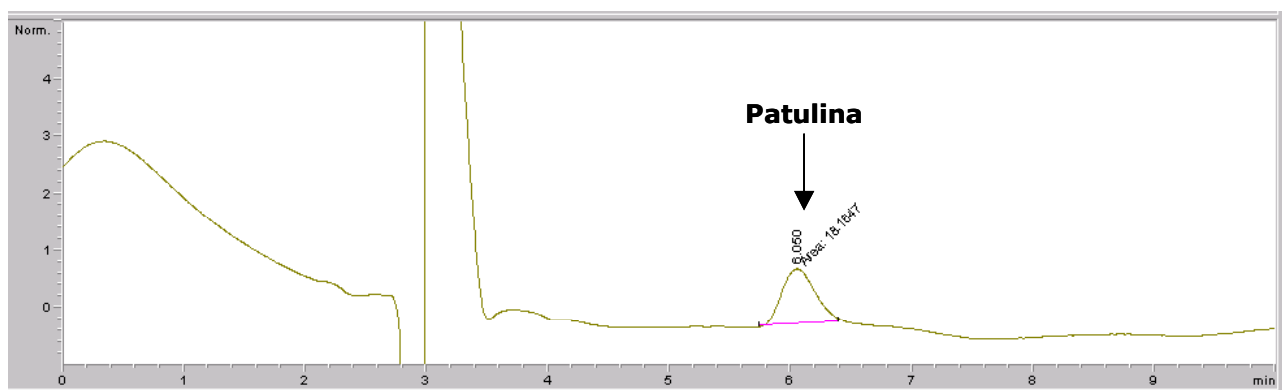


Figura 40: Perfil cromatográfico do padrão de patulina (1,2µg/mL) ($\lambda=280\text{nm}$ – UV).

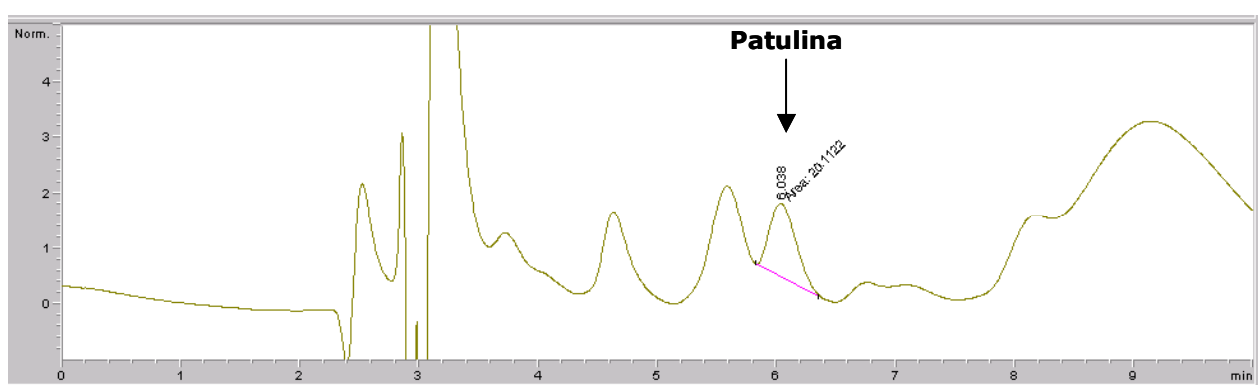


Figura 41: Perfil cromatográfico da amostra 14592 ($\lambda=280\text{nm}$ – UV).

Como o espectro da amostra suspeita (match de 795.026 ou 79,5% de chance) assemelhou-se ao do padrão de patulina e juntamente com os dados mostrados nos perfis cromatográficos de diferentes comprimentos de onda e detectores (DAD e UV) (*Figuras 34 à 41*) para o padrão de patulina e para a amostra 14592, pode-se afirmar que se trata da patulina.

Desta forma, não é possível afirmar que cepas de *B.fulva* não são capazes de produzirem patulina, conforme reportado por Puel *et al.* (2007), em virtude da inúmera diversidade genética que pode ocorrer entre as cepas deste microrganismo isoladas a partir de diferentes substratos e sob diferentes condições ao redor do mundo. O que se pode afirmar com certeza é que cepas de *B.nivea* são

preferencialmente maiores produtoras de patulina do que as de *B.fulva*. Assim, mais estudos relacionados à diversidade de cepas de *B.fulva* em produzir a patulina devem ser realizados, levando-se em conta que para que afirmações mais seguras sejam feitas, um grande número de cepas deve ser avaliado e que estas cepas tenham origens variadas (solo, frutas, produtos termoprocessados de frutas), visto que o ambiente de isolamento pode influenciar na apresentação de determinada propriedade por estes microrganismos.

5.8. Determinação da cepa de *B.fulva* e *B.nivea* mais termoresistente:

A partir de uma concentração inicial de 10^6 ascósporos/mL pôde-se observar que as cepas de *Byssochlamys* apresentaram capacidade variada para resistir aos binômios tempo e temperatura aplicados (*Tabela 18*). Dentre as cepas estudadas, *B.nivea* FRR 4421 apresentou a menor capacidade de sobrevivência ao aquecimento, com sua população inicial (10^6 ascósporos/mL) sendo eliminada após o choque térmico de 85°C/15 min, mas sobrevivendo ao choque de 80°C/20min. A cepa *B.nivea* ATCC 24008 foi a segunda menos termoresistente, com sua população inicial sendo eliminada por completo após choque térmico de 90°C/10 min, mas sobrevivendo ao choque de 90°C/5min. *B.fulva* IOC 4518 foi a cepa de *Byssochlamys* mais termoresistente, somente tendo sua população inicial eliminada após aquecimento à 100°C/5 min, mas sobrevivendo ao choque de 95°C/5min. Os dados desta pesquisa corroboram com os resultados reportados por Bayne e Michener (1979), os quais relataram resistência térmica marginalmente superior das cepas de *B.fulva* frente às cepas de *B.nivea*. No entanto, o histórico da cepa e sua

origem, podem também ser fatores a influenciar na maior resistência térmica de fungos isolados de países com temperaturas médias mais elevadas em comparação àqueles isolados de países com clima mais ameno.

Tabela 18: Determinação da cepa de *B.nivea* / *B.fulva* produtora de patulina mais termoresistente*

Cepa	80°C/ 20 min	85°C/ 15 min	90°C/ 5 min	90°C/ 10 min	95°C/ 5 min	100°C/ 5 min	105°C/ 3 min	110°C/ 3 min
<i>B. nivea</i> (FRR 4401)	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. fulva</i> (IOC 4518)	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. nivea</i> (ATCC 24008)	+	+	+	-	-	-	-	-

*+ Sobrevivência ao binômio aplicado; - Morte ao binômio aplicado.

Como o solo é a principal fonte de contaminação por estes microrganismos (PITT e HOCKING, 1999), o histórico de temperatura do ambiente pode levar a adaptação e sobrevivência das espécies mais termoresistentes em detrimento às mais termosensíveis. Na indústria, o tratamento térmico acaba selecionando as cepas de maior termoresistência, e estas podem ser as prováveis responsáveis pela deterioração e produção de micotoxinas nos sucos contaminados por estes microrganismos.

A aplicação de choques térmicos sucessivos é uma estratégia largamente empregue para se selecionar a espécie de fungo mais termoresistente dentre diversos isolados, para posterior determinação de sua resistência térmica (valores D e Z) e identificação. Baglioni (1998) aplicou choques sucessivos que variaram de 80°C/20 min a 100°C/25 min com o intuito de selecionar o isolado mais

termoresistente dentre 50 espécies de fungos isolados a partir da análise de bolores termoresistentes realizada em amostras coletadas durante o processo de fabricação de extrato de tomate. Das 50 cepas isoladas, 82% resistiram ao menor choque (80°C/20 min), enquanto três isolados (6%) resistiram até o choque de 100°C/25 min e foram identificados como *Neosartorya fischeri*. Posteriormente, o autor determinou a resistência térmica do isolado. Marcolino (2003) isolou 25 cepas de bolores termoresistentes a partir de uma linha de processamento asséptico de bebida de uva e as submeteu a choques térmicos sucessivos variando entre 85°C/15 min e 100°C/55 min, para neste último binômio selecionar a cepa mais termoresistente (*Neosartorya fischeri*). Salomão (2002) isolou 21 cepas de fungos a partir de diversas etapas do processamento de néctar de maçã, polpa de morango congelada e suco de morango. Tanto dentre as etapas de processamento de néctar de maçã, quanto dentre as amostras de polpa de morango congelada e suco de morango analisadas, cepas de *B.fulva* e *N.fischeri*, foram isoladas como as mais termoresistentes, sobrevivendo ao choque térmico de 95°C por até 20 min e demonstrando a ampla incidência destes fungos e sua capacidade de sobreviver a diferentes binômios de tempo e temperatura de aquecimento.

5.9. Determinação da resistência térmica da cepa de *Byssochlamys spp* produtora de patulina e mais termoresistente:

Na *Figura 42* são mostradas as curvas de sobreviventes de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix às temperaturas de 85°C, 90°C, 92°C e 95°C. Como se pode observar, todas as curvas são caracterizadas por comportamento não linear com a presença de ombro seguido de queda rápida nas contagens de

sobreviventes. À 85°C um ombro prolongado foi observado até o 60º minuto de aquecimento, seguindo-se uma rápida queda da população de sobreviventes até o 100º minuto. À 90°C, o ombro foi observado até sétimo minuto, a partir do qual houve uma queda rápida até o décimo oitavo minuto. À 92°C, um ombro prolongado foi observado até 200 s, seguido de uma queda rápida até 340 s. Já a 95°C, o ombro foi observado até 120 s, onde a população de sobreviventes era de $4,5 \times 10^5$ esporos/mL e foi seguida por uma queda extremamente rápida na população de sobreviventes (10^0 esporos/mL) no tempo de 170 s. Apesar da redução do tamanho do ombro com o aumento da temperatura, a tendência a linearização somente foi observada à 95°C com tempo maior do que 150 s. Casella *et al.* (1990), que trabalhou com *B.nivea* reportou que com o aumento da temperatura houve uma tendência a linearização da curva de sobreviventes, principalmente em faixa próxima a 90°C.

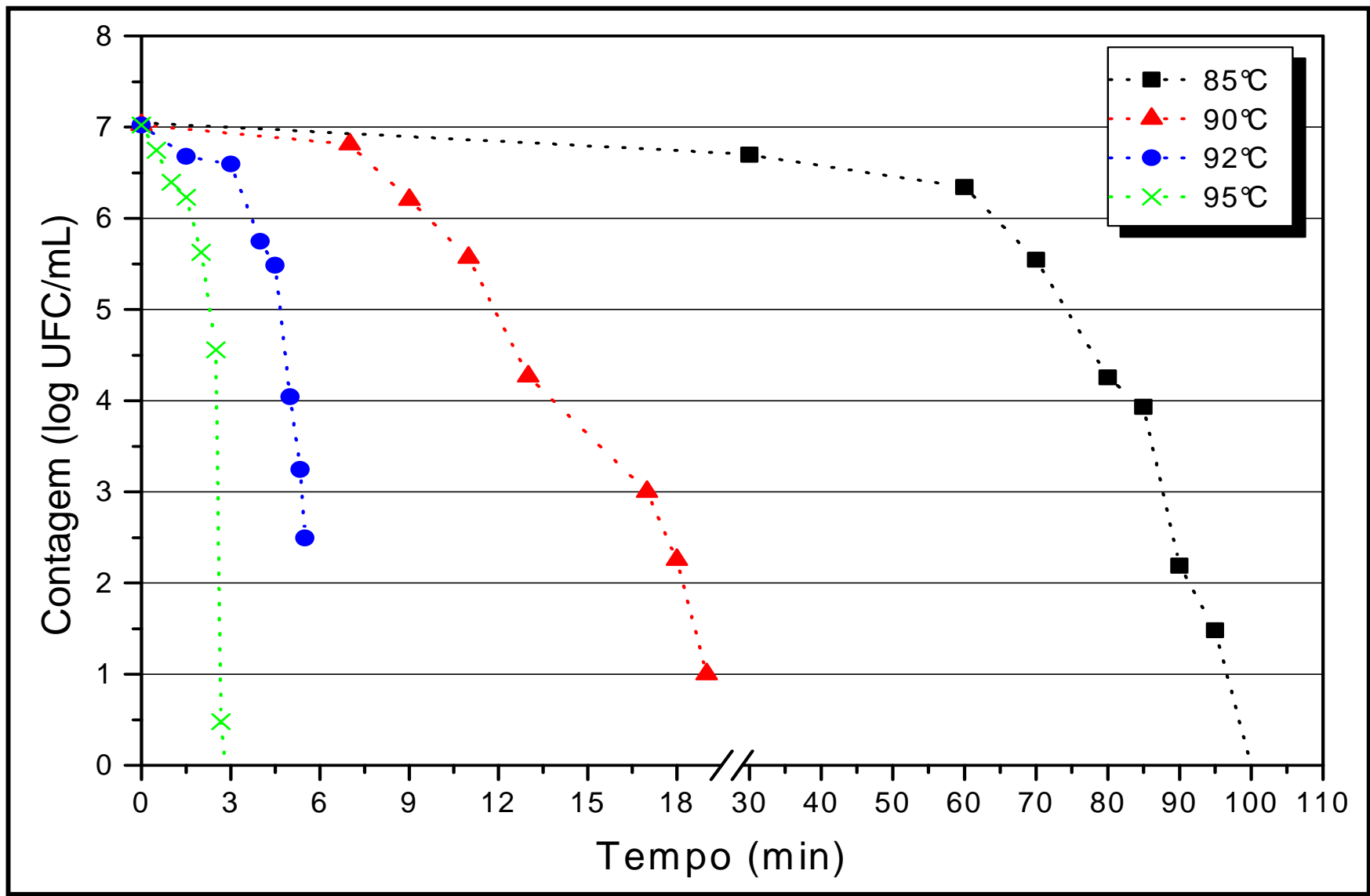


Figura 42. Curvas experimentais de sobreviventes de *B. fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C.

Devido ao comportamento não linear da curva de sobreviventes, utilizou-se a abordagem de Alderton e Snell (1970) para a linearização dos dados. Na *Figura 43* é mostrada a equação da reta e o valor do coeficiente de correlação para determinação do valor de “a” à 85°C.

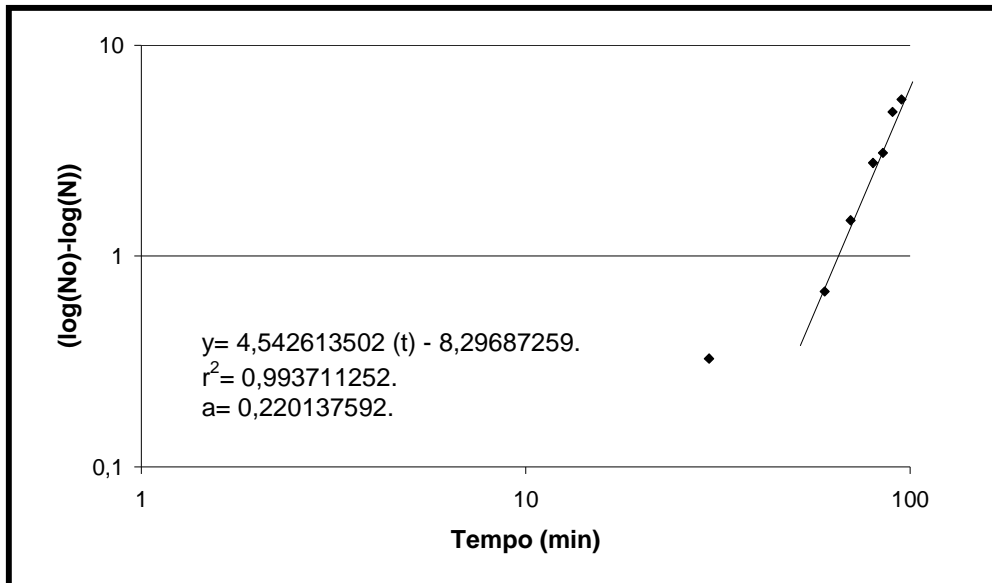


Figura 43. Determinação do valor de “a” para *B. fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã à 85°C.

A partir da determinação do valor de “a” (0,220137592) à 85°C usando a *equação 2*, linearizou-se as demais curvas para determinação do valor de “k” (constante de inativação ou coeficiente angular das retas linearizadas à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C) (*Figura 44*).

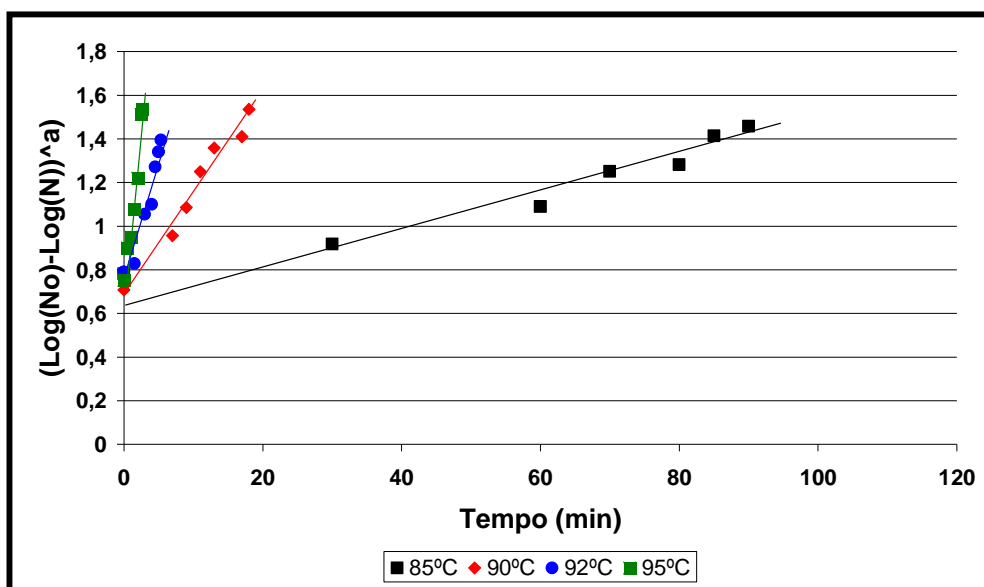


Figura 44. Curvas de sobreviventes linearizadas de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C.

Na *Tabela 19* são mostrados os valores de “k” e D* para cada temperatura na qual se determinou a resistência térmica de *B.fulva* IOC 4518. King, Bayne e Alderton (1979), reportaram valores de k e C à 90°C iguais a 0,040 e 0,292, respectivamente para *B.fulva*, tendo como meio de aquecimento uma solução de 0,5% ácido tartárico com 16% de glicose e pH 5,0. A maior resistência térmica do fungo obtida por estes autores (25 min contra 16,68 min do presente estudo, à 90°C) pode dever-se ao fato da solução possuir concentração mais elevada de açúcares do que o suco de maçã (11°Brix), o que sabidamente protege os ascos/ascósporos dos efeitos deletérios do calor.

O valor de 1/k ou D* à 90°C apresenta-se marginalmente superior em relação aos reportados por Bayne e Michener (1979), que encontraram um valor D observado experimentalmente para ascósporos de *B.fulva* variando entre 1,3 min e 15 min. Hoffmann (2004) determinou a resistência térmica de *B.nivea* em suco de maçã à 85°C, obtendo um valor equivalente a D (1/k) para esta temperatura igual à 90,9 min. Aragão (1989) reportou um valor de k à 90°C igual a 0,2928 min⁻¹ para

B.nivea em suco de morango. Gressoni Jr (2003) encontrou um valor $D^*_{90^\circ\text{C}}$ igual a 2,03 min para *B.nivea* em suco de laranja. Recentemente, Houbraken *et al.* (2006), reportaram que os valores D à 85°C para *B.spectabilis* podem variar entre 47 e 75 minutos e descrevem que esta espécie é uma das mais termoresistentes dentre os bolores termoresistentes. A partir do valor $D^*_{85^\circ\text{C}}$ igual a 64,58 min obtido no presente estudo para a cepa de *B.fulva* IOC 4518 produtora de patulina, pode-se considerar que cepas extremamente termoresistentes de *B.fulva* podem ocorrer nos produtos de frutas termoprocessados.

Tabela 19: Valores de “k”, D^* (min), equação da reta e R^2 às temperaturas de 85°C, 90°C, 92°C e 95°C e valor de Z^* (°C) para *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã.

Temperatura (°C)	K (min ⁻¹)	D^* (min)	Equação da reta	R^2
85	0,015485287	64,58 ± 9,07	$y = 0,015485287 (t) - 0,00325875.$	0,99.
90	0,059942164	16,68 ± 4,67	$y = 0,059942164 (t) + 0,38142166.$	0,95.
92	0,15840641	6,31 ± 2,73	$y = 0,15840641 (t) + 0,458876281.$	0,90.
95	0,322378933	3,10 ± 1,42	$y = 0,322378933 (t) + 0,536364446.$	0,90
Z^* (°C)		7,4		

O valor de D^* à 95°C (1/k) obtido foi igual 3,10 min, o suficiente para permitir que o fungo sobreviva às condições de pasteurização normalmente utilizadas pelas indústrias de sucos, nas quais tempos entre 10 e 30 s nesta temperatura são comumente aplicados. Já o valor Z^* obtido (7,4°C) (*Figura 45*) foi marginalmente superior ao reportado na literatura, que varia entre 4°C e 7°C (valor médio de 5°C) (TOURNAS, 1994).

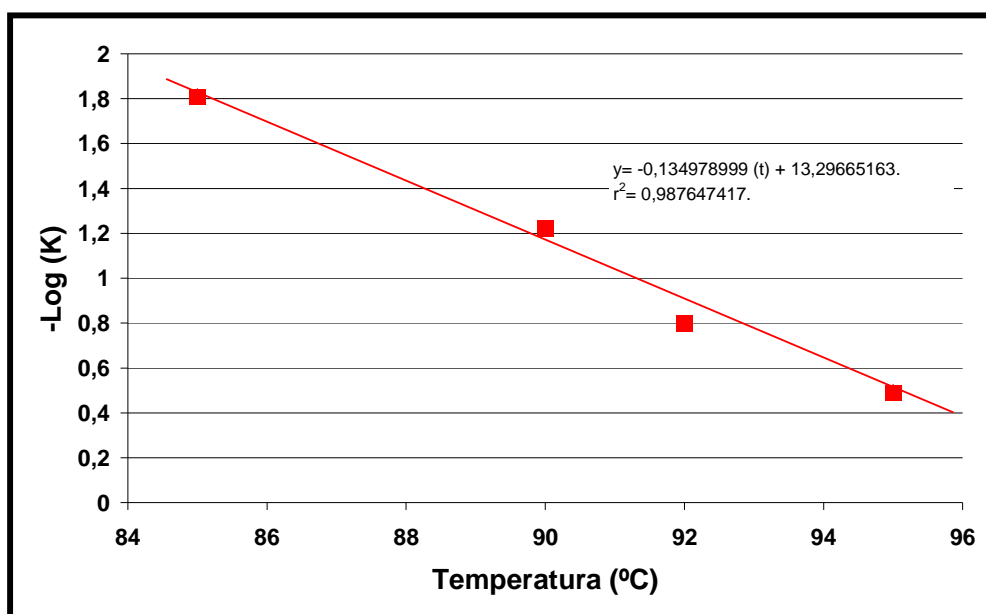


Figura 45. Curva de resistência térmica de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã 11°Brix.

Considerando-se um valor de Z igual a 7,4°C e o valor de N_0 igual a 10^1 esporos/embalagem foram calculados os valores de F utilizando a equação 5, para o processamento de suco clarificado de maçã, tendo como alvo *B.fulva* IOC 4518 e considerando-se as temperaturas de processo de 95°C, 98°C e 105°C são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20. Valores de F (min) para processamento de suco clarificado de maçã à 95°C, 98°C e 105°C considerando-se *B.fulva* IOC 4518 como alvo e taxa de defeitos de 1 embalagem em 10^4 produzidas.

Temperatura (°C)	F (min)
95	15,5
98	6,09
105	0,69

Considerando-se que a temperatura mais comumente aplicada para pasteurização do suco de maçã é a de 95°C, pode-se afirmar que se um fungo com

resistência térmica equivalente à de *B.fulva* IOC 4518 for contaminante da matéria-prima (fruta ou suco), o processo térmico não será capaz de causar nenhuma redução decimal na população do microrganismo o que culminará em surtos de deterioração dos produtos processados. Apesar disso, os poucos relatos de surtos de deterioração por estes microrganismos em sucos de frutas, podem ser explicados por uma combinação muito mais dependente da baixa freqüência de ocorrência destes microrganismos e das pequenas populações dos microrganismos (que podem conter ascósporos com elevada resistência térmica), do que da eficiência do processo térmico em garantir a eliminação de ascósporos de bolores termoresistentes. Considerando-se os parâmetros de inativação térmica da cepa de *B.fulva* IOC 4518 estudada, pode-se inferir que somente o binômio de 105°C por aproximadamente 42s seria capaz de garantir que a probabilidade de deterioração de um lote com 10000 embalagens produzidas fosse igual a um (N_0 igual a 10^1 esporos/embalagem). Apesar disso, é preciso avaliar-se com cuidado as perdas nutricionais e sensoriais do produto aquecido e para manutenção de suas características e da a qualidade e segurança, sugere-se então um controle rigoroso da qualidade da matéria-prima no campo de maneira evitar-se o contato das frutas com o solo e na etapa de recepção, lavagem e seleção das frutas, para exclusão das frutas contaminadas e desta forma diminuir a probabilidade de deterioração dos sucos produzidos.

5.10. Efeito da pasteurização em sistema contínuo sobre os ascósporos de *Byssochlamys spp produtor de patulina (B.fulva IOC 4518)*:

As histórias térmicas dos processos (A, B e C) obtidos mediante os dados de temperatura medidos no início e fim de cada etapa aplicando a equação de Deindoerfer e Humphrey (1959) (equação 6) para avaliação do efeito da pasteurização em sistema contínuo sobre os ascósporos de *B.fulva* IOC 4518 são mostradas na *Figura 46*.

Uma queda média de 2,5°C, 2,82°C e 1,78°C na temperatura do produto entre o final do aquecimento e retenção foi observada para os processos A, B e C, respectivamente (*Tabela 21*). Pode-se observar que quanto maior a temperatura final de aquecimento, maior foi a perda de temperatura entre a seção de aquecimento e a retenção. Esta perda era esperada, visto que o tubo de retenção não é protegido para evitar queda de temperatura. Swartzel (1984) reportou que em sistemas contínuos a temperatura do produto dentro do tubo de retenção vai decrescendo ao longo de seu comprimento, devido a perda de calor do sistema. No entanto, todo o cálculo para redução de escala (“*down size*”) do processo industrial para o processo equivalente na unidade Microthermics levou em conta a temperatura média do suco na seção de retenção, já que esta seção é crítica num processo asséptico.

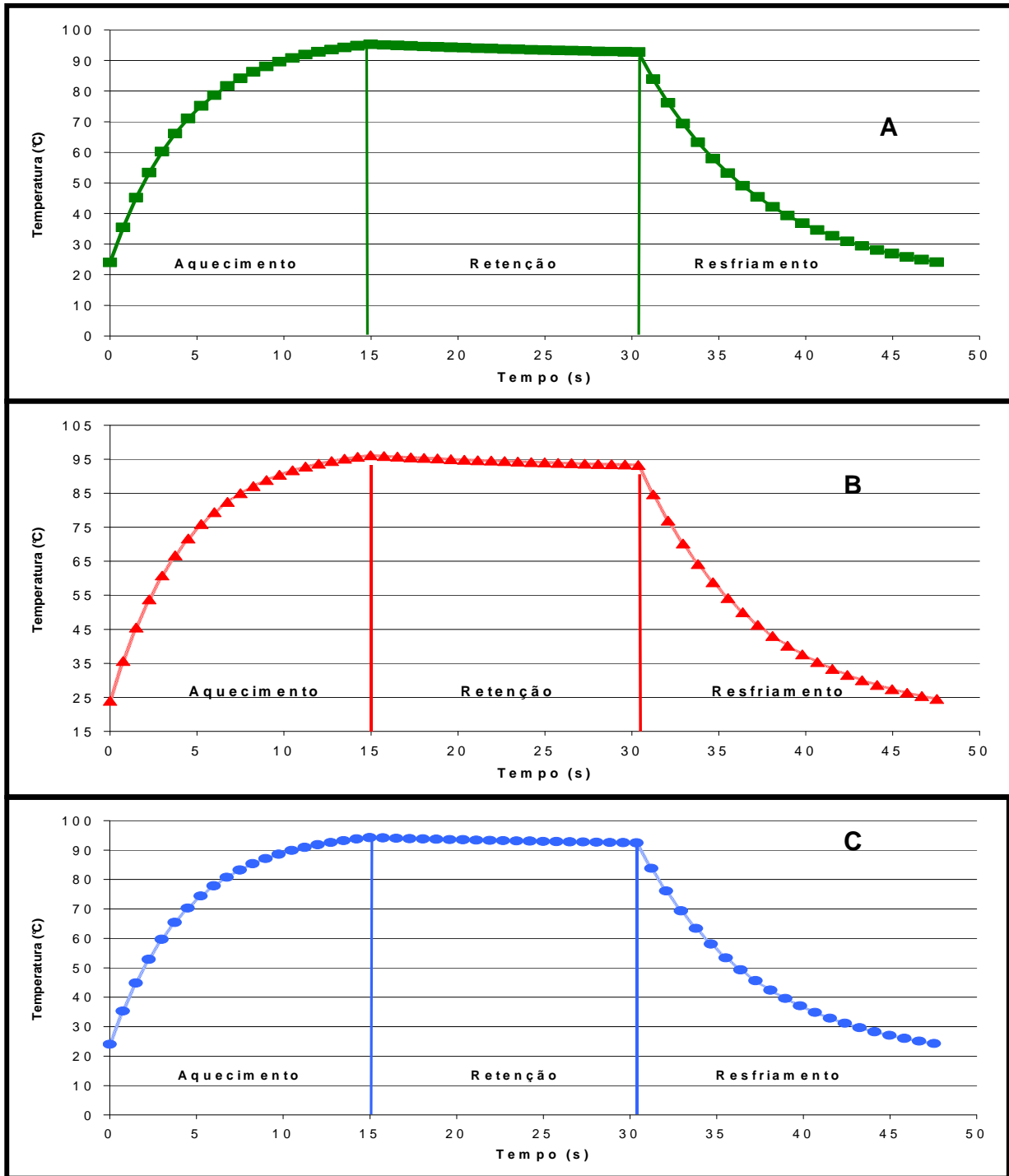


Figura 46: História térmica dos processos térmicos: **Processo A** – Aquecimento à 95°C e retenção à 93°C - equivalente ao industrial para pasteurização do suco de maçã na planta *Microthermics*; **Processo B** – Aquecimento à 96°C e retenção à 94°C e **Processo C** – Aquecimento à 94°C e retenção à 92°C.

Tabela 21: Valores médios de temperatura de entrada e saída, J de cada seção durante os processos de pasteurização de suco clarificado de maçã sobre ascósporos de *B.fulva* IOC 4518.

Processo	Seção	Temperatura média (°C)		J
		Entrada	Saída	
A* (aquecimento à 95°C e retenção à 93°C)	Aquecimento	24,00	95,23	0,226
	Retenção	95,23	92,73	0,053
	Resfriamento	92,73	24,09	0,146
	Envase	24,09	24,40	---
	Total	---	---	---
B* (aquecimento à 96°C e retenção à 94°C)	Aquecimento	24,00	96,14	0,227
	Retenção	96,14	93,32	0,057
	Resfriamento	93,32	24,52	0,142
	Envase	24,52	24,40	---
	Total	---	---	---
C* (aquecimento à 94°C e retenção à 92°C)	Aquecimento	24,00	94,20	0,225
	Retenção	94,20	92,42	0,041
	Resfriamento	92,42	24,23	0,145
	Envase	24,23	24,40	---
	Total	---	---	---

**Em todos estes processos, o tempo de retenção foi de 30s e a temperatura de envase de 24°C.*

Para determinação do número de reduções decimais calculadas (γ_c) dos processos A, B e C, levou-se em conta o valor D à 95°C (186,60s) (a qual foi considerada a temperatura de referência – T_{ref}) e o valor de F para cada seção do equipamento (aquecimento, retenção e resfriamento). Através da soma dos valores do número de reduções de cada seção, obteve-se o valor número total de reduções calculado (γ_c) para cada processo avaliado. Pela diferença entre o log do número de UFC/mL inoculado inicialmente (N_0) e o número de UFC/mL de sobreviventes contados por plaqueamento em MEA formulado, determinou-se o número de reduções decimais observados experimentalmente (γ_e). Os valores para (γ_c) e (γ_e) são apresentados na *Tabela 23*.

Dentre os três processos realizados, maior letalidade acumulada foi observada para o processo B (F= 18,45 s), seguido dos processos A, (F= 14,51 s) e o processo C (F= 11,61 s). A diferença entre o valor de F (letalidade) obtido no sistema contínuo (*Tabela 22*) para o processo A (equivalente ao industrial) e o valor de F à 95°C determinado a partir do valor de D* obtido em tubos TDT (*item 5.9, Tabela 20*) indica haver diferença nas taxas de inativação entre os sistemas de aquecimento não isotérmico (sistema HTST) e isotérmico (tubos TDT). Diferenças entre as taxas de inativação de microrganismos em sistemas contínuos e estáticos vêm sendo reportadas na literatura. Fairchild, Swartzel e Foegeding (1994) reportaram que a resistência térmica de *Listeria monocytogenes* foi afetada pelo tipo de sistema de aquecimento (tubos capilares ou pasteurizador em escala laboratorial). Wescott, Fairchild e Foegeding (1995) estudaram e compararam a inativação térmica de *Bacillus cereus* e *B.stearothermophilus* (hoje *Geobacillus stearothermophilus*) em sistema contínuo e sistema estático e reportaram que o sistema contínuo foi mais letal do que o sistema estático de aquecimento. Stabel,

Steadham e Bolin (1997) também relataram maior inativação térmica de *Mycobacterium paratubercuolsis* em leite em um pasteurizador de escala laboratorial do que quando se usou o método do tubo TDT. Estes autores sugeriram que em sistema estático, a maior tendência à aglomeração de materiais e células levaria a proteção destas contra os efeitos deletérios do calor, culminando com aparente aumento na resistência térmica do microrganismo. No entanto, Huemer *et al.* (1998) em seu estudo reportaram que acima de 125°C os valores D obtidos para *B.sporothermodurans* em regime estático são maiores do que os obtidos em sistema contínuo, sendo o tempo de subida da temperatura (*come-up time*) nos tubos TDT o responsável por esta “maior resistência térmica”. Assim, supõe-se que com uma menor taxa de aquecimento como as dos tubos TDT, maior tempo é dado para os microrganismos se adaptarem fisiologicamente, sintetizarem proteínas do choque térmico, o que culminaria com uma menor taxa inativação.

A síntese de proteínas do choque térmico permite às células microbianas se adaptarem às mudanças ambientais e metabólicas e a sobreviverem a condições de estresse (ARSÈNE, TOMOYASU, BUKAU, 2000). No sistema HTST utilizado na presente pesquisa, com uma taxa de aquecimento muito elevada, não haveria tempo suficiente para adaptação dos esporos às condições letais, o que explica a maior taxa de inativação, representada pela disparidade entre o número de reduções calculadas (baseando-se no valor D à 95°C em tubos TDT) contra o número de reduções decimais obtido experimentalmente (contagem de sobreviventes).

Tabela 22: Valores de $F_{95^{\circ}\text{C}}$, número de reduções calculado e obtidos experimentalmente durante os processos de pasteurização de suco clarificado de maçã sobre ascósporos de *B.fulva* IOC 4518.

Processo	Seção	$F_{95^{\circ}\text{C}}$ (s)	Número de reduções decimais calculado (γ_c) (log UFC/mL)	N_0 (log UFC/mL)	N_F (log UFC/mL)	Número de reduções decimais observadas experimentalmente (γ_e) (log (UFC/mL))
A* (equivalente ao industrial)	Aquecimento	3,357	$1,80 \times 10^{-2}$	---	---	---
	Retenção	10,911	$5,85 \times 10^{-2}$	---	---	---
	Resfriamento	0,242	$1,30 \times 10^{-3}$	---	---	---
	Envase	---	---	---	---	---
	Total	14,510	$7,7 \times 10^{-2}$	$3,36 \pm 0,01$	$1,60 \pm 0,51$	$1,76 \pm 0,51$
B* (aquecimento à 96°C e retenção à 94°C)	Aquecimento	4,440	$2,38 \times 10^{-2}$	---	---	---
	Retenção	13,717	$7,35 \times 10^{-2}$	---	---	---
	Resfriamento	0,292	$1,57 \times 10^{-3}$	---	---	---
	Envase	---	---	---	---	---
	Total	18,449	$9,88 \times 10^{-2}$	$4,78 \pm 0,10$	$< 10^{-2**}$	$> 4,78$
C* (aquecimento à 94°C e retenção à 92°C)	Aquecimento	2,445	$1,31 \times 10^{-2}$	---	---	---
	Retenção	8,948	$4,80 \times 10^{-2}$	---	---	---
	Resfriamento	0,221	$1,18 \times 10^{-3}$	---	---	---
	Envase	---	---	---	---	---
	Total	11,613	$6,2 \times 10^{-2}$	$4,68 \pm 0,21$	$4,52 \pm 0,19$	$0,16 \pm 0,19$

*Em todos estes processos, o tempo de retenção foi de 30s e a temperatura de envase de 24°C .

** Ausência de sobreviventes após contagem em 100mL de amostra.

Isto pode ser considerado adequado, já que Etoa e Adegoke (1995) reportaram em seu estudo que esporos de *B.cereus* submetidos a menores taxas de aquecimento, apresentaram maior resistência térmica do que os esporos submetidos a taxas mais rápidas de aquecimento, sendo sugerido que com menores taxas, os esporos tenham tido tempo suficiente para adquirir maior resistência ao calor na etapa letal do processo. Outras pesquisas utilizando sistemas contínuos (não isotérmicos) como a unidade Microthermics tem também reportado menor resistência térmica ou maior efeito letal dos microrganismos estudados ao se comparar com os valores obtidos em sistemas isotérmicos. Pacheco e Massaguer (2004) reportaram que menores valores D foram obtidos na unidade Microthermics para *Neosartorya fischeri* em polpa de tomate em comparação aos valores obtidos em tubos TDT's e sugerem ser a transferência de calor mais efetiva nos trocadores de calor em espiral do que no banho termostático a principal causa da maior inativação dos esporos. Assim, pode-se concluir que diferenças no comportamento de inativação térmica entre sistemas estáticos e sistemas contínuos são independentes do tipo de microrganismo e da sua forma (célula vegetativa ou esporos). Também, de um modo geral, estes estudos demonstram a importância do rápido aquecimento que ocorre no sistema contínuo, sendo provavelmente este o fator mais impactante para a letalidade global. Todavia, mais estudos em sistemas contínuos pilotos são necessários para esclarecer o efeito de diferentes taxas de aquecimento na ativação e conseqüente inativação dos esporos de bolores e bactérias termoresistentes. A vantagem de se determinar estes efeitos em sistemas contínuos, se deve à possibilidade de se poder obter resultados mais confiáveis sobre o efeito da temperatura sobre os microrganismos, sem no entanto, se confundir com os efeitos

do tempo (que neste caso são muito reduzidos) para se atingir uma temperatura ou para coleta das amostras (LOSS e HOTCHKISS, 2004).

Em virtude dos valores de letalidade calculados, os processos A, B e C seriam também responsáveis por causar $7,7 \times 10^{-2}$, $9,88 \times 10^{-2}$ e $6,2 \times 10^{-2}$ reduções decimais (γ) sobre as populações de *B.fulva* IOC 4518 inoculadas no suco de maçã, levando-se em conta o valor $D^*_{95^\circ\text{C}} = 3,10$ min, determinado nos tubos TDT. Todavia, a partir dos resultados da contagem de sobreviventes de cada processo, pôde-se observar que o processo A causou $1,67 \pm 0,44$, reduções decimais de *B.fulva* IOC 4518. O processo B (com maior letalidade calculada) foi capaz de causar mais do que 4,78 reduções decimais na população do fungo, enquanto o processo com menor letalidade (C), não foi capaz de causar nenhuma redução decimal ($\gamma=0,15$) na população de *B.fulva* IOC 4518 inoculada no suco clarificado de maçã.

Considerando-se que a temperatura é o principal fator que afeta resistência térmica dos microrganismos, Akterian *et al.* (1999) reportaram um valor de tolerância para variação neste parâmetro de 0,5% em estudos de termobacteriologia. De acordo com os dados apresentados na *Tabela 21*, pode-se observar que a diferença entre a temperatura da seção de retenção, entre os processos A e B foi de 0,64% (0,59°C), enquanto entre os processos A e C foi de 0,33% (0,31°C). Burton (1988) propuseram uma variação linear entre a letalidade de um processo térmico e a temperatura no tubo de retenção e demonstraram que uma pequena mudança na temperatura tem um grande efeito sobre a letalidade total do processo. Estes autores reportaram que uma variação de 1°C na temperatura de retenção, levou ao aumento do efeito esterilizante do processo sobre *B.stearothermophilus* de 8D para 10D. A

pesar de maior atenção ser dada ao tubo de retenção, o *come-up time* (tempo de subida) também deve ser levado em conta, já que ele pode contribuir com 40 a 51% da letalidade cumulativa observada na saída do tubo de retenção (AWUAH *et al.*, 2004). No presente estudo, a diferença de temperatura na seção de aquecimento entre os processos A e B foi de 0,96% (0,91°C), enquanto entre os processos A e C foi de 1,08% (1,03°C) e desta forma, sugere-se que a interação entre a variação de temperatura entre as duas seções (aquecimento e retenção) tenham sido responsáveis pela variação no número de reduções decimais obtidas entre os três processos.

A realização dos três processos (A, B e C) se fez necessária para que se pudesse comprovar o efeito da variação da temperatura do final das seções de aquecimento e retenção sobre o número de sobreviventes de *B.fulva* IOC 4518 à pasteurização do suco de maçã. Considerando-se que esta variação de temperatura comumente ocorre nos trocadores de calor industriais, num mesmo processo a variação de temperatura observada de A (processo equivalente ao industrial – padrão) passando por B e C, significaria que matérias-primas contaminadas até mesmo com níveis tão baixos de bolores termoresistentes como 10^9 ascósporos/100mL poderiam resultar em embalagens de sucos contaminados com estes microrganismos, visto que mesmo numa pequena faixa de variação de temperatura como as observadas, o número de reduções decimais esteve entre 0,15 à >4,78. Hatcher *et al.*, (1979) corroboram que o controle de temperatura nos processos térmicos se torna crítico quando os produtos sendo processados contém microrganismos termoresistentes caracterizados por baixos valores Z, como os fungos termoresistentes (5-7°C). Segundo este autor, a partir dos dados obtidos em

sistema isotérmico de aquecimento, flutuações na temperatura de 1°C aumentariam o tempo requerido para destruição de 10^4 esporos/mL de *B. fulva* G-5 de 14 min para 20 min. Como os dados do presente estudo foram obtidos a partir de condições não-isotérmicas de aquecimento, pode-se afirmar que pequenas variações na temperatura durante os processos térmicos, também impactam sobre sua letalidade global, e desta forma, explica o isolamento de fungos termoresistentes a partir de embalagens de suco de maçã termoprocessado (e em geral de outros sucos de frutas) mesmo considerando-se processos adequadamente desenhados, por exemplo, para causar 5 reduções decimais do microrganismo alvo, mais termoresistente. Assim, comprova-se o quão importante é o controle **restrito** de temperatura durante os processos térmicos aplicados aos sucos de frutas, e particularmente ao suco de maçã, pela possível presença de espécies de fungos termoresistentes produtoras de micotoxinas, como a patulina.

Além das variações de temperatura das seções de aquecimento e retenção impactarem na letalidade global do processo térmico do suco de maçã, pôde-se observar que esta variabilidade também ocorre durante um mesmo processo térmico. Conforme dados apresentados na *Tabela 23*, no processo A (equivalente ao industrial), o número de reduções decimais experimentais (γ_e) variou de 0,95 à 2,66, com a maior parte das garrafas apresentando contagens de sobreviventes que indicaram entre 1-2 reduções decimais (65%). Uma menor porcentagem de garrafas (5%) apresentou menos do que 1 redução decimal, enquanto outra parte (30%) das garrafas, apresentou mais do que 2 reduções decimais na população de *B. fulva* IOC 4518 inoculada no suco clarificado de maçã. Este fato pode ser devido a diferenças

com relação à resposta à ativação e posterior inativação pelo calor, quebra dos ascos, liberação e morte dos ascósporos de *B.fulva*, sendo outra hipótese os diferentes perfis de temperatura aos quais cada esporo foi submetido durante o processamento contínuo. Considerando-se que baixas contagens de bolores termoresistentes (1-8 esporos/100mL) estão presentes nas matérias-primas vegetais a serem termoprocessadas (BAGLIONI, GUMERATO e MASSAGUER, 1999) e que cada cepa apresentará uma resposta diferenciada ao calor, pode-se dizer que a variação com relação ao número de reduções decimais observadas entre as 20 garrafas seria na prática representada pela diferença do tempo de destruição de cada ascósporo contaminante, sendo um fator a mais para concorrer e explicar o isolamento de bolores termoresistentes de sucos de frutas. Em virtude disso, sugere-se que em estudos de validação de processos térmicos, mais do que uma cepa do microrganismo alvo seja utilizada, pela possibilidade de poder se considerar diferentes respostas à ativação ou inativação pelo calor.

Além da contagem de sobreviventes em placas de cada processo, a incubação das garrafas envasadas com suco de maçã clarificado pasteurizado nas condições descritas na *Tabela 22*, comprovou que nenhum sobrevivente pode ser recuperado após o processo B, já que nenhuma das garrafas apresentou sinais de crescimento fúngico após 30 dias de incubação à 30°C. No entanto, para as garrafas pertencentes aos processos A e C, todas as garrafas incubadas à 30°C mostraram sinais de crescimento fúngico (micélio) vigoroso já com 3 dias após o processamento.

Tabela 23: Variação do número de reduções decimais experimentalmente observados (γ_e) de *B.fulva* IOC 4518 inoculado no suco de maçã clarificado (processo A).

Garrafa	Número de reduções	
	decimais (γ_e) de <i>B.fulva</i> IOC 4518 (esporos/mL) [†]	Garrafa
1	1,58	1
2	2,36	12
3	2,18	13
4	2,66	14
5	2,18	15
6	2,05	16
7	1,32	17
8	1,46	18
9	1,58	19
10	1,96	20

[†] $\gamma = N_0 - N_F$, onde, $N_0 = 3,36 \pm 0,01$.

O teste de incubação na própria embalagem foi utilizado como uma alternativa para se obter uma maior probabilidade de recuperação de ascósporos injuriados pelo calor já que a metodologia de contagem de bolores termoresistentes tem um limite de detecção de 1 ascósporo/100 mL de amostra. Desta forma, considerando-se que um volume total de aproximadamente 16 L foram amostrados para cada processo (*Tabela 24*), aumentou-se a probabilidade de se detectar 1 ascósporo em 16 L de amostra, o que permitiu melhor avaliação do processos mais severo (B), no qual probabilidade de sobreviventes menor que 1 era esperada.

Em todas as garrafas que apresentaram sinais de crescimento fúngico (micélio), observou-se crescimento inicial do fungo no fundo das garrafas, seguindo disseminação do micélio por todo o suco até atingir a superfície, quando então as garrafas já se apresentavam com gás. O crescimento de *B.fulva* IOC 4518 preferencialmente no fundo das garrafas reflete a habilidade de espécies de *Byssochlamys* spp de crescerem em ambientes com baixa tensão de oxigênio (TANIWAKI *et al.*, 2001).

Tabela 24: Porcentagem de garrafas apresentando defeito (crescimento micelial) para cada processo (A, B e C) após incubação à 30°C por 30 dias.

Processo	Garrafas com defeito (crescimento fúngico) (%)
A	100
B	0
C	100

*100 garrafas foram envasadas sob condições assépticas com 170 ± 10 mL de suco clarificado de maçã/cada. Onde N_0 (log UFC/mL) para A= $3,36 \pm 0,01$, B= $4,78 \pm 0,1$ e C= $4,68 \pm 0,21$.

Para verificar se após o processo térmico a cepa de *B.fulva* IOC 4518 continuaria produzindo a patulina, 10% das garrafas do processo A (equivalente ao industrial) foram incubadas por 12 dias à 30°C (período em que a produção de patulina é máxima, segundo dados apresentados no item 4.11). Os resultados apresentados na *Tabela 25* demonstram que a produção de patulina por este fungo não foi afetada por prováveis injúrias causadas pelo processo térmico, demonstrando que se cepas de fungos termoresistentes produtoras de patulina sobreviverem nos níveis aqui utilizados (vide *Tabela 23*) aos processos térmicos aplicados aos sucos de maçã, terão condições de produzir a micotoxina a valores maiores que 50ppb.

Tabela 25: Produção de patulina por *B.fulva* IOC 4518 sobreviventes ao processo térmico A (equivalente ao industrial) após 12 dias de estocagem à 30°C.

Garrafas PET	Patulina ($\mu\text{g/L}$)
1	327,0
2	402,0
3	335,0
4	311,2
5	354,0
6	318,0
7	317,0
8	293,0
9	335,0
10	322,0
Média	331,42
Desvio padrão	29,62

Assim, para a garantia da eficiência dos processos térmicos aplicados na indústria de sucos de frutas, deve-se garantir um controle **restrito** da temperatura de processo. Operacionalmente, isto pode ser conseguido pela melhoria dos sistemas de troca térmica e do seu controle. Se a utilização de temperaturas de guarda mais restritas não for operacionalmente possível, em virtude do fato de muitas vezes levarem a queda da esterilização da linha asséptica e a necessidade de nova higienização e esterilização deve-se levar em conta a utilização de temperaturas em média 2°C maiores do que as estabelecidas e validadas laboratorialmente. Este procedimento pode ser uma tentativa para se reduzir a incidência de bolores

termoresistentes e/ou outros microrganismos de resistência térmica semelhante no suco de maçã e em outros sucos de frutas.

5.11. Determinação da probabilidade de crescimento de *B. fulva* IOC 4518 e do efeito da carga de ascósporos e temperatura de estocagem na produção de patulina durante a estocagem do suco clarificado de maçã:

5.11.1. Determinação da probabilidade de crescimento de *B. fulva* IOC 4518 em função da carga de ascósporos e da temperatura durante a estocagem do suco clarificado de maçã:

Diferenças foram observadas com relação ao tempo para as primeiras garrafas mostrarem sinais de crescimento (e conseqüente deterioração pelo aparecimento do micélio) e com relação à probabilidade máxima de crescimento ao se considerar as duas temperaturas de estocagem (21°C e 30°C) e as duas cargas de esporos de *B. fulva* IOC 4518 estudadas (10^0 e 10^1 esporos/100 mL) (Tabelas 26 e 27).

O tempo para as garrafas apresentarem sinais de crescimento mostrou-se dependente da temperatura de estocagem, com os primeiros sinais de crescimento micelial sendo observados após dois dias de estocagem à 30°C e após quatro dias de estocagem à 21°C, independente da carga de esporos inoculada (10^0 ou $10^1/100$ mL).

Tabela 26: Tempo para crescimento de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã em função da carga de esporos e temperatura durante a estocagem.

Tratamentos				
Inóculo de esporos (esporos/100mL)	Temperatura de estocagem (°C)	Total de garrafas	Total de garrafas mostrando crescimento	Tempo para crescimento do fungo (dias) de acordo com o inóculo e temperatura
10 ⁰	21°C	15	13	4;4;4;4;5;5;5;5;5;6;7;11;11;(-);(-)
	30°C	15	14	2;2;2;2;2;2;3;3;3;4;4;4;4;13;(-)
10 ¹	21°C	15	15	4;4;4;4;5;5;5;5;5;5;6;6;7;9;11
	30°C	15	15	2;2;2;2;2;2;2;3;3;3;3;3;4;4

(-) Representa garrafas que não mostraram crescimento micelial.

Dividindo-se o número de garrafas com sinais de crescimento micelial pelo número total de garrafas num determinado tempo, obteve-se a probabilidade de crescimento (P_t). Conforme mostrado na *Tabela 26*, a carga de esporos influenciou a probabilidade de crescimento e deterioração do suco por *B.fulva* IOC 4518. Quando a carga de esporos foi de 10⁰/100 mL, uma probabilidade de deterioração de 87% foi obtida após o quarto dia de estocagem à 30°C, enquanto esta mesma probabilidade somente foi alcançada à 21°C após 11 dias de estocagem. Já para uma carga de esporos sobreviventes ao processo térmico de 10¹/100 mL, probabilidades de 100% de deterioração foram observadas quando a estocagem se deu à 21°C ou 30°C, sendo, no entanto, estes valores atingidos após 11 e 4 dias respectivamente. Em suma, menores probabilidades de deterioração foram sempre observadas para a carga de esporos de 10⁰/100 mL (87 e 93%, para estocagem à 21°C e 30°C, respectivamente) contra maiores probabilidades de deterioração sendo observadas

para a carga de esporos de $10^1/100$ mL (100%, independente da temperatura de estocagem). As garrafas remanescentes dos experimentos com nível de inoculo de 10^0 esporos/100 mL não mostraram sinais de deterioração mesmo após 90 dias (vida de prateleira do suco de maçã pasteurizado).

Tabela 27: Valores de $P_{(t)}$ calculados e os ajustados pelo modelo preditivo para *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã em função da temperatura e carga de esporos durante a estocagem por 12 dias.

Carga de esporos (esporos/100mL)											
10 ⁰						10 ¹					
Temperatura de estocagem (°C)											
21			30			21			30		
Tempo (dias)	$P_{(t)}$ *	$P_{(t)m}$ **	Tempo (dias)	$P_{(t)}$ *	$P_{(t)m}$ **	Tempo (dias)	$P_{(t)}$ *	$P_{(t)m}$ **	Tempo (dias)	$P_{(t)}$ *	$P_{(t)m}$ **
4	0,27	0,31	2	0,4	0,36	4	0,27	0,30	2	0,53	0,52
5	0,6	0,53	3	0,6	0,65	5	0,67	0,62	3	0,87	0,88
6	0,67	0,70	4	0,87	0,83	6	0,8	0,84	4	1	0,99
7	0,73	0,78	13	0,93	0,94	7	0,87	0,91	-	-	-
11	0,87	0,82	-	-	-	9	1	0,94	-	-	-
-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-

*Valores de $P_{(t)}$ calculados (Garrafa com crescimento/total de garrafas). **Valores de $P_{(t)m}$ ajustados pelo modelo apresentado na Equação 7.

Após o cálculo do fator Bias (ROSS, 1996), pôde-se observar que há concordância entre os dados observados e os preditos pelo modelo para todas as condições (carga de esporos *versus* temperatura de estocagem), com os valores de Bias para cada condição estudada estando próximo a 1 (Tabela 28). Para a condição de 21°C com as cargas de esporos de $10^0/100$ mL e $10^1/100$ mL, o modelo prediz em 1% dos casos na faixa insegura. Já à 30°C, com as cargas de esporos de $10^0/100$ mL

e $10^1/100\text{mL}$, o modelo sempre predisse no lado seguro (0,98 e 0,99, com as cargas de esporos de 10^0 e $10^1/100\text{mL}$, respectivamente). Valores do fator exatidão do modelo, de 1% e 6% quando a carga de esporos foi de $10^0/100\text{mL}$ e de 8% e 1% quando a carga de esporos foi de $10^1/100\text{mL}$ para 21°C e 30°C de temperatura de estocagem, respectivamente, indicam pequena variação entre os dados preditos e observados.

Tabela 28: Valores dos fatores Bias, Exatidão e R^2 obtidos para cada condição de temperatura de estocagem *versus* carga de esporos para o modelo de tempo para crescimento de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã.

Carga de esporos (esporos/100mL)					
10^0			10^1		
Temperatura de estocagem ($^\circ\text{C}$)					
21°C		30°C	21°C		30°C
Fator Bias	1,01	0,98	Fator Bias	1,01	0,99
Fator exatidão	1,01	1,06	Fator exatidão	1,08	1,01
R^2	0,99	0,99	R^2	0,99	0,99

Na *Figura 47* são mostrados os gráficos de probabilidade de crescimento de *B.fulva* IC 4518 *versus* tempo de estocagem para as temperaturas de 21°C e 30°C e cargas de esporos de 10^0 e $10^1/100$ mL. Os dados foram muito bem ajustados ao

modelo de Whiting e Call (1993), o que foi indicado pelos elevados valores de R^2 , Bias e fator exatidão (Tabela 28).

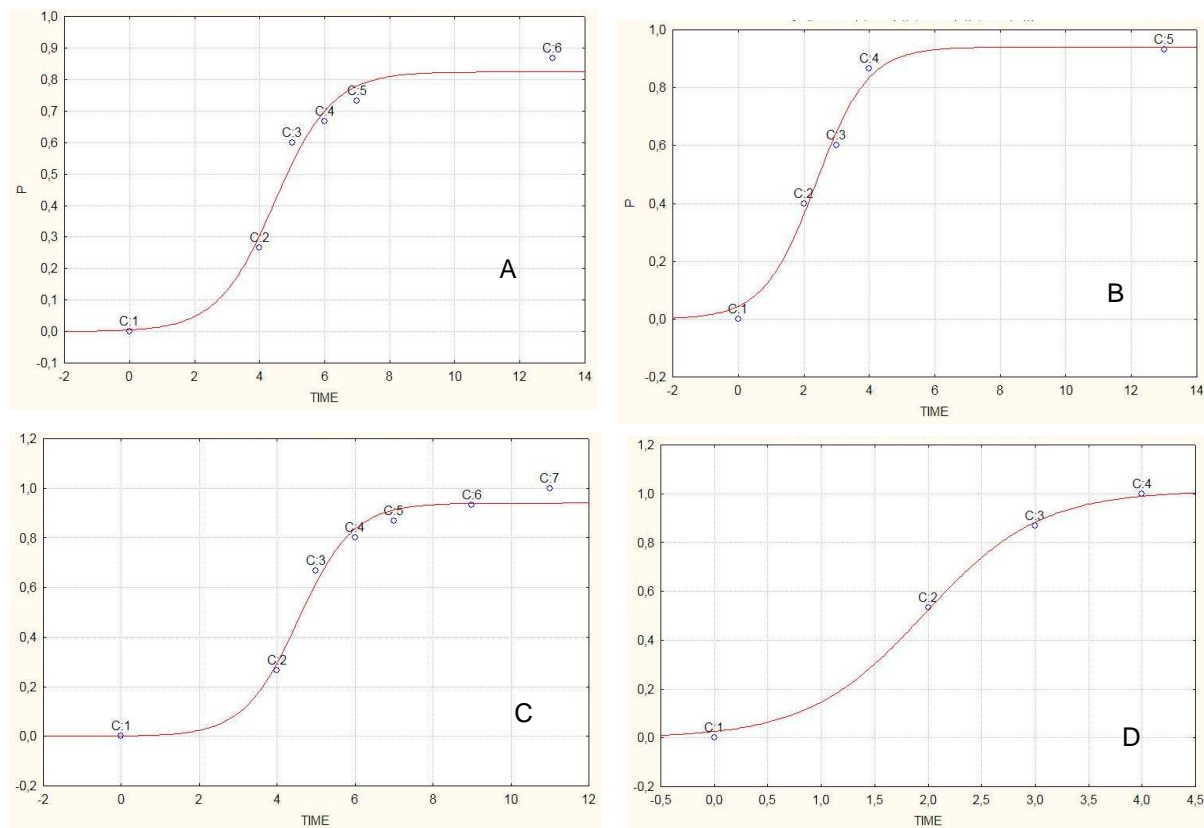


Figura 47: Probabilidades de crescimento de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã estocado à 21°C (A) e 30°C (B) com carga de esporos sobreviventes de 10⁰/100mL e à 21°C (C) e 30°C (D) com carga de esporos sobreviventes de 10¹/100mL.

As equações dos modelos preditivos para cada condição de temperatura e carga de esporos são mostradas nas equações 12 (carga de esporos de 10⁰/100mL e 21°C de temperatura de estocagem), 13 (carga de esporos de 10⁰/100mL e 30°C de temperatura de estocagem), 14 (carga de esporos de 10¹/100mL e 21°C de temperatura de estocagem) e 15 (carga de esporos de 10¹/100mL e 30°C de temperatura de estocagem).

$$y = (0,824198) / (1 + \exp((1,13239) * ((4,47004) - x)))$$

Equação 12.

$$y = (0,940868) / (1 + \exp((1,26851) * ((2,3724) - x)))$$

Equação 13.

$$y = (0,94043) / (1 + \exp((1,43099) * ((4,54517) - x)))$$

Equação 14.

$$y = (1,01271) / (1 + \exp((1,84747) * ((1,96203) - x)))$$

Equação 15.

Considerando-se que o suco de maçã pasteurizado e embalado em garrafas PET ou embalagens cartonadas é comercializado à temperatura ambiente e que as temperaturas médias anuais das regiões sul e sudeste e norte e nordeste do Brasil estão próximas a 21°C e 30°C (CPTEC-INPE), respectivamente, pode-se inferir que mesmo quando a contaminação deste produto após a pasteurização for baixa (10^0 esporos/100 mL) ou elevada (10^1 esporos/100 mL), sinais de deterioração (crescimento micelial) já seriam observados entre 2 e 4 dias após o envase. Hocking e Pitt (1984) reportaram que contaminações por fungos termoresistentes nas matérias-primas maiores que 2 esporos/100 mL são normalmente inaceitáveis e representam grande risco para os fabricantes de sucos de frutas. Todavia, o nível aceitável de contaminação na matéria-prima com bolores termoresistentes

dependerá muito do produto final (formulação, processo térmico, presença ou não de conservantes), sendo que em sucos processados pelo sistema alta temperatura, tempo curto (HTST), níveis de 2 ascósporos por 100 mL não são usualmente aceitáveis.

No Brasil, em levantamento sobre a incidência de bolores termoresistentes em linha de processamento asséptico de néctar de maçã, Massaguer (2003), encontrou matérias-primas contendo entre 1 e 4 esporos/100 g, enquanto contagens que variaram de 1,67 esporos por 100 mL à ausência por 100 mL foram obtidas após a pasteurização, demonstrando grande variabilidade da incidência destes microrganismos e habilidade para sobreviver ao processamento térmico. Assim, o número reduzido de surtos de deterioração de sucos de frutas causados por fungos termoresistentes ou a sua restrita extensão (número de embalagens afetadas), pode ser considerado resultante da combinação de uma baixa frequência da ocorrência destes contaminantes, baixa contaminação (número de ascósporos/100mL) presente nas matérias-primas, e ainda, a baixa ocorrência de cepas com resistência térmica suficiente para sobreviver aos processos térmicos adequadamente desenhados e mantidos sob controle durante o processamento do suco.

Na *Tabela 29* são dados os valores de P_{max} , κ e τ calculados pelo ajuste dos dados ao modelo de Whiting e Call (1993) para as condições estudadas. Pode-se observar que quanto maior a temperatura e a carga de esporos, maiores os valores de κ . Todavia, o tempo para metade das garrafas apresentarem sinais de deterioração (τ) quando a estocagem do suco contendo 10^1 esporos/100 mL foi realizada à 21°C foi muito próximo (4,54 dias) do que quando a carga de esporos foi

de $10^0/100$ mL (4,47 dias). Este fato pode ser explicado quando se considera que tanto à 21°C quanto à 30°C , mais da metade das garrafas de suco contendo 10^0 esporos/100 mL e 10^1 esporos/100 mL mostraram sinais de deterioração entre o quarto e sexto dias, sendo a principal diferença entre os dois tratamentos, o número total de garrafas deterioradas. Um total de 13 garrafas mostrou deterioração após 11 dias de estocagem quando o suco continha 10^0 esporos/100 mL, contra 15 garrafas mostrando deterioração já após 11 dias quando o suco continha 10^1 esporos/100 mL, justificando os valores obtidos para τ . Em suma, com a carga de esporos de $10^1/100$ mL, metade das garrafas podem demorar praticamente o mesmo tempo para aquelas contendo $10^0/100$ mL, no entanto, a extensão da deterioração (número de embalagens afetadas) será maior no primeiro caso do que no segundo.

Como o tempo para $P_{(t)}=0,1$ é mais importante para fornecer uma estimativa de quando as primeiras garrafas mostrarão sinais de deterioração e conseqüentemente a produção de patulina será iniciada, considerando os valores de P_{\max} , k e τ para cada condição e rearranjando a equação 7, calculou-se o tempo para se atingir uma determinada probabilidade ($P_{(t)}=0,1$) (Equação 16).

$$t = \tau - (\text{Ln}((P_{\max} / P_{(t)}) - 1) / k) \quad \text{Equação 16}$$

Como se pode observar na Tabela 29, entre 0,69 e 0,76 dias são necessários para 10% das garrafas mostrarem sinais de deterioração (micélios fúngicos visíveis a olho nu) quando a estocagem é feita à 30°C , para as cargas de esporos de 10^0 e $10^1/100$ mL, respectivamente. Já à 21°C , este tempo é aumentado em cerca de

quatro vezes (2,66 e 3,00 dias , respectivamente quando as cargas de esporos são de 10^0 e $10^1/100$ mL). Apesar do tempo para $P_{(t)} = 0,1$ obtido para a carga de esporos de $10^1/100$ mL ser sensivelmente maior do que o tempo para $P_{(t)} = 0,1$ quando esta carga é de $10^0/100$ mL, deve-se levar em conta mais uma vez que a extensão da deterioração nesta condição é sempre maior (100% das garrafas) e com a maior extensão da deterioração durante a estocagem, o tempo para metade das garrafas mostrarem sinais de crescimento fúngico deve ser maior.

Tabela 29: Valores de P_{max} , κ e τ para *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã estocado à 21°C e 30°C, inoculado com 10^0 e 10^1 esporos/100 mL.

Carga de esporos (esporos/100mL) inoculados	Temperatura (°C)	Valores ajustados pelo modelo					Valor calculado	
		P_{max}	Erro padrão de P_{max}	κ (dia ⁻¹)	Erro padrão de κ	τ (dias)	Erro padrão de τ	Tempo para $P_{(t)} = 0,1$ (dias)*
10^0	21°C	0,82	0,08	1,13	0,61	4,47	0,28	2,72
	30°C	0,94	0,06	1,27	0,29	2,37	0,19	0,69
10^1	21°C	0,94	0,04	1,43	0,42	4,54	0,14	3,05
	30°C	1,01	0,07	1,85	0,64	1,96	0,11	0,76

*Calculado, utilizando os valores de P_{max} , κ e τ ajustados pelo modelo.

Apesar do fato de que com aproximadamente dois e cinco dias de estocagem, metade das garrafas de todos os tratamentos já terem mostrado sinais de deterioração à 30°C e 21°C, respectivamente (*Tabela 26*), deve-se se levar em conta que o presente estudo foi realizado com garrafas PET e suco clarificado de maçã, os quais permitiram fácil visualização de quaisquer sinais de alteração, como

aparecimento do micélio fúngico, por menor que fosse. Assim, a quarentena na fábrica processadora do suco seguida de uma checagem das embalagens antes da comercialização poderia livrar a empresa de maiores custos com recolhimento do produto no mercado e também de desgastes em sua imagem. Todavia, sinais aparentes de deterioração como estufamento das embalagens somente foram observados após o décimo segundo dia de estocagem (caso a cepa dispusesse de mesmo padrão metabólico da aqui estudada) e desta forma, estes parâmetros não se aplicariam diretamente aos sucos embalados em embalagens cartonadas ou embalagens de alumínio. Neste caso, a deterioração somente seria percebida quando o consumidor já tivesse consumido uma porção do suco ou quando o período de tempo fosse suficiente para permitir produção de gás que causasse estufamento das embalagens.

Outro fato a ser considerado, é a possibilidade de injúrias aos esporos fúngicos causadas pelo tratamento térmico do suco com o aumento da fase lag (adaptação), o que levaria a deterioração tardia do produto. Juneja et al. (2006) reportaram um aumento do tempo de lag para células de *Salmonella* injuriadas pelo calor. No presente estudo, uma suspensão contendo ascósporos de *B.fulva* foi utilizada, e apesar de ser possível que alterações no metabolismo do microrganismo também ocorram após exposição a condições subletais. Apesar da suspensão ter sido ativada anteriormente à inoculação à 75°C/5 min (temperatura ótima de ativação de *B.fulva* IOC 4518), este tratamento não pode ser considerado capaz de causar injúria aos esporos tanto quanto se temperaturas na faixa de pasteurização do suco fossem utilizadas (95°C a 105°C, por exemplo). Esta abordagem não foi utilizada pelo fato dos experimentos na unidade *Microthermics* terem demonstrado que o número de

reduções decimais causadas pelo processo térmico apresenta variabilidade (entre uma e duas reduções decimais foram observadas) (*Tabela 22, ítem 5.10*) e desta forma, não seria possível alcançar a precisão do nível de inóculo inicial necessário para permitir adequada avaliação da influência das diferentes condições estudadas.

5.11.2. Determinação do efeito da carga de ascósporos e temperatura durante a estocagem do suco clarificado de maçã na produção de patulina por *B.fulva* IOC 4518:

As *Figuras 48 e 49* apresentam as concentrações médias de patulina produzidas por *B.fulva* IOC 4518 no suco clarificado de maçã durante a estocagem por 3, 6, 9 e 12 dias, após observação do primeiro sinal de crescimento micelial à 21°C e 30°C, levando-se em conta as duas cargas de esporos (10^0 e $10^1/100$ mL). Pode-se observar a partir os valores de R^2 mostrados nestas figuras, que a produção de patulina por *B.fulva* IOC 4518 nas condições estudadas e pelo período máximo de medição (12 dias) seguiu tendência linear.

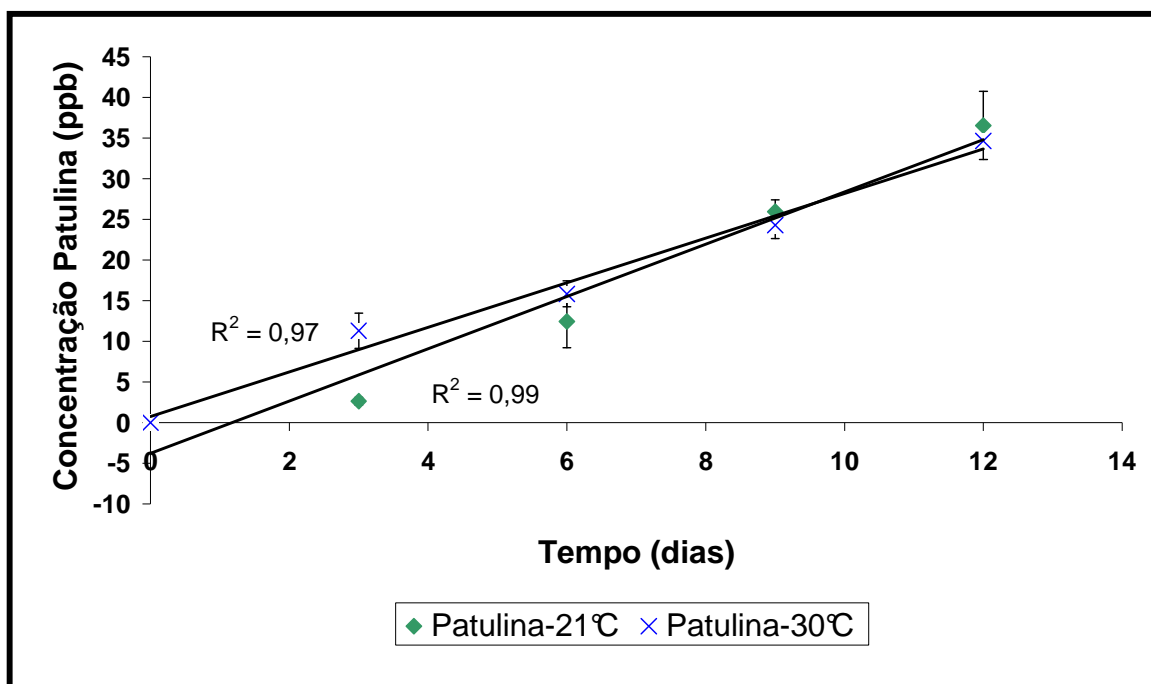


Figura 48: Produção de patulina à 21°C e 30°C por *B.fulva* IOC 4518 inoculado em suco clarificado de maçã com carga de 10⁰ esporos/100 mL.

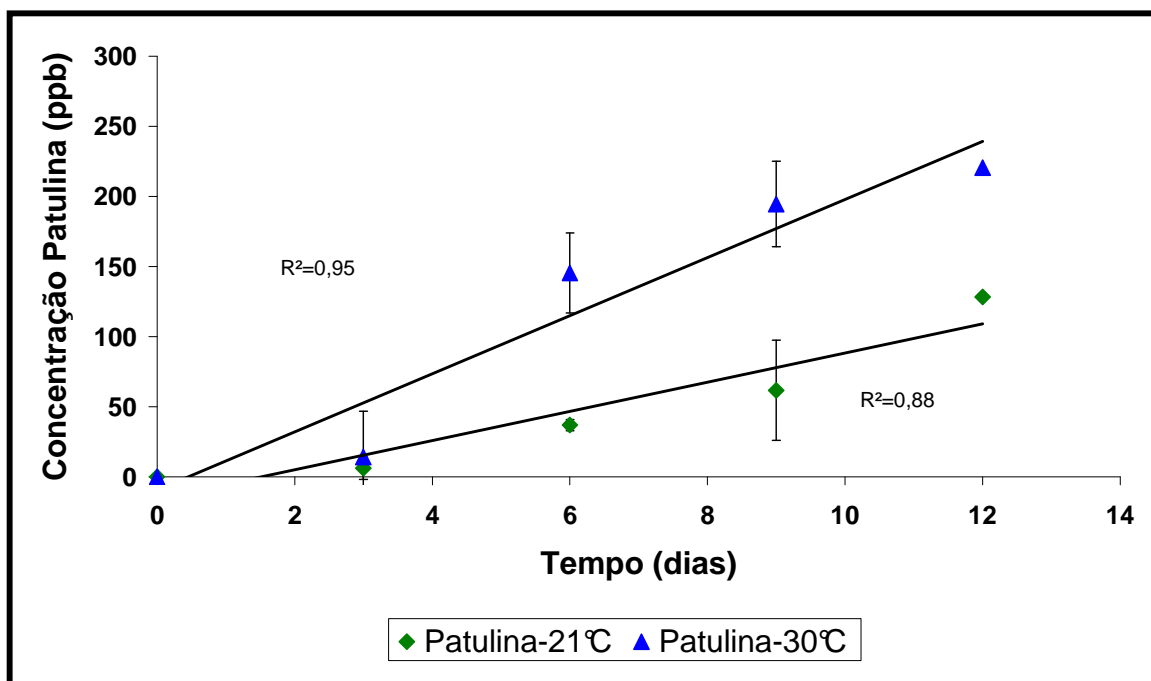


Figura 49: Produção de patulina à 21°C e 30°C por *B.fulva* IOC 4518 inoculado em suco clarificado de maçã com carga de 10¹ esporos/100 mL.

A produção da patulina por *B.fulva* IOC 4518 no suco de maçã contendo a carga de esporos de $10^0/100$ mL, foi maior a 30°C do que a 21°C ($p < 0,05$), no terceiro e sexto dias de estocagem. Valores médios de patulina (ppb) de $25,97 \pm 1,67$ e $36,53 \pm 4,18$ (21°C) e $24,30 \pm 1,67$ e $34,63 \pm 0,47$ (30°C), respectivamente, foram obtidos após nove e doze dias de incubação e não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Roland e Beuchat (1984a), reportaram que maior produção da patulina ocorreu à 21°C do que a 30°C e 37°C , quando *B.nivea* foi inoculado em suco de maçã. Rice et al. (1977), também encontraram maior produção de patulina por *B.fulva* em suco de uva ocorrendo à 18°C do que a 25°C , 30°C e 37°C .

Quando a carga de esporos de $10^1/100$ mL foi estudada, a concentração da patulina foi sempre maior à 30°C do que a 21°C , havendo diferença significativa ao nível de 95% ($p < 0,05$). Após doze dias de incubação à 30°C , concentrações de patulina de até $220,5 \pm 30,4$ ppb foram recuperadas do suco de maçã, enquanto quando a incubação ocorreu à 21°C , as concentrações recuperadas desta micotoxina foram de até $128,3 \pm 35,7$ ppb. Assim, a produção de patulina só se vê afetada grandemente pela temperatura quando uma carga mais elevada de esporos de *B.fulva* IOC 4518 ($10^1/100$ mL) esteve presente nas embalagens de suco.

No presente estudo, relações lineares entre a quantidade de patulina presente no meio (suco de maçã clarificado) e os tempos de estocagem foram observadas. Valores de R^2 de 0,99 e 0,97 foram obtidos para as amostras inoculadas com 10^0 esporos/100 mL à 21°C e 30°C , respectivamente, enquanto valores de R^2 de 0,95 e 0,88 foram obtidos para as amostras inoculadas com 10^1 esporos/100 mL à estas mesmas temperaturas.

O efeito da temperatura sobre a produção de patulina por *Byssochlamys* spp foi reportado por diversos autores. De acordo com Dombrink-Kurtzman e Engberg (2006), a produção de patulina por diferentes cepas de *B.nivea* atingiu valores máximos após 10 dias, enquanto valores mínimos foram observados nos dias 5 e 14 após a inoculação. De fato, Rice et al. (1977) e Roland et al. (1984) também relataram que a produção da patulina por *B. fulva* e *B.nivea* em suco de uva foi caracterizada por uma rápida queda após a concentração desta micotoxina ter atingido um valor máximo. A diferença de comportamento com relação à produção de patulina por *Byssochlamys* observada no presente estudo (relação linear entre tempo e quantidade de patulina) pode ser explicada pela baixa carga de esporos inoculados no suco (10^0 e $10^1/100$ mL), o que levaria a menor competição por nutrientes e conseqüentemente menor liberação de metabólitos que poderiam reagir com a patulina e inativa-la ou até mesmo inibir o crescimento do fungo. Nos estudos de Roland et al. (1984) e Rice et al. (1977) concentrações de conídios/ascósporos entre 10^2 e 10^3 UFC/mL foram utilizadas, e desta forma, uma rápida extinção do substrato e liberação de subprodutos do metabolismo podem ser esperadas, culminando com a redução da quantidade da micotoxina recuperada. Concentrações de esporos tão elevadas quanto as utilizadas por estes autores não foram aplicadas no presente estudo, pois o objetivo era verificar o comportamento e produção de patulina por *B.fulva* IOC 4518 de acordo com as cargas contaminantes normalmente encontradas em sucos de frutas pasteurizados (10^0 esporos/100 mL) ou numa faixa superior, mas também plausível de ocorrer (10^1 esporos/100 mL) (MASSAGUER, 2003). De acordo com a *Figura 48*, pode-se observar que a produção da patulina à 21°C não foi maior do que 30°C e mais uma vez o fator responsável por esta

diferença pode ter sido a carga de esporos inoculadas no suco. Com uma carga de esporos de 10^2 UFC/mL (ou maiores) conforme os estudos anteriormente citados, haveria maior competição por nutrientes, estresse e conseqüente queda da taxa de crescimento, com maior produção de patulina. O estresse proveniente de elevadas densidades do inóculo e a competição por nutrientes poderiam ser sinérgicos com a temperatura para maior produção da patulina. Quando os níveis de inóculo são reduzidos para 10^1 esporos/100 mL (menor competição por nutrientes) e o crescimento ocorre à 30°C (maior taxa de crescimento, ver *Tabela 29*), maior produção da patulina pôde ser observada provavelmente devido a uma maior disponibilidade de substrato. Assim uma maior quantidade inicial de esporos ($10^1/100$ mL) até um nível que não causaria estresse ou competição por nutrientes, culminaria com maior produção de patulina, com a temperatura mostrando mínima influência sobre a produção desta micotoxina à 21°C, desta forma, explicando o comportamento observado neste estudo.

Apesar deste ser o primeiro estudo a demonstrar que a carga de esporos pode influenciar a quantidade de patulina produzida por *Byssochlamys* dependendo da temperatura de estocagem, pesquisas mais profundas são necessárias para investigar os efeitos da temperatura, cargas de esporos e disponibilidade de substrato sobre a produção desta micotoxina.

Períodos de tempo maiores do que 12 dias de estocagem não foram utilizados no presente trabalho, pois estudos preliminares demonstraram que entre 10 e 12 dias de incubação, as amostras já estariam estufadas, o que impediria seu consumo. Esta abordagem foi adotada, pois este estudo deve ser acoplado a um modelo de avaliação de riscos para patulina e suco de maçã com ênfase para a probabilidade

de crescimento e produção de patulina por fungos termoresistentes sobreviventes à pasteurização.

Como concentrações de até 145 ppb de patulina foram recuperados em apenas seis dias após a inoculação (30°C e 10^1 esporos/100 mL), período de tempo em que as embalagens ainda não mostravam sinais visíveis de deterioração e os micélios fúngicos ainda de tamanho restrito (não maiores que 0,5 cm) apresentavam-se no fundo das garrafas (o fungo somente se disseminou por toda embalagem próximo aos 12 dias) deve-se considerar extremamente preocupante a possibilidade de sobrevivência ao processo térmico de fungos termoresistentes não somente por sua habilidade em deteriorar os produtos, mas também por questões de segurança dos produtos. Assim, comprova-se que mesmo se as maçãs estiverem livres de patulina no início do processo, a produção desta micotoxina poderá ocorrer também nas etapas pós-pasteurização, em adição, há a possibilidade de sucos contaminados com valores baixos de patulina (baseando-se no padrão estabelecido pela OMS de 50 ppb), como 10 ou 20 ppb poderem ter seus níveis no mínimo dobrados ou triplicados, considerando-se, por exemplo, uma carga de esporos presentes nas embalagens de 10^0 /100 mL durante a estocagem.

Desta forma, a adoção de medidas de controle durante a obtenção da matéria-prima (evitar o contato com o solo, principalmente), lavagem das frutas antes da prensagem (retirada de esporos presentes na superfície das frutas), controle da etapa de filtração do suco com terra diatomácea e da temperatura e tempo de pasteurização, devem ser seriamente observadas de maneira a prevenir a presença destes microrganismos no produto final.

Esta preocupação deve ser maior quando o suco não clarificado embalado em embalagens cartonadas for considerado, principalmente quando se consome o produto sem a abertura completa da embalagem (canudos). Neste caso, a observação visual dos micélios (0,5 cm) presentes em até 6 dias, por exemplo, poderia ser mascarada pelos materiais particulados presentes no suco não clarificado e ainda se a cepa não dispuser de capacidade vigorosa de deterioração, o consumo do suco pode ocorrer sem que sejam facilmente observadas alterações no sabor do produto, como foi observado nesta pesquisa.

5.12. Avaliação Quantitativa do Risco da Patulina em Suco de Maçã:

Os resultados da avaliação quantitativa de risco que consistiu de 1 simulação e 10000 iterações para determinar a concentração de patulina no suco de maçã a partir dos 15 cenários avaliados estão sumarizadas na *Tabela 30*. A convergência foi alcançada quando os dados gerados por cada célula de saída indicaram que a porcentagem de mudança nos percentis, média e desvio padrão tiveram alterações menores do que 1,5%.

Os gráficos com as distribuições de patulina no produto final para cada cenário são apresentados nas *Figuras 50 a 54*.

Tabela 30: Sumário dos resultados dos cenários da avaliação quantitativa de risco para patulina em suco de maçã simulados com @Risk.

Cenários	Faixa de contaminação por patulina (ppb) na matéria-prima	Carga de sobreviventes (esporos/100mL)	Temperatura de estocagem (°C)	Concentração Final - Patulina (ppb)			Porcentagem (%) de amostras acima de 50 ppb*	Tempo de estocagem (dias)
				Mínimo	Média	Máximo		
				1	Baixa (5-25)	(-)	(-)	0,01
2	Média (26-50)	(-)	(-)	0,04	3,85	27,88	0	---
3	Alta (51-400)	(-)	(-)	0,10	15,57	173,32	4,49	---
4	Baixa (5-25)	10 ⁰	21	32,75	34,21	45,05	0	(†)
5	Média (26-50)	10 ⁰	21	32,77	36,68	59,89	0,3	12
6	Alta (51-400)	10 ⁰	21	1,95	16,31	184,13	4,69	3
				12,26	27,95	196,24	7,93	6
				22,51	38,03	233,98	14,07	9
				32,79	48,47	266,33	29,91	12
7	Baixa (5-25)	10 ⁰	30	33,27	34,74	45,45	0	(†)
8	Média (26-50)	10 ⁰	30	9,66	13,56	36,77	0	3
				17,53	21,44	44,65	0	6
				25,39	29,24	52,17	0,09	9
				33,29	37,19	60,40	0,34	12

(-) Não há sobreviventes à pasteurização. (†) A concentração de patulina não ultrapassou o limite de 50ppb após estocagem por 12 dias.

*Valores em vermelho indicam tempos de estocagem/cenários nos quais o limite de 50ppb para patulina no suco de maçã foi ultrapassado.

(Tabela 30): continuação.

Cenários	Faixa de contaminação por patulina (ppb) na matéria-prima*	Carga de sobreviventes (esporos/100mL)	Temperatura de estocagem (°C)	Concentração Final - Patulina (ppb)			Porcentagem (%) de amostras acima de 50 ppb*	Tempo de estocagem (dias)
				Mínimo	Média	Máximo		
9	Alta (51-400)	10 ⁰	30	9,7	25,6	210,7	7,9	3
				17,6	33,5	218,5	11,9	6
				25,4	41,2	213,7	18,9	9
				33,3	49,2	228,4	31,9	12
10	Baixa (5-25)	10 ¹	21	0,4	1,1	12,5	0	3
				38,7	40,2	51,7	0,01	6
				77,8	79,3	90,8	100	9
				117	118,5	129,9	100	12
11	Média (26-50)	10 ¹	21	0,4	3,5	26,7	0	3
				38,7	42,6	65,8	2,9	6
				77,9	81,8	105	100	9
				117	120,9	144,1	100	12
12	Alta (51-400)	10 ¹	21	0,4	15,6	200,6	4,7	3
				38,8	54,7	239,7	48,1	6
				77,9	93,8	278,9	100	9
				117,1	133	318,0	100	12

*Valores em vermelho indicam tempos de estocagem/cenários nos quais o limite de 50ppb para patulina no suco de maçã foi ultrapassado.

(Tabela 30): continuação.

Cenários	Faixa de contaminação por patulina (ppb) na matéria-prima*	Carga de sobreviventes (esporos/100mL)	Temperatura de estocagem (°C)	Concentração Final - Patulina (ppb)			Porcentagem (%) de amostras acima de 50 ppb*	Tempo de estocagem (dias)
				Mínimo	Média	Máximo		
13	Baixa (5-25)	10 ¹	30	42,7	44,2	53,3	0,4	3
				108,8	110,3	121,8	100	6
				174,9	176,4	187,9	100	9
				240,9	242,5	253,9	100	12
14	Média (26-50)	10 ¹	30	42,8	46,7	69,9	13,3	3
				108,8	112,7	135,9	100	6
				174,9	178,8	202,1	100	9
				241,0	244,9	268,1	100	12
15	Alta (51-400)	10 ¹	30	42,8	58,7	243,8	64,9	3
				108,9	124,8	309,8	100	6
				174,9	190,9	375,9	100	9
				241,1	256,9	442,0	100	12

*Valores em vermelho indicam tempos de estocagem/cenários nos quais o limite de 50ppb para patulina no suco de maçã foi ultrapassado.

A divisão das matérias-primas (frutas) em faixas com relação à sua contaminação por patulina na etapa de recepção possibilitou uma clara avaliação do impacto da qualidade das frutas e práticas adotadas desde as etapas de pré-colheita até a chegada na indústria sobre os níveis da micotoxina presentes nos produtos finais. Considerando-se os cenários 1, 2 e 3 foi estimado que quando a contaminação das frutas, se encontrou na faixa “baixa” (5-25ppb), somente 0,05% das iterações (amostras) apresentaram níveis maiores que 10ppb (limite para patulina em sucos destinados a crianças). Já quando o nível de contaminação das frutas foi “médio” (26-50ppb), estimou-se que nenhuma das amostras apresentou valores superiores a 30 ppb, no entanto, 4,51% foram superiores a 10 ppb. Para a faixa de contaminação “alta” (51-400ppb), um valor médio de 15,6 ppb presente nos sucos de frutas foi estimado, e apesar de 95,5% das amostras apresentarem valores menores que 50 ppb, níveis de patulina entre 150 e 175 ppb poderiam ser encontrados em 0,07% das amostras (7 embalagens de um lote de suco de maçã contendo um total de 10⁴ embalagens). Estes dados demonstram o quão importante é o controle na etapa de recepção das frutas na indústria para garantir baixos níveis de patulina no produto final. De acordo com a FAO (FAO, 2003), lotes de frutas que apresentam qualidade inferior (> 10% das frutas com danos ou podres) devem ser rejeitados para o processamento do suco de maçã, pela possibilidade de atingir um nível inaceitável de patulina no produto final.

Diversos autores têm demonstrado que a ocorrência da patulina nos sucos de frutas é heterogênea com relação à incidência e às quantidades (WATANABE e SHIMIZU, 2005; SPADARO *et al.*; 2006; LEBLANC *et al.*, 2005; SYLOS e RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; IHA & SABINO, 2007). Assim, os dados obtidos nos

cenários 1, 2 e 3 podem ser considerados reproduzíveis do que ocorre na prática industrial com relação aos níveis de contaminação das matérias-primas e o efeito das etapas do processamento na redução dos níveis da micotoxina. Como a avaliação de riscos deve ser usada para a tomada de decisões para a gestão da segurança dos alimentos (RHO e SCHAFFNER, 2007), o estabelecimento de diferentes faixas de contaminação das maçãs pela patulina na etapa de recepção, foi considerado um procedimento adequado por permitir se traduzir mais facilmente para a prática industrial, medidas de controle cientificamente embasadas e que impactem na redução dos riscos dos níveis de patulina no suco de maçã ultrapassarem os limites internacionalmente estabelecidos. Um nível de 10% de frutas com partes apodrecidas (feridas causadas por fungos) é sugerido pela FAO (FAO, 2003) como medida para garantir que níveis maiores que 50 ppb de patulina não estarão presentes nos produtos finais. Diversos controles podem ser adotados para atingir-se este valor, dentre os quais, sugere-se: i) a implementação de um programa de fornecimento com qualidade e certificação dos fornecedores das frutas; ii) a implementação das boas práticas agrícolas e de ações baseadas no sistema APPCC, como o estabelecimento de critérios de compra levando-se em conta a incidência de defeitos e lesões, além da verificação *in loco* na indústria processadora do suco de maçã da incidência da patulina nos lotes de frutas recebidos (iii). Particularmente esta última medida teria como objetivo gerar informações sobre os lotes de frutas entrando nas fábricas, sua procedência e forma de colheita (manual ou mecânica, do solo ou das árvores, por exemplo), de maneira que o controle de qualidade possa reforçar a atenção nas etapas do processamento do suco de maçã que são mais efetivas para redução dos níveis de patulina (conforme mostrado

abaixo). Apesar do ideal ser o processamento de frutas com o mínimo possível de patulina ou com sua ausência, sabe-se que nas condições atuais de mercado, onde praticamente inexistem pomares destinados somente ao processamento do suco e também com as tecnologias disponíveis, tal fato na maioria das vezes não pode ser alcançado. No entanto, as medidas descritas acima devem ser eficazes para garantir que frutas contendo níveis de patulina e um padrão de distribuição semelhante aqueles apresentados até a faixa “média” sejam processadas. Níveis tão elevados de patulina nas maçãs (≥ 1000 ppb, por exemplo) algumas vezes reportados na literatura, indicam que tais frutas encontram-se totalmente apodrecidas, não devendo ser processadas já que estas concentrações são normalmente recuperadas das partes apodrecidas das maçãs (SYDENHAM *et al.*, 1995; SYDENHAM *et al.*, 1997 e LEGGOTT *et al.*, 2000).

Após a simulação dos cenários estudados, pôde-se observar que a distribuição da concentração final de patulina no suco de maçã foi caracterizada pela presença da maior parte dos dados concentrados na porção esquerda do gráfico. De acordo com os testes de bondade de ajuste de Chi-2, Kolmogorov-Smirnoff e Anderson-Darling utilizados para verificação do ajuste dos dados à distribuição probabilística, as distribuições do tipo BetaGeneral, Lognormal e InversaGaussiana foram as mais adequadas para representar a concentração de patulina no produto final, estando sempre ranqueadas entre as três primeiras distribuições.

Na *Figura 55* são mostrados os ajustes das distribuições Inversa Lognormal (A), BetaGeneral (B) e InversaGaussiana (C) para os cenários 10, 11 e 12. Em azul são apresentadas às distribuições dos dados em linha contínua em vermelho representa o ajuste da respectiva distribuição aos dados.

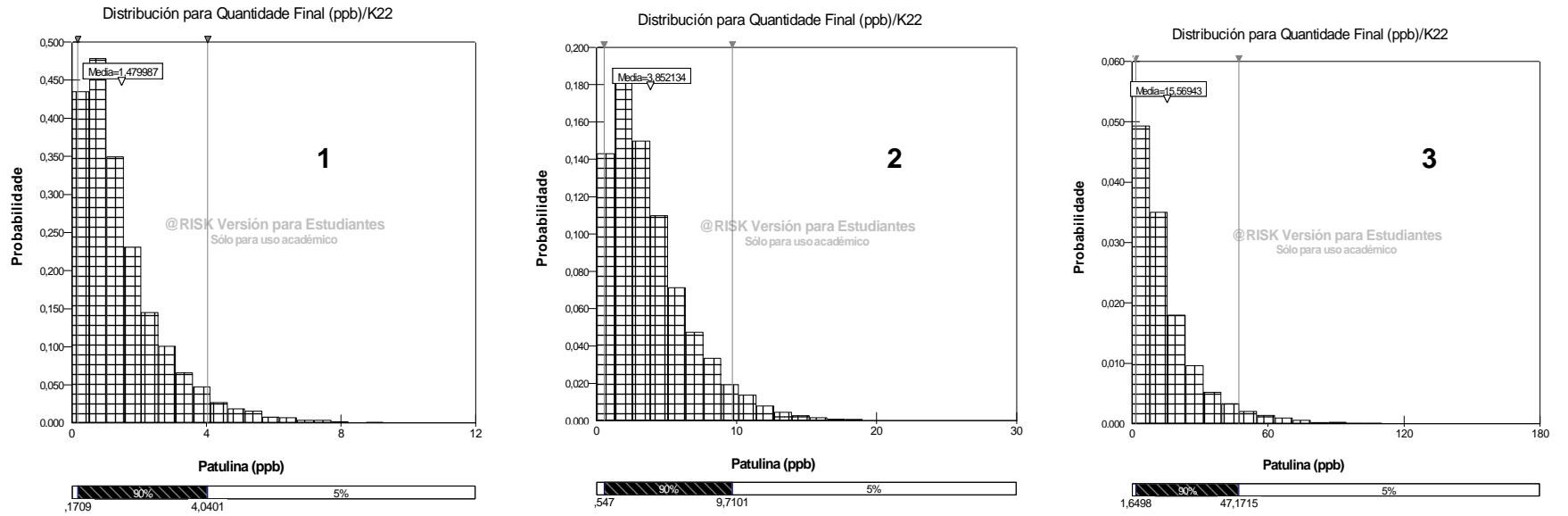


Figura 50: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 1, 2 e 3 (sem sobreviventes no suco).

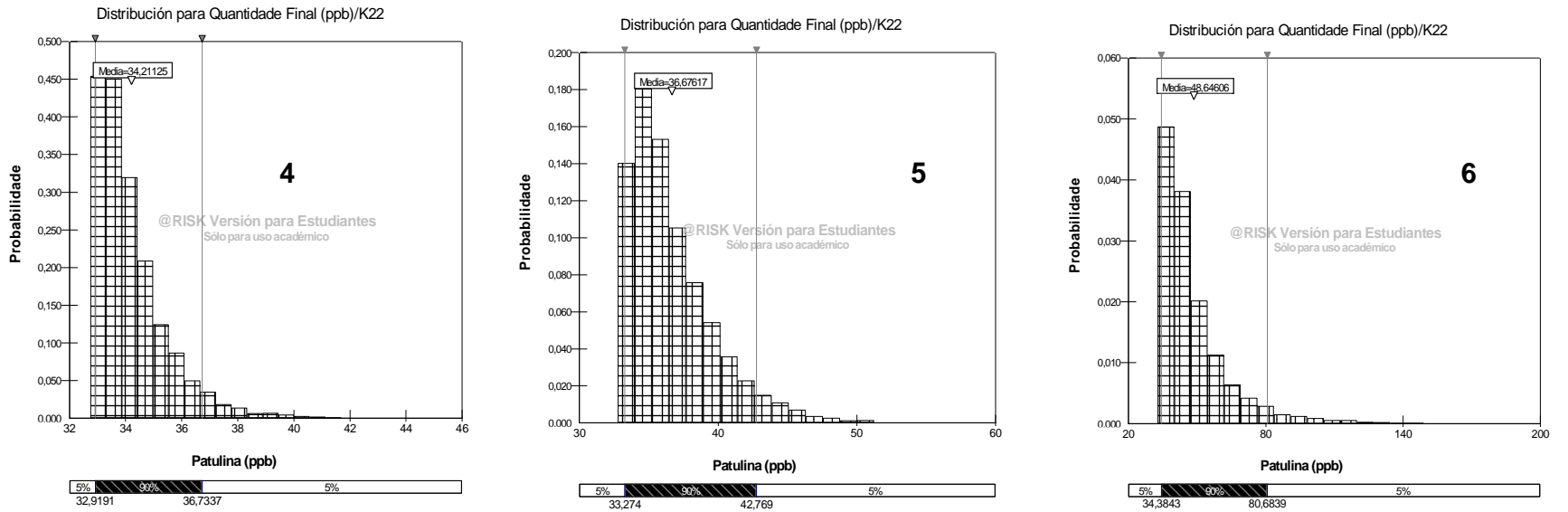


Figura 51: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 4, 5 e 6 com 12 dias de estocagem.

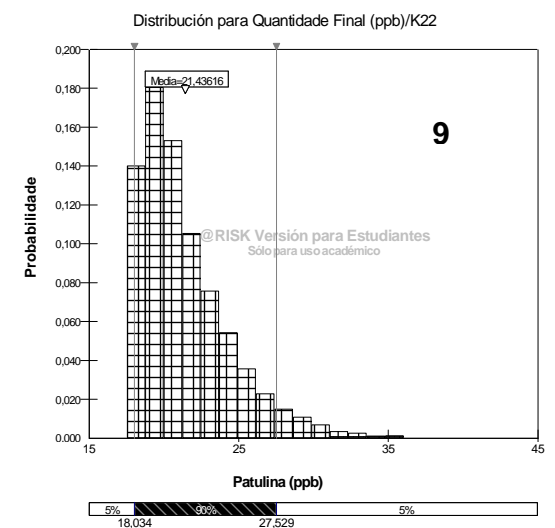
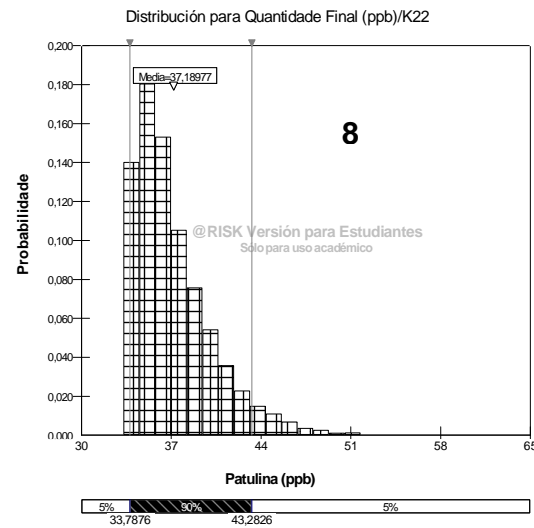
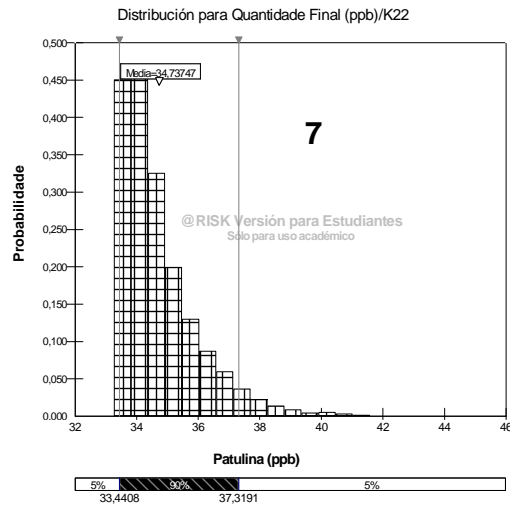


Figura 52: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 7, 8 e 9 com 12 dias de estocagem.

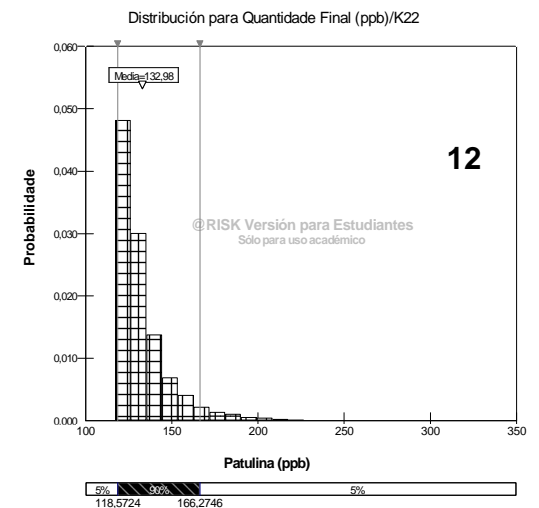
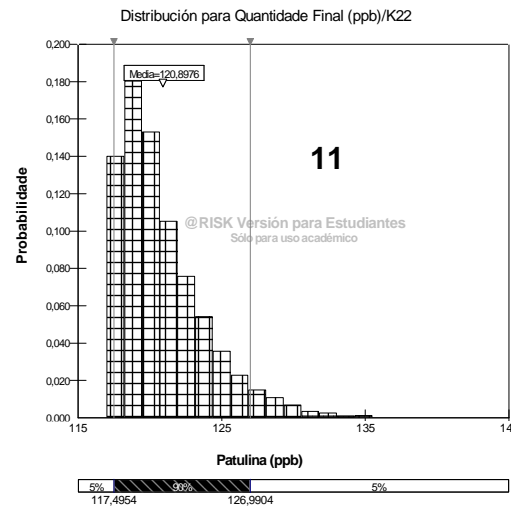
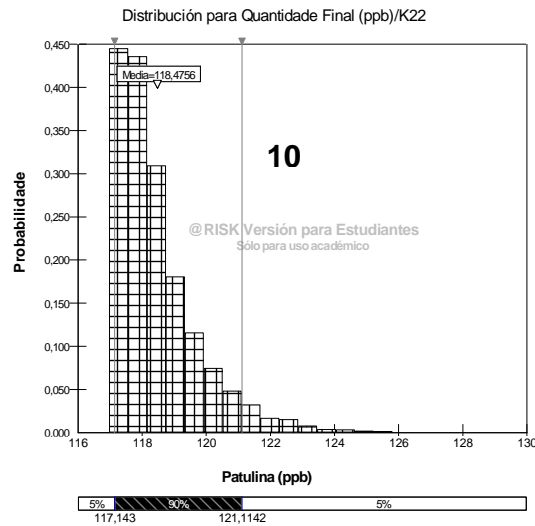


Figura 53: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 10, 11 e 12 com 12 dias de estocagem.

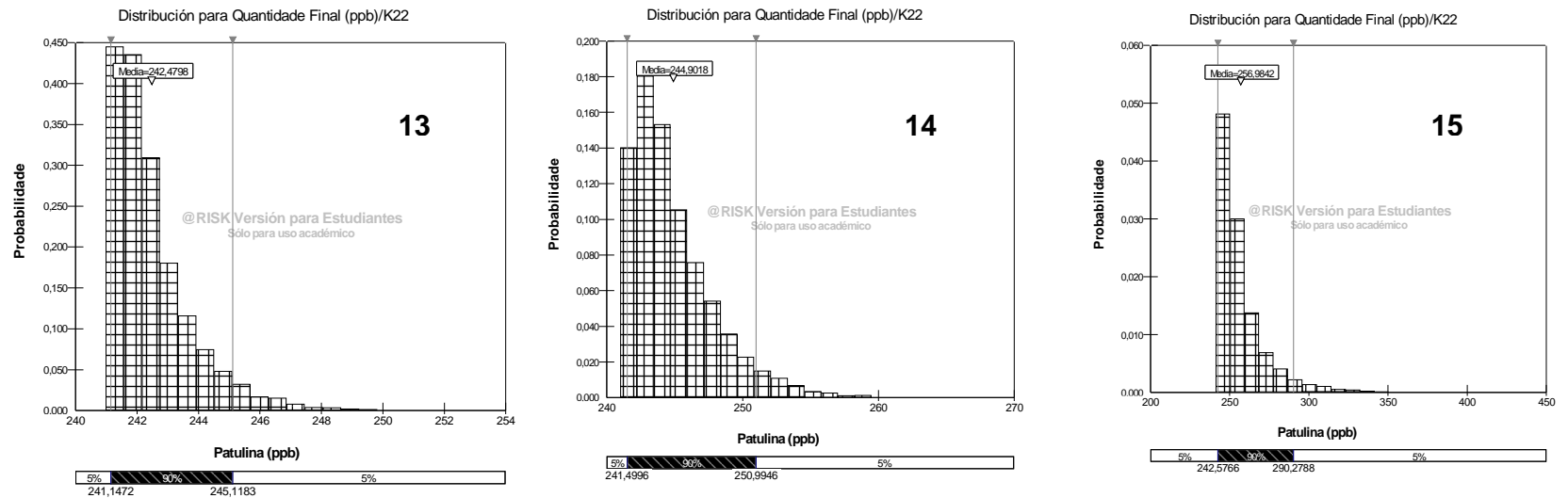


Figura 54: Distribuição de patulina no produto final para os cenários 13, 14 e 15 com 12 dias de estocagem.

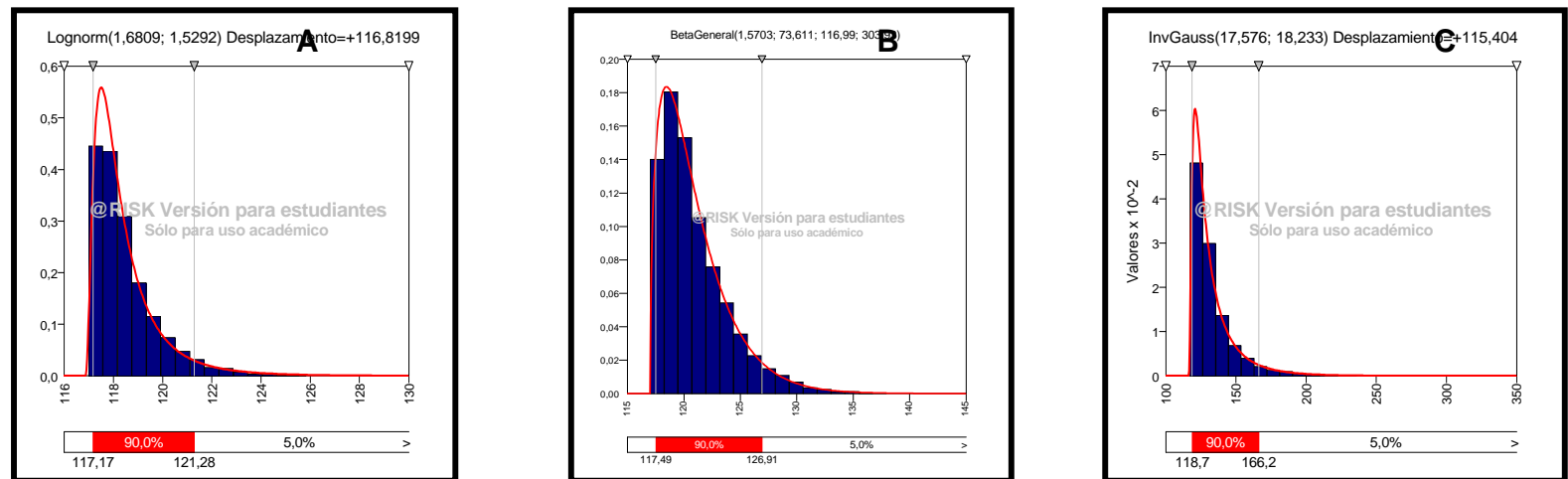


Figura 55: Ajuste da distribuição Lognormal, BetaGeneral e InversaGaussiana aos dados de concentração final de patulina dos cenários 10, 11 e 12, respectivamente.

Apesar das faixas de contaminação das matérias-primas poderem representar um padrão de ocorrência da patulina nas frutas para as condições atuais de controle, a melhoria do modelo de risco pode ser alcançada através de uma maior coleta de amostras de frutas durante períodos mais prolongados e em diferentes estações do ano, de maneira que fatores como umidade, temperatura do ambiente, incidência de espécies produtoras de patulina do total de cepas presentes, taxa de crescimento das cepas, taxa de produção de patulina e etc., já estejam diretamente considerados nos valores de patulina encontrados nas frutas no momento da recepção. A determinação de como tais fatores afetam a quantidade de patulina produzida é importante, todavia, o que se propõe aqui é não incluí-los pelo fato de culminarem com o aumento da incerteza do modelo de risco. Esta pode ser considerada uma vantagem do modelo de risco apresentado, já que fatores ambientais que afetariam o crescimento de fungos causadores da podridão azul e possível produção de patulina (incerteza) seriam considerados nas frutas quando na recepção na indústria. Assim, o modelo de risco poderia ser aplicado e modificado sempre que novas variáveis de entrada para a etapa de recepção estivessem disponíveis.

Nas *Figuras 56 à 60* são apresentados os valores dos coeficientes de correlação entre a quantidade final de patulina no suco de maçã e as etapas do processamento. Nestas figuras, valores positivos representam as variáveis que aumentam o risco, enquanto valores negativos as que reduzem o risco. Para todos os cenários avaliados, a etapa de recepção foi a que mais influenciou no aumento do risco do nível de patulina no produto final ultrapassar o limite de 50ppb, já que foi a única dentre as etapas nas quais se considerou variabilidade, em que valores positivos de R^2 foram obtidos. Além disso, deve-se considerar a limitação das demais

etapas (lavagem e seleção das frutas, filtração e pasteurização do suco) em reduzir os níveis de patulina. Maiores valores de R^2 positivos foram obtidos para todos os cenários que representam elevada contaminação das frutas (faixa alta – 51-400ppb) (cenários 3, 6, 9, 12 e 15), demonstrando maior influência desta etapa sobre o nível final de patulina do que nos cenários onde as faixas “média” e “baixa” foram avaliadas. Apesar da etapa de estocagem contribuir com a maior parte do risco (concentrações de patulina) nos diferentes cenários analisados (conforme *Tabela 31*), a sua ausência nos gráficos de correlação pode ser explicada pelo fato da etapa de estocagem do suco ter sido modelada através de uma abordagem determinística e o modelo somente considerar nos gráficos eventos com variabilidade estatística. As equações abaixo representam o comportamento do aumento linear dos níveis de patulina produzida por *B.fulva* IOC 4518 durante a estocagem do suco de maçã à 21°C e 30°C, de acordo com as cargas de esporos sobreviventes de $10^0/100\text{mL}$ e $10^1/100\text{mL}$. Onde, *equação 17* (21°C de temperatura de estocagem e carga de sobreviventes de 10^0 esporos/100mL), *equação 18* (30°C de temperatura de estocagem e carga de sobreviventes de 10^0 esporos/100mL), *equação 19* (21°C de temperatura de estocagem e carga de sobreviventes de 10^1 esporos/100mL) e *equação 20* (30°C de temperatura de estocagem e carga de sobreviventes de 10^1 esporos/100mL), sendo “y” a concentração de patulina (ppb).

$$y = 3,8423t - 9,43 \quad \text{Equação 17}$$

$$y = 2,6253t + 1,75 \quad \text{Equação 18}$$

$$y = 13,046t - 39,587 \quad \text{Equação 19}$$

$$y = 22,266t - 23,35 \quad \text{Equação 20}$$

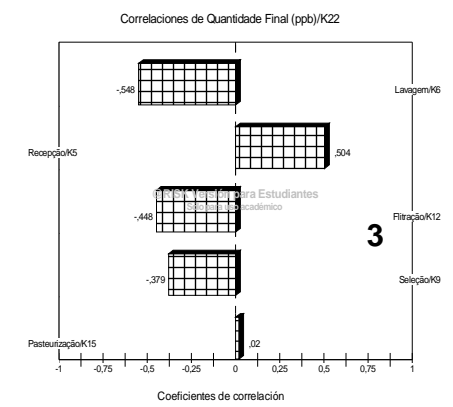
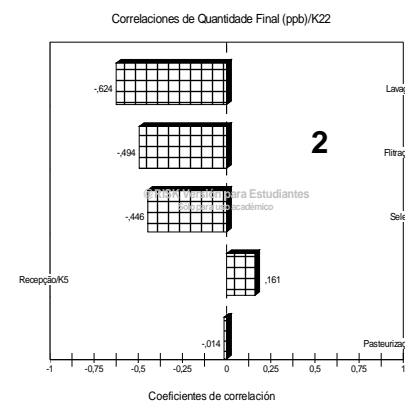
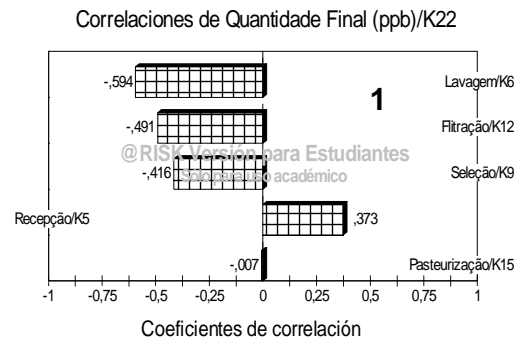


Figura 56: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 1, 2 e 3.

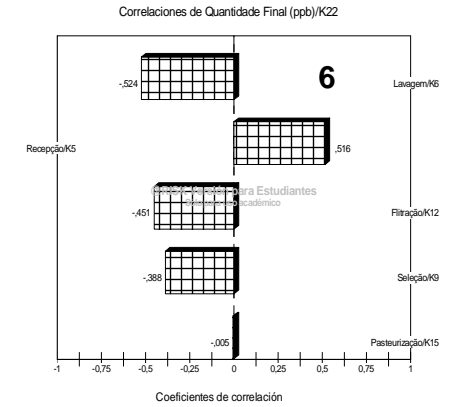
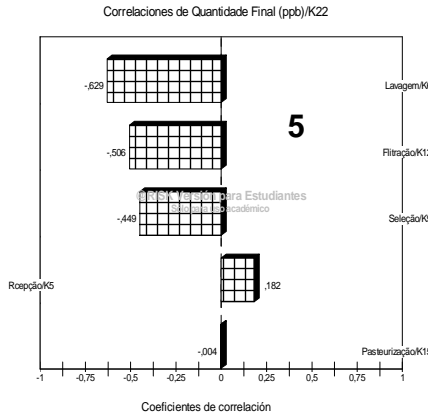
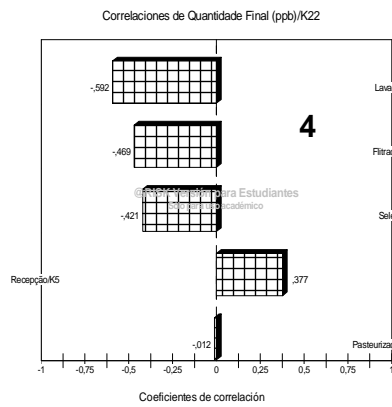


Figura 57: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 4, 5 e 6.

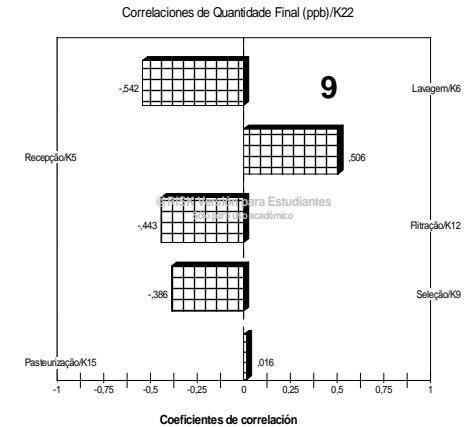
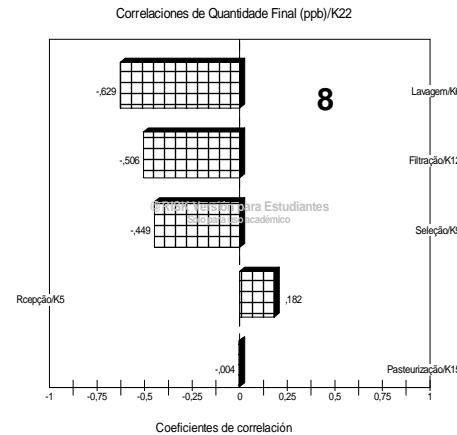
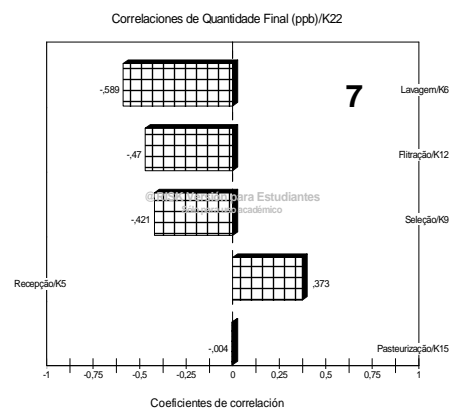


Figura 58: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 7, 8 e 9.

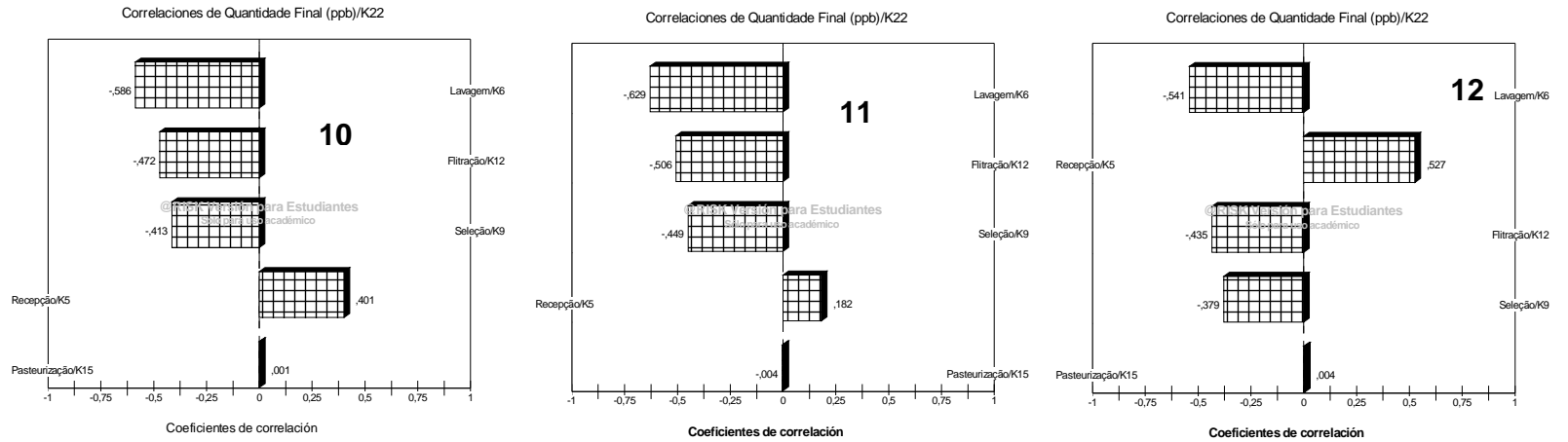


Figura 59: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 10, 11 e 12.

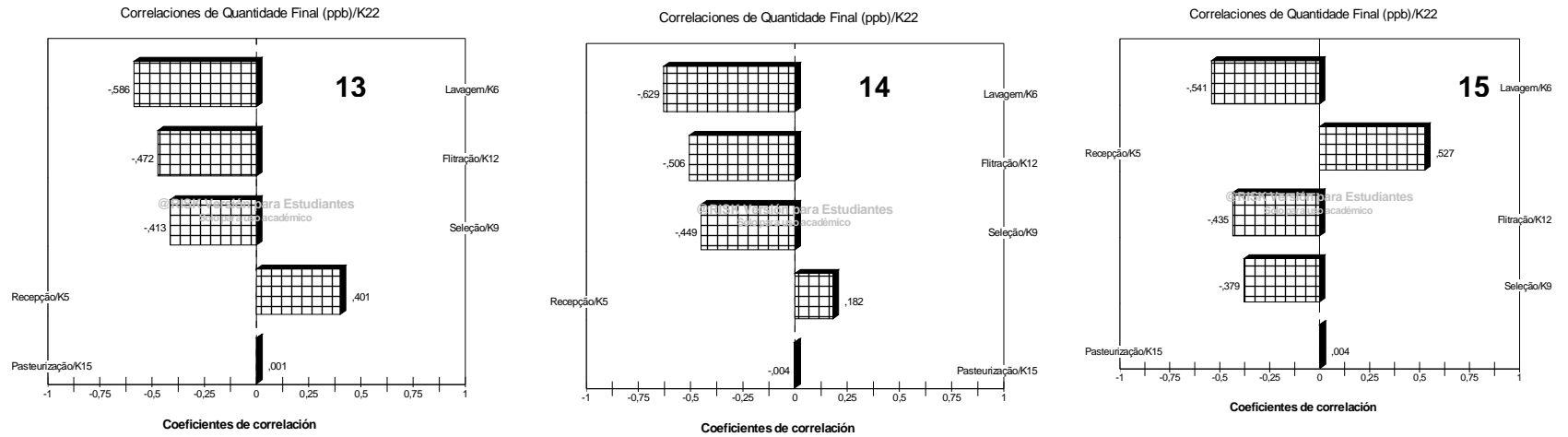


Figura 60: Gráficos de correlação entre a quantidade final de patulina e as etapas de fabricação do suco de maçã para os cenários 13, 14 e 15.

Dentre as demais etapas do processamento do suco (lavagem e seleção das frutas e filtração e pasteurização do suco), a lavagem demonstrou ser a etapa que mais influencia negativamente o risco (R^2 negativo), ou seja, foi a maior responsável pela redução dos níveis de patulina ultrapassar 50ppb, seguida da filtração do suco e da seleção das frutas. Na etapa de pasteurização como já era de se esperar valores de R^2 muito próximos a zero foram obtidos, o que indica que esta etapa praticamente não influencia na redução do risco. Este comportamento pode ser explicado pela elevada resistência térmica da patulina ao calor, principalmente em ambientes ácidos como o suco de maçã (LOVETT e PEELER, 1973; WHEELER, HARRISON e KOEHLER, 1987; KADAKAL, SEBAHATTIN e POYRAZOGLU, 2002; KADAKAL e NAS, 2003). Diferenças com relação aos valores de R^2 (maior efeito na redução dos níveis de patulina) foram observadas entre as etapas de lavagem das frutas, seleção das frutas e filtração do suco, quando se consideraram diferentes faixas de contaminação das matérias-primas.

Diversos estudos têm reportado reduções variadas nos níveis de patulina nas etapas de lavagem das frutas, seleção das frutas e filtração do suco. A variabilidade na redução da patulina pode ser explicada pela diferença em diversos fatores relacionados estritamente às etapas em questão. Na etapa de lavagem, por exemplo, o uso de água pressurizada com o auxílio de escovas, resultará provavelmente numa maior redução dos níveis da micotoxina do que quando tanques de flotação e água pressurizada são usados. O mesmo pode ser dito em função dos agentes sanificantes utilizados (por exemplo, cloro), conforme reportado por Jackson et al. (2003). Na etapa de seleção das frutas, fatores como a presença do número adequado de funcionários treinados para exclusão das frutas com mais do que 30%

de usa área comprometida pela podridão (KADAKAL e NAS, 2002) e o aproveitamento condicional (*trimming*) das demais frutas comprometidas (LOVETT, THOMPSON e BOUTIN, 1975) podem influenciar na variabilidade da redução da patulina. O mesmo pode ser dito para a etapa de filtração e clarificação do suco, a qual há diversas técnicas e materiais estão disponíveis, como o carvão ativado, gelatina/betonita, tratamento enzimático, centrifugação, ultrafiltração, floculação (BISSESSUR, PERMAUL e ODHAV, 2001; KADAKAL e NAS, 2002; HUEBNER *et al.*, 2000; GÖKMEN *et al.*, 2001; LEGGOTT *et al.*, 2001). Assim, é de se esperar que o efeito destas etapas sobre a patulina seja caracterizado por distribuições com grandes desvios padrões. De qualquer forma, a abordagem de se obter a distribuição a partir dos dados disponíveis na literatura para descrever os efeitos destas etapas sobre a patulina foi considerada mais adequada do que se estabelecer valores mínimo, mais provável e máximo de redução e utilização da distribuição Pert, por exemplo. Isto adicionaria uma incerteza muito grande ao modelo de risco, o que não acontece quando o procedimento de escolha da distribuição para representar o evento é o adotado no presente estudo, pois levam em conta as diferenças nos efeitos sobre a patulina de cada tratamento e condição a partir dos quais os dados foram obtidos.

Com relação aos bolores termoresistentes e a etapa de estocagem após a pasteurização e antes do consumo do suco, os cenários 4 à 9 focam a influência da sobrevivência destes microrganismos à pasteurização, como *B.fulva*, e que encontram condições para multiplicação no interior das embalagens com conseqüente produção da patulina. Conforme descrito previamente, a carga de ascósporos sobreviventes de 10⁹/100mL é a comumente encontrada em sucos de

frutas (HOCKING e PITT, 1984; MASSAGUER, 2003). Os cenários 10 a 15 representam carga de esporos sobreviventes de $10^1/100\text{mL}$, uma condição em que frutas com qualidade inferior e procedimentos adotados durante o transporte até a lavagem na indústria e filtração, não foram adequadamente realizadas. Tal carga de esporos não foi ainda reportada na literatura, mas foi considerada neste estudo para ilustrar e se determinar a magnitude dos riscos caso ela venha a ocorrer. Os cenários em que há sobrevivência dos esporos de bolores termoresistentes como *B.fulva* IOC 4518 devido à natureza não linear de sua cinética de inativação térmica, podem ser considerados plausíveis de ocorrerem em virtude dos resultados obtidos no experimento de efeito da pasteurização em sistema contínuo (item 5.10). Estes experimentos demonstraram que pequenas variações (aprox. 1°C) na temperatura de processo (nas seções de aquecimento e retenção) fizeram com que o número de reduções decimais variasse entre quatro até nenhuma redução. Considerando-se o baixo valor Z dos bolores termoresistentes (TOURNAS, 1994) e como variações de no mínimo 2°C ocorrem comumente nos trocadores de calor industriais, esporos destes microrganismos acabam sendo recuperados dos produtos finais, apesar de deverem teoricamente ser eliminados, por um processamento térmico satisfatoriamente desenhado.

Como a produção da patulina por *B.fulva* IOC 4518 no suco de maçã à 21°C e 30°C mostrou uma tendência de aumento linear durante o período de estocagem estudado (12 dias), incluiu-se a equação que descreveu tal fenômeno no modelo de risco e através da variação dos dias de estocagem (uma simulação com 10000 iterações) para cada cenário determinou-se o risco da quantidade de patulina ultrapassar o limite de 50ppb. A etapa de estocagem foi considerada altamente

importante para o aumento nas concentrações de patulina apesar de não constar nos gráficos de correlação, já que dependendo das condições de temperatura e carga de esporos, somente nesta etapa, o limite de 50ppb é ultrapassado sem levar-se em conta a patulina presente nas frutas. De acordo com os dados apresentados na *Tabela 31*, quanto maior a carga de contaminação da matéria-prima (níveis baixo, médio ou alto), menor a contribuição da patulina produzida na estocagem (pós-pasteurização) em relação à quantidade total de patulina presente no suco. Apesar disto, sempre maiores quantidades da micotoxina estarão presentes no suco quanto maior for a contaminação das matérias-primas. A contribuição da etapa de estocagem para as concentrações finais de patulina foi maior nos cenários nos quais a carga de sobreviventes foi de 10^1 esporos/100mL e a temperatura de estocagem foi de 30°C, com a porcentagem (%) de contribuição para que o limite de 50ppb da patulina fosse ultrapassado, atingindo níveis de 99, 98 e 94%, quando a faixa de contaminação da matéria-prima foi baixa, média e alta, respectivamente.

Tabela 31: Porcentagem de contribuição da etapa de estocagem pós-pasteurização do suco para o limite de 50ppb de patulina no produto final ser ultrapassado.

Carga de esporos sobreviventes (esporos/100mL)	Temperatura de estocagem (°C)	Cenário	Concentração de patulina (ppb) após pasteurização*	Concentração média de patulina (ppb) após 12 dias de estocagem	% de contribuição da estocagem do suco contendo sobreviventes para o limite de 50ppb ser ultrapassado
10 ⁰	21	4	1,48	34,23	95,6
10 ⁰	21	5	3,86	36,61	89,4
10 ⁰	21	6	15,72	48,46	67,6
10 ⁰	30	7	1,48	34,74	95,7
10 ⁰	30	8	3,86	37,12	89,6
10 ⁰	30	9	15,72	48,98	67,9
10 ¹	21	10	1,48	118,45	98,7
10 ¹	21	11	3,86	120,83	96,8
10 ¹	21	12	15,72	132,68	88,1
10 ¹	30	13	1,48	242,45	99,3
10 ¹	30	14	3,86	244,83	98,4
10 ¹	30	15	15,72	256,69	93,9

*Redução da patulina causada pelas etapas de lavagem e seleção das frutas e filtração e pasteurização do suco.

Pôde-se observar que quando o suco é estocado à 21°C e a carga de sobreviventes é de 10⁰esporos/100mL o limite de 50ppb de patulina no produto final não é ultrapassado mesmo após 12 dias quando a contaminação das frutas pela patulina na recepção é baixa (cenário 1). Em fato, isto se mostrou ser muito mais

dependente da redução da patulina pelas etapas de lavagem, seleção das frutas e filtração do suco, do que pela produção de patulina por *B.fulva*, já que níveis maiores do que 30ppb desta micotoxina foram produzidos pela cepa após 12 dias de estocagem. No entanto, quando a contaminação das frutas se encontrar na faixa média e se houver sobreviventes ao processo térmico (10^0 esporos/100mL) (cenário 5), após 12 dias de estocagem, 0,3% das amostras um lote estariam contaminadas com a patulina em níveis acima de 50ppb. Já para uma faixa alta de contaminação das frutas (cenário 6), com 3 dias de estocagem 4,7% das amostras já conteriam níveis de patulina maiores que 50ppb e com 12 dias aproximadamente 30%.

Ao se considerar temperatura de estocagem de 30°C e carga de esporos sobreviventes de 10^0 /100mL, assim como no cenário 4, no cenário 7, o nível de patulina não é ultrapassado mesmo após 12 dias. No cenário 8, já com 9 dias as primeiras amostras (0,09%) apresentariam patulina acima de 50ppb, com valores máximos de 60,4ppb sendo estimados após 12 dias de estocagem nestas condições. No cenário 9, níveis máximos de patulina já seriam encontrados em 7,9% das amostras mesmo após 3 dias de estocagem, com até 32% das amostras apresentando níveis de patulina acima de 50ppb com 12 dias de estocagem. É importante levar-se em conta que apesar de níveis maiores do que 50ppb terem sido alcançados nos cenários 3, 5, 6 à 9, a média dos níveis de patulina sempre estiveram abaixo deste valor. No entanto, como focado por Miller *et al.* (1998), os eventos mais importantes para contribuir com o risco são os extremos e por isto os valores máximos de patulina em cada cenário foram aqui considerados. Os cenários nos quais mesmo a média dos valores foram menores do que 50ppb, mais possuem poucas embalagens fora da faixa segura (>50ppb), são considerados inseguros por

permitirem poucos consumidores que tiverem acesso a tais embalagens serão expostos a valores maiores do que o limite provisional máximo de tolerância para ingestão diária (*Provisional maximum tolerance daily intake* - PMT-DI) de 0,4 µg / Kg de peso corpóreo estabelecidos pelo “*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*” - JECFA (WHO, 1996). Ao se levar em conta o limite de 10ppb para patulina em alimentos infantis, nenhum dos cenários estudados garantiria níveis menores do que 10ppb em valores médios ou máximos, enfocando a necessidade e importância do controle mais restrito e cuidadoso da qualidade da matéria para a segurança destes produtos especificamente. Isto é extremamente importante pelo fato de existirem no mercado sucos de maçã em embalagens individuais (200mL) destinadas ao consumo de crianças e desta forma, a PMT-DI para estes consumidores seria facilmente ultrapassada.

Nos cenários 10 e 11 o suco de maçã somente conteria níveis de patulina abaixo de 50ppb com 3 dias de estocagem, com níveis entre 129 e 144ppb sendo atingidos após 12 dias de estocagem e com 100% das amostras apresentando níveis de patulina acima de 50ppb, para os dois cenários. Nos demais cenários 12 à 15, ficou evidente a contribuição do crescimento de *B.fulva* sobrevivente à pasteurização e produção da patulina durante a estocagem, já que independente da temperatura e contaminação das maçãs na recepção pela micotoxina, os níveis máximos de patulina acima de 50ppb foram sempre observados. Em todos destes cenários os níveis médios da patulina já eram superiores à 50ppb em 100% das amostras após 6 dias. A análise dos níveis de patulina entre os 12 dias de estocagem dentro dos cenários 9 ao 14, demonstrou que os níveis médios de patulina no produto final

tendem a ultrapassar os 50ppb com menor tempo de estocagem à medida que se aumenta a quantidade de patulina nas matérias-primas (cenários 9 e 12, por exemplo). A análise do cenário 15 mostrou que o suco já apresentaria a patulina em níveis médios superiores ao limite internacional (50ppb) após 3 dias de estocagem. Isto quer dizer que mesmo que se tenham matérias-primas de excelente qualidade com relação à incidência de podridões e patulina, caso a contaminação por bolores termoresistentes seja alta, ou se falhas no processo térmico permitirem a sobrevivência de fungos com habilidade para produzir a patulina sem alterar significativamente os produtos e a embalagem (sinais de deterioração), níveis elevados da micotoxina já estarão presentes nos produtos poucos dias após a produção.

Em suma, o controle da qualidade da matéria-prima com relação à incidência de podridões causadas por fungos, o controle para evitar-se contato das frutas com o solo, a utilização de água potável e pressurizada para lavagem das frutas, em conjunto com a filtração com terra diatomácea (a qual é capaz de reter mais que 99% dos esporos de bolores termoresistentes) e controle restrito da pasteurização, principalmente com relação à **temperatura** e sua faixa de variação, devem ser consideradas como medidas para redução dos níveis de patulina nos sucos de maçã, seja ela produzida nas etapas pré-pasteurização ou pós-pasteurização. Apesar de não haver nenhum relato da produção de patulina por bolores termoresistentes sobreviventes ao processo térmico aplicado aos sucos de maçã, tal possibilidade tem sido considerada plausível de ocorrer por diversos pesquisadores (MOAKE, PADILLA-ZAKOUR e WOROBO, 2005; PATERSON, 2007). Assim, os resultados deste trabalho, demonstram que se cepas de *Byssochlamys* sobreviverem

à pasteurização do suco de maçã e forem produtoras de patulina, a saúde dos consumidores estará em risco pelo fato de que a multiplicação do fungo dentro das embalagens pode não ser notada mesmo após 9-12 dias, quando níveis da micotoxina já seriam superiores ao limite de 10ppb e 50ppb estabelecidos para sucos destinados às crianças e sucos de maçã, respectivamente.

O modelo de risco aqui apresentado pode ser considerado de fácil entendimento e aplicação, e os resultados obtidos permitem inclusive, que o modelo seja validado na prática através da coleta de amostras nos pontos referenciados e comparação com os valores obtidos em “quantidade final”, baseando-se principalmente nos cenários 1, 2 e 3, os quais devem representar situações comuns. Para melhoria do modelo, a consideração de diferentes taxas de crescimento de bolores termoresistentes produtores de micotoxinas deverá ser levada em conta, bem como sua habilidade de produzir a micotoxina em níveis variados sem alterar grandemente as características sensoriais do produto. Na etapa de estocagem, uma melhoria do modelo seria a determinação do comportamento de *Byssochlamys* em uma faixa maior de temperatura na qual há multiplicação, por exemplo, entre 12°C-35°C, de modo que a variabilidade seja considerada já no modelo de risco para esta etapa. No entanto, para isto, é preciso que cepas com elevada resistência térmica, não necessariamente igual, porém próximas, sejam utilizadas no estudo, visto que estas serão as selecionadas pelo processamento térmico. Também é preciso determinar-se a porcentagem de incidência de espécies de *Byssochlamys* e outros fungos termoresistentes produtores de micotoxinas que possam ocorrer nas matérias-primas e produtos finais. Além disso, novos estudos podem considerar a co-ocorrência de micotoxinas.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSÕES

Através desta pesquisa pôde-se concluir que:

- ⇒ A ocorrência de bolores termoresistentes nas amostras de suco de maçã é caracterizada por baixas contagens ($<10^0$ esporos/100mL);
- ⇒ A cepa isolada de uma amostra de suco de maçã (*Aspergillus carneus* – IOC 4519) não foi confirmada como um bolor termoresistente e apresenta característica psicotrófica;
- ⇒ As cepas de *B. fulva* IOC 4518 e *B.nivea* FRR 4421 tiveram sua identidade confirmada através das observações macroscópica e microscópica e através do sequenciamento genético do fragmento ITS;
- ⇒ O tempo ótimo de ativação em suco de maçã para as três cepas de *Byssochlamys* estudadas variou de 5 min à 20 min à 75°C, enquanto à 80°C observou-se inativação já a partir dos 5 min iniciais;
- ⇒ A capacidade de produzir a patulina foi confirmada para todas as três cepas estudadas (*B.nivea* FRR 4421, *B.nivea* ATCC 24008 e *B.fulva* IOC 4518). *B.fulva* IOC 4518 destacou-se por ser a única cepa a produzir a patulina nas embalagens cartonadas à 30°C, enquanto as cepas de *B.nivea* foram as maiores produtoras de patulina nas embalagens PET e cartonadas mantidas à 21°C;

- ⇒ *B.fulva* IOC 4518 foi determinada como a cepa mais termoresistente, resistindo ao choque térmico de 95°C por 5 min;
- ⇒ As curvas de destruição térmica de *B.fulva* IOC 4518 em suco clarificado de maçã foram sempre caracterizadas por ombros prolongados independente da temperatura, seguidas por uma queda abrupta (comportamento não logarítmico). Valores D* à 85°C, 90°C, 92°C e 95°C iguais a 64,58 min; 16,68 min; 6,31 min e 3,10 min, respectivamente foram obtidos. O valor Z foi igual a 7,4°C;
- ⇒ O processo de pasteurização do suco de maçã na unidade *Microthermics* mostrou que há variabilidade com relação ao número de reduções causadas pelo processo equivalente quando variações na temperatura de processo da ordem de até 1°C são observadas. Esta variação também foi observada dentro de um mesmo processo, em virtude do número de sobreviventes diferenciado obtido a partir da contagem das garrafas do suco pasteurizado;
- ⇒ Maiores probabilidades de crescimento de *B.fulva* IOC 4518 no suco de maçã estão relacionadas ao aumento da carga de esporos e temperatura de estocagem. Apesar de praticamente não haver diferença entre o tempo para metade das garrafas mostrarem sinais de crescimento ao se considerar uma mesma temperatura e diferentes cargas de esporos, pode-se concluir que maior extensão da deterioração ocorre nas condições em que a carga de esporos é maior (10^1 esporos/100mL);
- ⇒ O modelo de tempo para crescimento apresentou bom ajuste aos dados com fatores de Bias e exatidão próximos a 1 sendo obtido para as duas

condições de temperatura de estocagem (21°C e 30°C) e carga de esporos estudadas (10^0 e 10^1 esporos/100mL);

- ⇒ A produção de patulina por *B.fulva* IOC 4518 é influenciada principalmente pela temperatura de estocagem quando a carga de sobreviventes é de 10^1 esporos/100mL, com maiores quantidades da micotoxina sendo produzidas à 30°C do que à 21°C. Já quando a carga de esporos sobreviventes é de 10^0 /100mL ao final dos 12 dias de estocagem estudados, a produção da micotoxina não difere significativamente ($p>0,05$);
- ⇒ Através do modelo de risco pôde-se concluir que a etapa de recepção é sempre a que mais impactou para que níveis elevados de patulina estejam presentes nos sucos de maçã. Mas, a etapa de estocagem após a pasteurização quando há bolores termoresistentes sobreviventes, foi a responsável pelas maiores concentrações finais de patulina, à medida que se aumentava o tempo de estocagem;
- ⇒ As etapas de lavagem, filtração e seleção das frutas, respectivamente, são as responsáveis pela redução nos níveis de patulina durante o processamento do suco, enquanto a pasteurização em virtude da elevada resistência térmica da patulina praticamente não apresenta efeito algum para redução dos níveis da micotoxina no produto final;
- ⇒ A partir da análise dos cenários em que há possibilidade de sobrevivência de *B.fulva* à pasteurização pôde-se concluir que maiores riscos da quantidade de patulina ultrapassarem o limite de 50ppb estão associados à carga de esporos sobreviventes de 10^1 /100mL. No entanto a sobrevivência de

esporos na faixa de $10^0/100\text{mL}$ (que ocorre esporadicamente) também pode representar grandes riscos à saúde humana pelo fato de algumas amostras já apresentarem valores máximos acima deste valor após 3 dias de estocagem, dependendo da contaminação inicial das matérias-primas;

- ⇒ Dentre os cenários avaliados, somente nos de número 1, 2, 4 e 7 o limite de 50ppb de patulina não seria ultrapassado para nenhuma das iterações, considerando-se valores médios e máximos. Com relação ao limite de 10ppb (sucos destinados a alimentação infantil), nenhum cenário garantiria iterações com concentrações de patulina menores do que 10ppb considerando-se o valor máximo;
- ⇒ A distribuição da concentração de patulina no produto final se ajustou às distribuições do tipo Betageneral, Lognormal e Inversa Gaussiana, com a média e a maior parte dos dados se concentrando à esquerda;
- ⇒ Os resultados desta pesquisa indicam que medidas para o controle e redução dos níveis de patulina nos sucos de maçã devem não somente ser baseados em ações voltadas ao controle da incidência e controle do crescimento dos fungos produtores da podridão azul, como *Penicillium expansum*, mas também deve se preocupar com a incidência de bolores termoresistentes (como *B.fulva* e *B.nivea*) capazes de produzir a patulina sem que, no entanto alterações perceptíveis do produto sejam observadas antes do seu consumo.

CAPÍTULO 7

7. REFERÊNCIAS

1. ACAR, J., GÖKMEN, V., TAYDAS, E.E. The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A (European Food Research and Technology)**, v.207, n.4, p.328-331, 1998.
2. ACAR, J.; ARSAN, B. T. Stabilität von Patulin in Fruchtsäften. **Getraenkeindustrie**, v.8, p.717-719, 1989.
3. ACNIELSEN DO BRASIL. **TecnoBebidas 2006**. Disponível em: <http://br.acnielsen.com/events/documents/TECNOBEBIDAS_2006.pdf> Acesso em: 21 jan. 2007.
4. AKTERIAN, S.G.; FERNADEZ, P.S.; HENDRICKX, M.E.; TOBBACK, P.P.; PERIAGO, P.M.; MARTINEZ, A. Risk analysis of the thermal sterilization process. Analysis of factors affecting the thermal resistance of microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, n.1-2, p.51-57, 1999.
5. ALBAN, L.; OLSEN, A.M.; NIELSEN, B.; SORENSEN, R.; JESSEN, B. Qualitative and quantitative risk assessment for human salmonellosis due to multi-resistant *Salmonella* Thyphimurium DT104 from consumption of Danish dry-cured pork sausages. **Preventive Veterinary Medicine**, v.52, n.3-4, p.251-265, 2002.
6. ALDERTON, G.; SNELL, N. Chemical states of bacterial spores: heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. **Applied Microbiology**, v.19, n.4, p.565-572, 1970.
7. ANDERSEN, B.; SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J.C. *Penicillium expnsum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.8, p.2421-2428, 2004.
8. ARAGÃO, G.M.F. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termoresistentes isolados de polpa de morango**. Campinas, 1989. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
9. ARRANZ, I.; DERBYSHIRE, M.; KROEGER, K.; MISCHKE, C.; STROKA, J.; ANKLAM, E. Liquid chromatographic method for quantitation of patulin at 10

- ng/mL in apple-based products intended for infants: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v.88, n.2, p.518-525, 2005.
10. ARSÈNE, F.; TOMOYASU, T.; BUKAU, B. The heat shock response of *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, n.1-3, p.3-9, 2000.
 11. ARTIK N, ACAR J, KABRAMAN N, POYRAZOGLU E. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound, and organic acid compositions of apple juice. **European Food Research Technology**, v.213, n.3, p.194–9, 2001.
 12. ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food: part I. toxicological and legal aspects. **Fruit Processing**, v. 9, n. 3, p. 74-78, 1999.
 13. AWUAH, G.B.; ECONOMIDES, A.; SHAFER, B.D.; WENG, J. Lethality contribution from the tubular heat exchanger during high-temperature short-time processing of a model liquid food. **Journal of Food Process Engineering**, v.27, n.4 p.246-266, 2004.
 14. AYTAC S.A., ACAR J. Einflub von L-Ascorbinsäure und Schwefeldioxidzusatz auf die Stabilität von Patulin in Apfeläften und Pufferlösungen. **Ernährung**, v.1, p.15–17, 1994.
 15. BAERT, K., MEULENAER, B., KAMALA, A., KASASE, C., DEVLIEGHERE, F. Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. **Journal of Food Protection**, v.69, n.6, p.1371-1378. 2006.
 16. BAERT, K.; DE MEULENAER, B.; KASASE, C.; HUYGHEBAERT, A.; OGHE, W.; DEVLIEGHERE, F. Free and bound patulin in cloudy apple juice. **Food Chemistry**, v.100, n.3, p.1278-1282, 2007.
 17. BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. Campinas, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
 18. BAGLIONI, F.; GUMERATO, H.F.; MASSAGUER, P.R. Ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.258-263, 1999.
 19. BAILY, J.D.; TABUC, C.; QUÉRIN, A.; GUERRE, P. Production and stability of patulin, ochartoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid on dry cured ham. **Journal of Food Protection**, v.68, n.7, p.1516-1520, 2005.

20. BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL – BNDES. Exportações de Sucos e Polpas. **Informe Setorial**, n.18, p.1-5, dez., 2000.
21. BANNER, M.J.; MATTICK, L.R.; SPLITTSTOESSER, D.F. Chemical composition of the ascospores of *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.44, n.2, p.545-548, 1979.
22. BAYNE, H.G.; MICHENER, H.D. Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.3, p.449-453, 1979.
23. BEMRAH, N.; BERGIS, H.; COLMIN, C.; BEAUFORT, A.; MILLEMANN, Y.; DUFOUR, B.; BENET, J.J.; CERF, O.; SANAA, M. Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, n.1, p.17-30, 2002.
24. BERETTA, B., GAIASCHI, A., GALLI, C.L. RESTANI, P. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.5, p.399-406, 2000.
25. BEUCHAT, L.R.; PITT, J.I. Detection and enumeration of heat-resistant molds. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (ed.) **Compendium of the methods for the microbiological examination of foods**. 3th edition. Washington DC: APHA, 1992. p.251-264.
26. BEUCHAT, L.R.; PITT, J.I. Detection and enumeration of heat-resistant molds. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.) **Compendium of the methods for the microbiological examination of foods**. 4th edition. Washington DC: APHA, 2001. p.217-222.
27. BEUCHAT, L.R.; RICE, S.L. *Byssochlamys spp.* and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-289, 1979.
28. BHAT, R. **Mycotoxin contamination of foods and feeds**. Working document of the Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. MYC-CONF/99/4a. Tunis, Tunisia, 3-6 March 1999.
29. BISSESSUR, J., PERMAUL, K., ODHAV, B. Reduction of patulin during apple juice clarification. **Journal of Food Protection**, v.64, n.8, p.1216-1219, 2001.

30. BONETI, J.I.S., KATSURAYAMA, Y. **Doenças da macieira**. São Paulo: Basf, 1998. Estação Experimental de São Joaquim (Epagri). 85p.
31. BOONZAAIJER, G., BOBELDIJK, I., VAN OSENBRUGGEN, W.A. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. **Food Control**, v.16, n.77, p.587-591. 2005.
32. BOOTH, C. Fruit bodies in ascomycetes. In: **The fungi – An advanced treatise**. AINSWORTH, G.C., SUSSMAN, A.S. (Ed.). v.2: The fungal organism. Academic Press. New York. 1966. p. 133-150.
33. BRACKETT, R.E., MARTH, E.H. Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice. **Journal of Food Protection**, v.42, n.11, p.864-866, 1979.
34. BRASIL. 1988. Resolução nº4, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais. **Diário Oficial da União**, 19 de novembro de 1988.
35. BRASIL. Instrução Normativa Nº1, de 07 de Janeiro de 2000. Aprova regulamento técnico geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p.54, 10 jan., 2000.
36. BRAUN, G. World market(s) for apple juice concentrate 2003 – Missing apples? **Fruit Processing**, v.13, n.6, p.422-425, 2003.
37. BRAUSE, A.R.; TRUCKSESS, M.W.; THOMAS, F.S.; PAGE, S.W. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.79, n.2, p.451-45, 1996.
38. BROWN, M.; DAVIES, K.W.; BILLON, C.M.P.; ADAIR, C.; McCLURE, P.J. Quantitative microbiological risk assessment: principles applied to determining the comparative risk of salmonellosis from chicken products. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1446-1453, 1998.
39. BUCHANAN, R.L. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods “Principles of Risk Assessment for Illnesses caused by Foodborne Biological Agents”. **Journal of Food Protection**, v.60, n.1, p.1417-1419, 1997.
40. BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C. Risk assessment and predictive microbiology. **Journal of Food Protection**, Supplement, p.31-36, 1996.

41. BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C. Risk assessment: a means for linking HACCP plans and public health. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1531-1534, 1998.
42. BULLERMAN, L.B., OLIVIGNI, F.J. Mycotoxin producing potential of molds isolated from cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v.39, p.1166-1168, 1974.
43. BURDA, K. Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit products marketed in New South Wales. **Journal of Food Protection**, v.55, n.10, p.796-798, 1992.
44. BURMASTER, D.E.; ANDERSON, P.D. Principles of Good Practice for the use of Monte Carlo techniques in human health and ecological risk assessments. **Risk Analysis**, v.14, n.4, p.477-481, 1994.
45. BURROUGHS, L.F. Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. **Journal of AOAC International**, v.60, n.1, p.100-103, 1977.
46. BURTON, H. **UHT processing of milk and milk products**. London: Elsevier Applied Science Publishers. 1988.
47. BUTZ, P.; FUNTENBERGER, S.; HABERTDITZL, T.; TAUSCHER, B. High pressure inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.29, n.5-6, p.404-410, 1996.
48. CALVO, J., CALVENTE, V., ORELLANO, M.E., BENUZZI, D., TOSETTI, M.I.S. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. **International Journal of Food Microbiology**, (no prelo) doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.003, 2006.
49. CANÃS, P., ARANDA, M. Decontamination and inhibition of patulin-induced cytotoxicity. **Environmental Toxicological and Water Quality**, v.11, n.3, p.249-253, 1996.
50. CASELLA, M.L.A.; MATASCI, F.; SCHMIDT-LORENZ, W. Influence of age, growth medium, and temperature on heat resistance of *Byssoschlamys nivea* ascospores. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.23, n.5, p.404-411, 1990.
51. CASSIN, M.H.; LAMMERDING, A.M.; TODD, E.C.D.; ROSS, W.; McCOLL, R.S. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* 0157:H7 in ground beef hamburgers. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.1, p.21-44, 1998.

52. CASSIN, M.H.; PAOLI, G.M., LAMMERDING, A.M. Simulation modeling for microbial risk assessment. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1560-1566, 1998.
53. CELLI, M.G.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y.; COELHO, A.R.; GARCIA-CRUZ, C.A.; WOSIACKI, G. Incidence of patulin in apple juices marketed in Paraná State, Brazil. In: BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES, 6., 2006, São José do Rio Preto. **Anais...** São José do Rio Preto: UNESP, 2006. p.232.
54. CHAGAS, S.J.R. Maçã: importância do manejo pós-colheita na qualidade dos frutos. **Informe Agropecuário**, v.17, n.180, p.21-30, 1994.
55. CHEN, L., INGHAM, B.H., INGHAM, S.C. Survival of *Penicillium expansum* and patulin production on stored apples after wash treatments. **Journal of Food Science**, v.69, n.8, p.669-675, 2004.
56. CHERAGHALI, A.M., MOHAMMADI, H.R., AMIRAHMADI, M., YAZDANPANAH, H., ABOUHOSSAIN, G., ZAMANIAN, F., KHANSARI, M.G., AFSHAR, M. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. **Food Control**, v.16, n.2, p.165-167, 2005.
57. CLARKE, A. **Diseases and disorders of apples in Ontario**. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Plant Industry Branch/OMAF. Disponível em:
<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/apple_disorders/apple_disorders.html> Acesso em: 13 jan., 2007.
58. CODEX ALIMENTARIUS – **Maximum level for patulin in apple juice and apple juice ingredients and other beverages**. CODEX STAN 235. Rome: Codex Alimentarius, 2003a. p. 1.
59. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CODEX. **Codex General Standard for Fruit Juices and Nectars**. Codex Stan 247, p.1-15, 2005.
60. CODEX ALIMENTARIUS. **Code of Practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages**. CAC/RCP 50. Rome: Codex Alimentarius, 2003b. Disponível em: <
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/405/CXC_050e.pdf>. Acesso em: 21 jan., 2007, p.1-6.

61. CODEX ALIMENTARIUS. **Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment**. CAC/GL-30. Rome: Codex Alimentarius, 1999. Disponível em: <
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf>.
 Acesso em: 21 jan., 2007, p. 1-6.
62. COLE, R.J.; COX, R.H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. New York. Academic Press: 1981. p. 937.
63. COLEMAN, M.E.; MARKS, H.M. Qualitative and quantitative risk assessment. **Food Control**, v.10, n.4-5, p.289-297, 1998.
64. CONWAY, W.S., JANISIEWICZ, W.J., KLEIN, J.D., SAMS, C.E. Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of "Gala" apples. **HortScience**, v.34, n.4, p.700-704, 1999.
65. CZELUSNIAK, C.; OLIVIERA, M.C.S.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C.; WOSIACKI, G. Qualidade de maçãs comerciais produzidas no Brasil: aspectos físico-químicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.25-31, 2003.
66. DAMOGLU, A.P.; CAMPBELL, D.S.; BUTTON, J.E. Some factors governing the production of patulin in apples. **Food Microbiology**, v.2, n.1, p.3-10, 1985.
67. DANYLUK, M.D.; HARRIS, L.J.; SCHAFFNER, D.W. Monte Carlo simulations assessing the risk of salmonellosis from consumption of almonds. **Journal of Food Protection**, v.69, n.7, p.1594-1599, 2006.
68. DEINDOERFER, F.H.; HUMPHREY, A.E. Analytical method for calculating heat sterilization times. **Applied Microbiology**, v.7, n.4, p.256-264, 1959.
69. DEMAİN, A.L. Regulation of secondary metabolism in fungi. **Pure & Applied Chemistry**, v.58, n.2, p.219-226, 1986.
70. DHUMAL, S.S.; SALUNKHE, D.K. Mycotoxins in Foods. In: **Food Poisoning. Handbook of natural toxins**. Vol. 7. TU, A.T. (Ed.). New York: Marcel Dekker, 1992. p.291-334.
71. DODDS, K.L. Combined effect of water activity and pH on inhibition of toxin production by *Clostridium botulinum* in cooked, vacuum-packed potatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n.3, p.656-660, 1989.
72. DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; ENGBERG, A.E. *Byssochlamys nivea* with patulin-producing capability has an isoepoxydon dehydrogenase gene (*idh*)

- with sequence homology to *Penicillium expansum* and *P.griseofulvum*. **Mycological Research**, v.110, n.9, p.1111-1118, 2006.
73. DOORES, S. The microbiology of apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.19, n.2, p.133-149, 1983.
74. DRAUGHON, F.A., AYRES, J.C. 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**, v.28, n.6, p.1115-1117, 1980.
75. DRUSCH, S., KOPKA, S., KAEDING, J., Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, v.100, n.1, p.192-197, 2007.
76. EGMOND, H.P.V.; PAULSCH, W.E. Determination of mycotoxins. **Pure & Applied Chemistry**, v.58, n.2, p.315-326, 1986.
77. EISELE, T.A.; GIBSON, M.Z. Syringe-cartridge solid-phase extraction for patulin in apple juice. **Journal of AOAC International**, v.86, n.6, p.1160-1163, 2003.
78. ELLIOTT, P.H. Predictive microbiology and HACCP. **Journal of Food Protection**, Supplement, p.48-53, 1996.
79. ERRAMPALI, D. Effect of fludioxinil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in apple cvs. Empire and Gala. **Crop Protection**, v.23, n.9, p.811-817, 2004.
80. ERRAMPALI, D., NORTHOVER, J., SKOG, L., BRUBACHER, N.R., COLLUCI, C.A. Control of the blue mold (*Penicillium expansum*) by fludioxinil in apples (cv Empire) under controlled atmosphere and cold storage conditions. **Pest Management Science**, v.61, n.6, p.591-596, 2005.
81. ESCOULA, L. Toxigenic molds in silage. III. In vitro kinetics of patulin and Byssochlamyc acid biosynthesis by *Byssochlamys nivea* Westling in liquid medium. **Annals de Recherche Veterinaria**, v.6, p.155, 1975.
82. ETOA, F.X.; ADEGOKE, G.O. Changes in thermoresistance of some *Bacillus* spores after sublethal heat pretreatment. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.35, n.3, p.285-295, 1995.
83. EUROPEAN UNION. Commission Regulation n° 1425/2003 amending Commission Regulation n° 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels, Belgium, **Official Journal of the European Communities**, L203, 1-3, 2003.

84. FAIRCHILD, T.M.; SWARTZEL, K.R.; FOEGEDING, P.M. Inactivation kinetics of *Listeria innocua* in skim milk in a continuous flow processing system. **Journal of Food Science**, v.59, n.5, p.960-963, 1994.
85. 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, 73, Rome: FAO, p.1-124, 2003.
86. FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. FAO Food and Nutrition Paper 81. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.
87. FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Application of risk analysis to food standards issues**. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. World Health Organization. Geneva, 13-17 March. 39 p.
88. FARAGHER, J. Storage conditions affecting the life of fruit. **Agriculture Notes**, June, p.1-3, 2000.
89. FAS/USDA. World apple juice situation: global apple juice production recedes as China's apple crop declines, trade to continue strong in MY 2005/065. **Horticultural & Tropical Products Division**, USDA, May, p.1-6, 2006.
90. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. Appendix 3: **The *Vibrio parahaemolyticus* risk assessment simulation model**. U.S. Food and Drug Administration – Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Department of Health and Human Services. July 19, 2005. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vprax3.html>>. Acesso em: 20 nov. 2006.
91. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. **Draft risk assessment on the public health impact of *Vibrio parahaemolyticus* in raw molluscan shellfish**. U.S. Food and Drug Administration – Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Department of Health and Human Services. December, 2000. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~acrobat/vprisk.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2006.
92. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. **Patulin in Apple Juice, Apple Juice Concentrates**

- and Apple Juice Products.** U.S. Food and Drug Administration – Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Department of Health and Human Services. December, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/patubck2.html>>. Acesso em: 20 nov. 2006.
93. FORRESTER, P.I.; GAUCHER, G.M. M-hydroxybenzyl alcohol dehydrogenase from *Penicillium urticae*. **Biochemistry**, v.11, n.6, p.1108-1114, 1972.
94. GARCIA, G.; GENIGEORGIS, C. Quantitative evaluation of *Clostridium botulinum* nonproteolytic types B, E and F growth risk in fresh salmon tissue homogenates stored under modified atmospheres. **Journal of Food Protection**, v.50, n.5, p.390-397, 1987.
95. GARCIA, G.W.; GENIGEORGIS, C.; LINDROTH, S. Risk of growth and toxin production by *Clostridium botulinum* nonproteolytic types B, E and F in salmon filets stored under modified atmospheres at low and abused temperatures. **Journal of Food Protection**, v.50, n.4, p.330-336, 1987.
96. GENIGEORGIS, C.A.; MENG, J.; BAKER, D.A. Behaviour of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B and E spores in cooked turkey and modeling lag phase and probability of toxigenesis. **Journal of Food Science**, v.56, n.2, p.373379, 1991.
97. GIBSON, A.M.; HOCKING, A.D. Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.11, p.353-358, 1997.
98. GIOVANNINI, A.; PRENCIPE, V.; CONTE, A.; MARINO, L.; PETRINI, A.; POMILIO, F.; RIZZI, V.; MIGLIORATI, G. Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. **Food Control**, v.15, n.2, p.139-144, 2004.
99. GIRARDI, C., BENDER, R.J. Colheita e Pós-colheita. **Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves, jan. 2003. Produção Integrada de Maçãs no Brasil. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Maca/ProducaoIntegradaMaca/colheita.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2006.
100. GLOBAL ENVIRONMENT MONITORING SYSTEM/FOOD CONTAMINATION MONITORING AND ASSESSMENT PROGRAMME (GEMS) – WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities.** Food Safety Issues. Rome: WHO, Sept., 2003.

101. GÖKMEN, V., ACAR, J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. **Journal of Chromatography A**, v.815, n.1, p.99-102, 1998.
102. GÖKMEN, V., ACAR, J. Long-term survey of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.11 p.933-936, 2000.
103. GÖKMEN, V.; ACAR, J. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.847, n.1-2, p.69-74, 1999.
104. GÖKMEN, V.; ACAR, J.; SARIOGLU, K. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v.543, n.1-2, p.64-69, 2005.
105. GONÇALVES, J. S.; AMARO, A.A.; MAIA, M.L.; SOUZA, S.A.M. Produção, mercado e inserção internacional da maçã brasileira. **Agricultura em São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 95-136, 1996.
106. HAAS, C.H. Importance of distributional form in characterizing inputs to Monte Carlo risk assessments. **Risk Analysis**, v.17, n.1, p.107-113, 1997.
107. HAMMERSLEY, J.M. Monte Carlo methods for solving multivariable problems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 86, n.3, p. 844-874, 1960.
108. HARRISON, M.A. Presence and stability of patulin in apple products: a review. **Journal of Food Safety**, v.9, n.3, p.147-153, 1989.
109. HARWIG, J., CHEN, Y.K., KENNEDY, B.P.C., SCOTT, P.M. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.6, n.1, p.22-25, 1973.
110. HARWING, J.; SCOTT, P.M.; KENNEDY, B.P.C. Disappearance of patulin from apple juice fermented by *Saccharomyces spp.* **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.6, n.1, p.45-46, 1973.
111. HASAN, H.A.H. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, n.7, p.607-612, 2000.
112. HASAN, H.A.H. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p.607-612, 2000.

113. HATCHER, W.S.; WEIHE, J.L.; MURDOCK, D.I.; FOLINAZZO, J.F.; HILL, E.C.; ABRIGO, L.G. Growth requirements and thermal resistance of fungi belonging to genus *Byssochlamys*. **Journal of Food Science**, v.44, n.1, p.118-122, 1979.
114. HAYES A.W., PHILLIPS T.D., WILLIAMS W.L., CIEGLER A. Acute toxicity of patulin in mice and rats. **Toxicology**, v.13, n.2, p.91–100, 1979.
115. HEATLEY, N.E., PHILPOT, F.J. The routine examination for antibiotics produced by moulds. **Journal of General Microbiology**, v.1, p.232-237, 1947.
116. HOCKING, A.D., PITT, J.I. Food Spoilage fungi. II. Heat-resistant fungi. **CSIRO Food Research Quaterly**, v.44, n.4, p.73-82, 1984.
117. HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Moulds. In: MOIR, C.J.; ANDREW-KABILAFKAS, C.; ARNOLD, G.; COX, B.M.; HOCKING, A.D., JENSON, I. **Spoilage of processed foods: causes and diagnosis**. Waterloo DC: Southwood Press Pty. 2001. p.361-381.
118. HOFFMANN, M.V.G.S. **Estudo de resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã**. Florianópolis, 2004. 102 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
119. HOMAN, W.L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M.; van KNAPEN, F. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS-1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitological Research**, v.83, n.3, p.285-289, 1997.
120. HOORNSTRA, E., NORTHOLT, M.D., NOTERMANS, S., & BARENDZ, A. W. The use of quantitative risk assessment in HACCP. **Food Control**, v. 12, n. 4, p. 229-234, 2001.
121. HOPKINS J. The toxicological hazards of patulin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n.6, p. 455-456, 1993.
122. HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. In: HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; THRANE, U. **Advances in Food Mycology**. Advances in Experimental Medicine Biology – v.571. New York:Springer, 2006, p.211-224.

123. HUEBNER, H.J.; MAYURA, K.; PALLARONI, L.; AKE, C.L.; LEMKE, S.L.; HERRERA, P.; PHILLIPS, T.D. Development and characterization of a carbon-based composite material for reducing patulin levels in apple juice. **Journal of Food Protection**, v.63, n.1, p.106-110, 2000.
124. HUEMER, I.A.; KLIJN, N.; VOGELSANG, H.W.J.; LANGEVELD, P.M. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. **International Dairy Journal**, v.8, n.10, p.851-855, 1998.
125. IHA, M.H. **Suco de maçã: metodologia analítica para determinação de patulina e qualidade físico-química e microbiológica**. São Paulo, 2006, 150 p. Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública) – Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
126. IHA, M.H.; SABINO, M. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v.89, n.1, p.139-143, 2006.
127. IHA, M.H.; SABINO, M. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. **Food Control**, (2007), No prelo. doi:10.1016/j.foodcont.2007.05.001.
128. IKAWA, J.Y.; GENIGEORGIS, C. Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish fillets stored under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, n.2, p.167-181, 1986.
129. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **Some Naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v.40, p.83, 1986 (Updated – 22 abr. 1998).
130. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products. **Journal of Food Protection**, v.61, 8, p.1075-1086, 1998.
131. ITO, K.A.; SEEGER, M.L.; LEE, W.H. The destruction of *Byssoschlamys fulva* ascospores by low concentrations of gaseous methyl bromide and by aqueous solutions of chlorine, an iodophor and paracetic acid. **Journal of Applied Bacteriology**, v.35, n.3 p.479-483, 1972.

132. JACKSON, L.S., BEACHAM-BOWDEN, T., KELLER, S.E., ADHIKARI, C., TAYLOR, K.T. CHIRTEL, S.J., MERKER, R.I. Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider. **Journal of Food Protection**, v.66, n.4, p.618-624, 2003.
133. JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive microbiology: a review. **Biocontrol Science**, v.8, n.1, p.1-7, 2003.
134. JARDIM, I.C.S.F., COLLINS, C.H., GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Eds.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006, p.273-398.
135. JAYKUS, L.A. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety risks. **Critical Reviews in Microbiology**, v.22, n.4, p.279-293, 1996.
136. JESENSKÁ, Z.; PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D. Heat resistance of fungi from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.19, n.3 p.187-192, 1993.
137. JESENSKÁ, Z.; PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D. Heat resistant fungi in the soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.16, n.3, p.209-214, 1992, 1992.
138. JR GRESSONI, I. **APPCC base para sucos processados assepticamente**. Campinas, 2002. 196 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
139. JUNEJA, V.K.; MARKS, H.M. Growth kinetics of *Salmonella* spp pre- and post-thermal treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n.1-2, p.54-59, 2006.
140. KADAKAL, C., NAS, S. Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid, and some other properties of apple juice. **Nahrung/Food**, v.46, n.1, p.31-33, 2002a.
141. KADAKAL, C., NAS, S. Effect of apple decay proportion on the patulin, fumaric acid, HMF and other apple juice properties. **Journal of Food Safety**, v.22, n.1, p.17-25, 2002b.
142. KADAKAL, C., NAS, S. Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, n.9, p.987-990, 2003.

143. KADAKAL, Ç.; SEBAHATTIN, N.; POYRAZOCLU, E.S. Effect of commercial processing stages of apple juice on patulin, fumaric acid and hydroxymethylfurfural (HMF) levels. **Journal of Food Quality**, v.25, n.4, p.359-368, 2002.
144. KAROW, E.O., FOSTER, J.W. An antibiotic substance from species of *Gymnoascus* and *Penicillium*. **Science**, v.99, n.2570, p.265-266, 1944.
145. KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V.; MASSAGUER, P.R. The development of an analytical method for two mycotoxins, patulin and verrucologen, and survey of their presence in commercial tomato pulp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.3, p.269-273, 2002.
146. KIESSLING, K.H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure & Applied Chemistry**, v.58, n.2, p.327-338, 1986.
147. KING JR, A.D.; HALBROOK, W.U. Ascospores heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. **Journal of Food Science**, v.52, n.5, p.1252-1266, 1987.
148. KING JR., A.D.; MICHENER, H.D.; ITO, K.A. Control of *Byssochlamys* and related heat-resistant fungi in grape products. **Applied Microbiology**, v.18, n.2, p.166-173, 1969.
149. KING, A.D., BAYNE, H.G., ALDERTON, G. Nonlogarithmic death rate calculations for *Byssochlamys fulva* and other microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.3, p.596-600, 1979.
150. KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2002.
151. KOCA, N., EKSI, A. Reduction of patulin in apple juice concentrates during storage. **Journal of Food Safety**, v.25, n.1, p.1-8, 2005.
152. KRYGER, R.A. Volatility of patulin in apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.8, p.4141-4143, 2001.
153. KTOZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.410-412-437, 1997.
154. KUBACKI, S.J. The analysis and occurrence of patulin in apple juice. In: STEYN, P.S., VIEGGAAR, R. (Eds.). **Mycotoxins and Phycotoxins**. Elsevier, Amsterdam, p.293-304, 1986.

155. KUBACKI, S.J.; GOSZCZ, H. – IUPAC. HPLC methods for the determination of patulin in apple juice. **Pure & Applied Chemistry**, v.60, n.6, p.871-876, 1988.
156. KUPFERMAN, E. Controlled atmosphere storage of apples and pears. **Postharvest Information Network**, December, p.1-8, 2001.
157. LAI, C-L; FUH, Y-M; SHIH, D.Y-C. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.8, n.2, p.85-96, 2000.
158. LAIDOU, I.A., THANASSOULOPOULOS, C.C., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest pathogens. **Journal of Phytopathology**, v.149, n.7-8, p.457-461, 2001.
159. LAMMERDING, A.M. An overview of microbial food safety risk assessment. **Journal of Food Protection**, v.60, n.11, p.1420-1425, 1997.
160. LAMMERDING, A.M.; FAZIL, A.M.; PAOLI, G.M. Microbial Food Safety Risk Assessment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Org.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4thed. Washington DC: American Public Health Association, 2001. p.267-282.
161. LEA, A.G.H. Apple juice. In: HICKS, D. (Ed.). **Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages**. Blackie and Son, Glasgow, 1990. p.182-225.
162. LEATHERHEAD FOOD RESEARCH ASSOCIATION. **Patulin**. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/patufacts.htm>> Acesso em: 28 jul. 2005.
163. LEBLANC, J.C., TARD, A., VOLATIER, J.L. AND VERGER, P. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Dietary study. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.7, p.652-672, 2005.
164. LEGGOTT, N.L., SHEPHARD, G.S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, v.12, n.2, p.73-76, 2001.
165. LEGGOTT, N.L., SHEPPARD, G.S., STOCKENSTRÖM, S., STAAL, E., VAN SCHALKWYK, D.J., The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.9, p.825-829, 2001.

166. LEGGOTT, N.L., VISMER, H.F., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O. Occurrence of patulin in the commercial processing of apple juice. **South African Journal of Science**, v.96, n.5, p.241-243, 2000.
167. LENNOX, J.E., MCELROY, L.J. Inhibition of growth and patulin synthesis in *Penicillium expansum* by potassium sorbate and sodium propionate in culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.2, p.1031-1033, 1984.
168. LI, J.; WU, R.; HU, Q.; WANG, J. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. **Food Control**, v.18, n.5, p.530-534, 2007.
169. LIEU, F.Y.; BULLERMAN, L.B. Production and stability of aflatoxins, penicilic acid and patulin in several substrates. **Journal of Food Science**, v.42, n.5, p.1222-1228, 1977.
170. LINDQVIST, R.; WESTÖÖ, A. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, n.3, p.181-196, 2000.
171. LINDROTH, S.; GENIGEORGIS, C. Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish stored under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v.3, n.3, p.167-181, 1987.
172. LINDROTH, S.; von WRIGHT, A. Detoxification of patulin by adduct formation with cysteine. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.10, n.4-5, p.254-259, 1990.
173. LITTLE, C.R., HOLMES, R.J. Postharvest pathology of apples and pears. In: FARAGHER, J. (Ed.). **Storage Technology for Apples and Pears**. Victoria: Department of Natural Resources and Environment, 2000. p.154-197.
174. LIU, B.; WU, T.; YU, F.; WANG, C. Mycotoxin Patulin Activates the p38 Kinase and JNK Signaling Pathways in Human Embryonic Kidney Cells **Toxicological Sciences**, v.89, n.2, p.423-430, 2006.
175. LLOVERA, M.; VILADRICH, R.; TORRES, M.; CANELA, R. Analysis of underivatized patulin by a CG-MS technique. **Journal of Food Protection**, v.62, n.2, p.202-205, 1999.
176. LÓPEZ-MALO, A.; GUERRERO, S.; ALZAMORA, S.M. Probabilistic modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inhibition under the effects of water activity, pH, and potassium sorbate concentration. **Journal of Food Protection**, v.63, n.1, p.91-95, 2000.

177. LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Modeling the growth / no-growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* in mango puree. **Journal of Food Science**, v.65, n.3, p.516-520, 2000.
178. LOSS, C.R.; HOTCHKISS, J.H. Determination of thermal inactivation kinetics of microorganisms with a continuous microflow apparatus. **Journal of Food Protection**, v.67, n.11, p.2560-2564, 2004.
179. LOVETT, J., PEELER, J.T. Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. **Journal of Food Science**, v.38, n.6, p.1094-1095, 1973.
180. LOVETT, J., THOMPSON, R.G., BOUTIN, B.K. Patulin production in apples stored in a controlled atmosphere. **Journal of AOAC**, v.58, n.5, p.912-914, 1975.
181. LOVETT, J.; THOMPSON JR, R.G. Patulin production by species of *Aspergillus* and *Penicillium* at 1.7, 7.2, and 12.8°C. **Journal of Food Protection**, v.41, n.3, p.195-197, 1978.
182. LU, Y.; FOO, L.Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v.68, n.1, p.81-85, 2000.
183. LUND, B.M.; GRAHAM, A.F.; FRANKLIN, J.G. The effect of acid pH on the probability of growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, n.3, p.215-226, 1987.
184. LUND, B.M.; GRAHAM, A.F.; GEORGE, S.M.; BROWN, D. The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic, type B *Clostridium botulinum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, n.4, p.481-492, 1990.
185. LUND, B.M.; WYATT, G.M. The effect of redox potential, and its interaction with sodium chloride concentration, on the probability of growth of *Clostridium botulinum* type E from spore inocula. **Food Microbiology**, v.1, n.1, p.49-65, 1984.
186. LUPPIEN, J.R.; KENNY, M.F. Tolerance limits and methodology: effect on international trade. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1571-1578, 1998.
187. MAAS, M.R. Development and use of probability models: the industry perspective. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, n.3-5, p.162-167, 1993.

188. MAHFOUD, R.; MARESCA, M.; GARMY, N.; FANTINI, J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.181, n.3, p.1209-1218, 2002.
189. MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E.; PELKONEN, S.; JOHANSSON, T. A quantitative risk assessment of the public health impact of the Finnish *Salmonella* control program for broilers. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, n.1, p.21-35, 2005.
190. MALLMANN, C.A.; SARGENTI, S.R.; ALMEIDA, C.A.A. CEOLIM, J., BENOVI, S.C. **Patulin analysis by HPLC in apple juice commercialized at south of Brazil**. In: V Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia e Micotoxinas. 2006. Florianópolis: 18-21 de junho. PTR: 071, p.241.
191. MANCHINSKI JUNIOR, M. **Métodos analíticos para a determinação de patulina em suco de maçã**. São Paulo, 1994. 132 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Área de Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
192. MANCHISKY JUNIOR, M.; MÍDIO, A.F. Patulina em alimentos – aspectos toxicológicos e analíticos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.31, n.1, p.1-19, 1995.
193. MANCHISKY, M. MÍDIO, A.F. Incidência de patulina em jugo de manzana industrializado. **Alimentaria**, n.276, p. p.61-64. 1996.
194. MARCOLINO, V.A. **Quantificação de leveduras, bolores comuns e termoresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva**. Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
195. MARIN, S., MORALES, H., HASAN, H.A., RAMOS, A.J., SANCHIS, V. Patulin distribution in Fuji and Golden apples contaminated with *Penicillium expansum*. **Food Additives and Contaminants**, v.23, n.12, p.1316-1322, 2006a.
196. MARIN, S.; MORALES, H.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Evaluation of growth quantification for modelling the growth of *Penicillium expansum* in an apple-based medium. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, n.10, p.1468-1474, 2006b.

197. MARTINS, M.L., GIMENO, A., MARTINS, H.M., BERNARDO, F. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.6, p.568-574, 2002.
198. MASSAGUER, P.R. **Relatório Parcial do Projeto “Segurança microbiológica de sucos e drinks envasados assepticamente”**. Projeto nº035-02/98 PRODETAB, 2003.
199. McCLURE, P.J.; BLACKBURN, C.; COLE, W.; CURTIS, M.B. JONES, P.S.; LEGAN, J.E.; OGDEN, J.D.; PECK, K.M.W. ROBERTS, T.A.; SUTHERLAND, J.P.; WALKER, S.J. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food MicroModel Approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.265-275, 1994.
200. McDONALD, K.; SUN, D. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, n.1-2, p.1-27, 1999.
201. MCELROY D. M.; JAYKUS L.-A.; FOEGEDING P. M. A quantitative risk assessment for *Bacillus cereus* emetic disease associated with the consumption of Chinese-style rice. **Journal of Food Safety**, v.19, n.3, p.209-229, 1999.
202. McEVOY, I.J.; STUART, M.R. Temperature tolerance of *Aspergillus fischeri* var. *glaber* in canned strawberries. **Irish Journal of Agricultural Research**, v.9, n., p.59-67, 1970.
203. McKENZIE, K.S.; SARR, A.B.; MAYURA, K.; BAILEY, R.H.; MILLER, D.R.; ROGERS, T.D.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A.; PLATTNER, R.D.; KUBENA, L.F.; PHILLIPS, T.D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, n.8, p.807-820, 1997.
204. McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N.; ROOS, T.; RATKOWSKY, D.A. Predictive microbiology: theory and application. Taunton. **Research Studies**, p.1-86, 1993.
205. McNAB, W.B. A literature review linking microbial risk assessment, predictive microbiology, and dose-response modeling. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.17, n.7, p.405-416, 1997.
206. MELLO, L.M.R. Produção e mercado brasileiro de maçã. **Comunicado Técnico Nº 50**, Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves. Junho, p.1-4, 2004.

207. MHADHBI, H.; BENREJEB, S.; MARTEL, A. Studies on the affinity chromatography purification of anti-patulin polyclonal antibodies by enzyme linked immunosorbent assay and electrophoresis. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.12, p.1243-1251, 2005.
208. MILLER, A.J.; WHITIN, R.C.; SMITH, J.L. Use of risk assessment to reduce listeriosis incidence. **Food Technology**, v.51, n.4, p.100-103, 1997.
209. MILLER, C.J., LYNDON, R.M. **Process for reducing the patulin concentration in fruit juices**. United States Patent N° 6,248,382 B1, Jun. 19, p.1-13, 2001.
210. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Balança Comercial do Agronegócio**. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio. Departamento de Promoção Internacional do Agronegócio. Junho, p.1-6, 2005.
211. MOAKE, M.M., PADILLA-ZAKOUR, O.I., WOROBO, R.W. Comprehensive review of patulin control methods in Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.1, p.8-21, 2005.
212. MOODLEY, R.S., GOVIDEN, R., ODHAV, B. The effect of modified atmospheres and packaging on patulin production in apples. **Journal of Food Protection**, v.65, n.5, p.867-871, 2002.
213. MORALES, H., MARÍN, S., CENTELLES, X., RAMOS, A.J., SANCHIS, V. Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical control point for patulin accumulation. **International Journal of Food Microbiology**, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.004. 2007b.
214. MORALES, H., MARIN, S., ROVIRA, A., RAMOS, A.J., SANCHIS, V. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, n.1, p.30-35, 2007a.
215. MORALES, H., SANCHIS, V., ROVIRA, A., RAMOS, A.J., MARIN, S., Patulin accumulation in apples during postharvest: effect of controlled atmosphere storage and fungicide treatments. **Food Control**, doi:10.1016/j.foodcont.2006.10.008. 2006.
216. MORALES, R.A.; McDOWELL, R.M. Risk assessment and economic analysis for managing risks to human health from pathogenic microorganisms in the food supply. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1567-1570, 1998.

217. MOSS, M.O. Toxigenic Fungi and Mycotoxins. In: **The microbiological safety and quality of food**. Vol. II. LUND, B.M.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G.W. (Ed.). Gaithersburg: Aspen, 2000. p.1490-1517.
218. MOSS, M.O.; LONG, M.T. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.4, p.387-399, 2002.
219. MURPHY, G.; VOGEL, G.; KRIPPAHL, G.; LYNEN, F. Patulin biosynthesis: the role of mixed-function oxidases in the hydroxylation of m-cresol. **European Journal of Biochemistry**, v.49, n.2, p.443-455, 1974.
220. MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, p.r.51-r.65, 2006.
221. MUTLU, M., GÖKMEN, V. Determination of effective mass transfer coefficient (Kc) of patulin adsorption on activated carbon packed bed columns with recycling. **Journal of Food Engineering**, v.35, n.3, p.259-266, 1998.
222. NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, C.D.S.; FRANCO, B.D.G.M. Revisão: Aspectos básicos da microbiologia preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.41-51, 2000.
223. NERI, F., MARI, M., MENNITI, A.M., BRIGATI, S., BERTOLINI, P. Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. **Postharvest Biology and Technology**, v.41, n.1, p.101-108, 2006.
224. NOGUEIRA, A.; PHOLMAN, B.; WOSIACKI, G. Características de qualidade de cultivares de maçã: Avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.347-352, 2004.
225. NORTHOLT, M.D.; VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, v.41, n.11, p.885-890, 1978.
226. OLIVEIRA, F.S.; FRANCO, B.D.G.M. Análise de risco microbiológico: a nova ferramenta para gestão da segurança alimentar. **Higiene Alimentar**, v.17, n.108, p. 14-20, 2003.
227. OLLIVER, M.; RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v.53, p.166T-172T, 1934.

228. OSCAR, T.P. A quantitative risk assessment model for *Salmonella* and whole chickens. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, n.2, p.231-247, 2004.
229. OSSWALD, H.; FRANK, H.K.; KOMITOWSKI, D.; WINTER, H. Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-dawley rats and swiss mice. **Food Cosmetology Toxicology**, v.16, n.3, p.243-247, 1978.
230. OUGH, C.S., CORISON, C.A., Measurement of patulin in grapes and wines. **Journal of Food Science**, v.45, n.3, p.476-478, 1980.
231. PACHECO, C.P.P.; MASSAGUER, P.R. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. **Journal of Food Process Engineering**, v.27, n.6, p.449-463, 2004.
232. PALISADE CORPORATION. @ Risk.. Disponível em: <<http://www.palisade.com/risk>>. Acesso em: 20 mar. 2007.
233. PARTSCH, G.; DRAXLER, H.; ALTMANN, H. The ultra-structure of spores of *Byssoschlamys fulva*. **Mycophatologia**, v.39, n.3-4, p.305-313. 1969.
234. PASTER, N., HUPPERT, D., BARKAI-GOLAN, R. Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.1, p.51-58. 1995.
235. PATERSON, R.R.M. The isoepoxydon dehydrogenase gene for patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. **Mycological Research**, v.108, n.12, p.1-7, 2004.
236. PATERSON, R.R.M. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. **Process Biochemistry**, v.41, n.7, p.1467-1474, 2006.
237. PATERSON, R.R.M. Some fungicides and growth inhibitor/biocontrol-enhancer 2-deoxy-D-glucose increase patulin from *Penicillium expansum* strains in vitro. **Crop Protection**, v.26, n.4, p.543-548, 2007.
238. PEREZ, L.H. Produção e comércio internacional de maçã, 2003 a 2005. **Informações Econômicas**, v.36, n.9, p.53-61, 2006.
239. PÉREZ-RODRIGUEZ, F.; TODD, E.C.D.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; CARCÍA, R.M.; ZURERA, G. Linking quantitative exposure assessment and risk management using the food safety objective concept: an example with *Listeria monocytogenes* in different cross-contamination scenarios. **Journal of Food Protection**, v.69, n.10, p.2384-2394, 2006.

240. PFEIFFER E, DIWALD TT, METZLER M. Patulin reduces glutathione level and enzyme activities in rat liver slices. **Molecular Nutrition Food Research**, v.49, n.4, p.329-336, 2005.
241. PFEIFFER E., GROSS K., METZLER M. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. **Carcinogenesis**, v. 19, n.7, p.1313–1318, 1998.
242. PHILLIPS, T.D.; HAYES, A.W. Effects of patulin on adenosine triphosphatase activities in the mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.42, n.1, p.175-187, 1977.
243. PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D.; JESENSKÁ, Z. Heat resistant fungi isolated from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.22, n.4, p.297-299, 1994.
244. PIECKOVÁ, E.; SAMSON, R.A. Heat resistance of *Paecilomyces variotii* in sauce and juice. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.24, n.4, p.227-230, 2000.
245. PIEMONTESE, L., SOLFRIZZO, M., VISCONTI, A. Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.5, p.437-442, 2005.
246. PIERSON, C.F.; CEPONIS, M.J.; McCOLLOCH, L.P. **Market diseases of apples, pears, and quinces**. Washington: U.S. Agricultural Research Service, 112 p., 1971.
247. PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd edition. Gaithersburg. Aspen. 1999.
248. POHLAND, A.E., ALLEN, R. Stability studies with patulin. **Journal of AOAC International**, v.53, p.688-691, 1970.
249. PRADO, G., OLIVEIRA, M.S., CUNHA, M.R., GOMIDES, M.F., ABRANTES, F.M., SANTOS, L.G., VELOSO, T., BARROSO, R.E.S. Occurrence of patulin in apple juice marketed in Brazil by high-performance liquid chromatography. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.59, n.1-2, p.21-25, 2000.

250. PRIETA, J., MORENO, M.A., DÍAZ, S., SUÁREZ, G., DOMINGUEZ, L. La patulina como indicador de calidad em productos elaborados com manzana. **Alimentaria**, n.254, p.75-80, 1994.
251. PRIETA, J.; MORENO, M.A.; BLANCO, J.L.; SUÁREZ, G.; DOMÍNGUEZ, L. Determination of patulin by diphasic dialysis extraction and thin-layer chromatography. **Journal of Food Protection**, v.55, n.12, p.1001-1002, 1992.
252. PROGRAMA ALIMENTOS SEGUROS – PAS. **Análise de riscos na gestão da segurança de alimentos**. Ações Especiais – PAS. Vassouras. SENAI-DR/RJ. 2004. 44 p.
253. PUEL, O.; TADRIST, S.; DELAFORGE, M.; OSWALD, I.P.; LEBRIHI, A. The inability of *Byssochlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoepoxydon dehydrogenase genes. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.2, p.131-139, 2007.
254. RAISTRICK, H. Patulin in the common cold. **The Lancet**, v.2, p.625-630, 1943.
255. RAZAVILAR, V.; GENIGEORGIS, C. Prediction of *Listeria* spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, n.3, p.149-157, 1998.
256. REFRI BRASIL. **Analistas de diversas áreas apontam tendências para o setor de bebidas não-alcóolicas no Brasil**. Disponível em: <http://www.refribrasil.com.br/int.php?dest=not&tipo=ver&lang=br&codigo=47>. Acesso em 20 jan. 2007.
257. RHO, M-J; SCHAFFNER, D.W. Microbial risk assessment of staphylococcal food poisoning in Korean Kimbab. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.3, p.332-338, 2007.
258. RICE, S.L. Patulin production by *Byssochlamys* spp. in canned grape juice. **Journal of Food Science**, v.45, n.3, p.485-495, 1980.
259. RICE, S.L.; BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON, R.E. Patulin production by *Byssochlamys* spp. in fruit juices. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, n.6, p.791-796, 1977.
260. RITIENI, A. Patulin in Italian commercial apple products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, n.20, p.6086-6090, 2003.

261. RIZZON, L.A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.750-756, 2005.
262. ROBERTS, T.A., GIBSON, A.M., ROBINSON, A., Prediction of toxin production by *Clostridium botulinum* in pasteurised pork slurry. **Journal of Food Technology**, v.16, n.5, p.337–355, 1981.
263. ROBERTS, T.A.; JARVIS, B. Predictive modeling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. In: **Food Microbiology: Adv. And Prospects**. ROBERTS, T.A.; SKINNER, F.A. (Eds), New York. Academic Press. 1983. p.85-95.
264. ROLAND, J.O., BEUCHAT, L.R. Biomass and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂ and Temperature. **Journal of Food Science**, v.49, n.2, p.402-406, 1984.
265. ROLAND, J.O., BEUCHAT, L.R., WORTHINGTON, R.E., HITCHCOCK, H.L. Effects of sorbate, benzoate, sulfur dioxide and temperature on growth and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in grape juice. **Journal of Food Protection**, v.47, n.3, p.237-241, 1984.
266. ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R. Biomass and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂ and temperature. **Journal of Food Science**, v.49, n.2, p.402-406, 1984.
267. ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R.; HEATON, E.K. Viability of *Byssoschlamys nivea* in apple sauce containing sorbate, benzoate and sulfur dioxide and packaged under various oxygen levels. **Journal of Food Protection**, v.47, n.9, p.685-687, 1984.
268. ROOT, W.H.; BARRET, D.M. Apples and apple processing. In: BARRET, D.M.; SOMOGYI, L.; RAMASWAMY, H. (Ed.). **Processing Fruits: Science and technology**. Boca Raton. CRC Press. 2005.
269. ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v.81, n.5, p.501-508, 1996.
270. RUPP, H.S.; TURNIPSEED, S.B. Confirmation of patulin and 5-hydroxymethylfufural in apple juice by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v.83, n.3, p.612-620, 2000.
271. RUTLEDGE, P. Production of non-fermented fruit products. In: ARTHEY, D.; ASHURST, P.R. (Ed.). **Fruit Processing**. Chapman & Hall: Cambridge. 1996. p.70-94.

272. RYCHLIK, M. Rapid degradation of the mycotoxin patulin in man quantified by stable isotope dilution assays. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.9, p.829-837, 2003.
273. RYCHLIK, M. SCHIEBERLE, P. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47., n.9, p.3749-3755, 1999.
274. RYCHLIK, M., SCHIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research Technology**, v.212, n.3, p.274-278, 2001.
275. SALOMÃO, B.C.M. **Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos temoresistentes em produtos de frutas**. Florianópolis, 2002. 99p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina.
276. SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food- and airborne fungi**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.
277. SANDERSON, P.G., SPOTTS, R.A. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. **Phytopathology**, v.85, n.1, p.103-110, 1995.
278. SANDS, D.C., MCINTYRE, J.L., WALTON, G.S. Use of activated charcoal for the removal of patulin from cider. **Applied and Environmental Microbiology**, v.32, n.3, p.388-391, 1976.
279. SANHUEZA, R.M.V. Recomendações para o controle pós-colheita das podridões de maçãs. **Comunicado Técnico Embrapa**, Bento Gonçalves, n.21, p.1-4, jul. 1996.
280. SANTOS, I.M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, n.4, p.272-275, 2002.
281. SANTOS, L.D.; PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.; SILVA, N.C.C.; DENARDI, F. Composição química de sucos provenientes de maçãs de dez diferentes genótipos. Safra 2002/2003. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.2, p.87-91, 2005.

282. SCHAFFNER, D.W.; ROSS, W.H.; MONTVILLE, T.J. Analysis of the influence of environmental parameters on *Clostridium botulinum* time-to-toxicity by using three modeling approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.11, p.4416-4422, 1998.
283. SCHUMACHER, D.M.; METZLER, M. LEHMANN, L. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Archives of Toxicology*, v.79, n.2, p.10-121, 2004.
284. SCOTT, P.M., SOMERS, E. Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 16, n.3, p.483-485, 1968.
285. SECOM – SETOR DE PROMOÇÃO COMERCIAL (EMBAIXADA DO BRASIL EM TÓQUIO). **Boletim de mercado – O mercado de sucos de frutas no Japão**. Tóquio, p.1-12, 2006.
286. SEWRAM, V.; NAIR, J.J.; NIEWOUDT, T.W.; LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G.S. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.897, n.1-2, p.365-374, 2000.
287. SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Introduction to mycotoxins. In: **Mycotoxins and phytoalexins**. SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. (Ed.). Boca Raton: CRC Press. 1991. p.3-12.
288. SHEARER, A.E.H.; MAZZOTTA, A.S.; CHUYATE, R.; GOMBAS, D.E. Heat resistance of juice spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, v.65, n.8, p.1271-1275, 2002.
289. SHEPHARD, G.S.; LEGGOTT, N.L. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A*, v.882, n.1-2, p.17-22, 2000.
290. SHORTEN, P.R.; SOBOLEVA, T.K.; PLEASANTS, A.B.; MEMBRÉ, J.M. A risk assessment approach applied to the growth of *Erwinia carotovora* in vegetable juice for variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v.109, n.1-2, p.60-70, 2006.
291. SILVA, A.R. **Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente a pH e temperatura**. Campinas, 2006. 244 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
292. SINGER, M.; BERGER, P. **Genes & Genomes – A changing perspective**. Mill Valley, Blacwell, 1991, 929 p.

293. SIVAPALASINGAM, S.; FRIEDMAN, C.R.; COHEN, L.; TAUXE, R.V. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of food borne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, v.67, n.10, p.2342-2353, 2004.
294. SOMMER, N.F.; BUCHANAN, J.R.; FORTLAGE, R.J. Production of patulin by *Penicillium expansum*. **Applied Microbiology**, v.28, n.4, p.589-593, 1974.
295. SPADARO, D., CIAVORELLA, A., FRATI, S., GARIBALDI, A., GULLINO, M.L. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. **Food Control**, doi:10.1016/j.foodcont.2006.07.007. 2006.
296. SPLITTSTOESSER, D.F.; SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *Byssosclamyces fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science**, v.42, n.3, p.685-688, 1977.
297. SPLITTSTOESSER, D.F. Fungi of importance in processed fruits. In: **Handbook of Applied Mycology**. v.3: Foods and Feeds. ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G.; MARTH, E.H. (Ed.). Marcel Dekker. New York. 1991. p. 201-219.
298. SPOTTS, R., CERVANTES, L.A. Population, pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis spp.*, *Penicillium spp* and *Mucor piriformis* in packinhouses. **Plant Diseases**, v.70, n.2, p.106-108, 1986.
299. STABEL, J.R.; STEADHAM, E.M.; BOLIN, C.A. Heat activation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.12, p.4975-4977, 1997.
300. STEYN P. The biosynthesis of polyketide-derived mycotoxins. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.11, n.1, p.47-59, 1992.
301. STINSON, E.E.; OSMAN, S.F.; HUHTANEN, C.N.; BILLS, D.D. Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, n.4, p.620-622, 1978.
302. STOLOFF, L.; EGMOND, H.P.V.; PARK, D.L. Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.8, n.2, p.213-222, 1991.

303. STOTT, W.T.; BULLERMAN, L.B. Influence of carbohydrate and nitrogen source on patulin production by *Penicillium patulum*. **Applied Microbiology**, v.30, n.5, p.850-854, 1975.
304. STOTT, W.T.; BULLERMAN, L.B. Instability of patulin in cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v.41, n.1, p.201-203, 1976.
305. SWARTZEL, K.R. Arrhenius kinetics as applied to product constituent losses in ultra high temperature processing. **Journal of Food Science**, v.47, n.6, p.1886-1891, 1982.
306. SWARTZEL, K.R. Equivalent-point method for thermal evaluation of continuous-flow system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, n.3, p.396-401, 1986.
307. SWINDEMAN, A.M. Fruit packing and storage loss prevention guidelines. **Postharvest Information Network**, December, 1-9, 2002.
308. SYDENHAM, E.W., VISMER, H.F., MARASAS, W.F.O., BROWN, N., SCHLECHTER, M., VAN DER WESTHUIZEN, L., RHEEDER, J.P. Reduction of patulin in apple juice samples – influence of initial processing. **Food Control**, v.6, n.4, p.195-200, 1995.
309. SYDENHAM, E.W., VISMER, H.F., MARASAS, W.F.O., BROWN, N.L., SCHLECHTER, M., RHEEDER, J.P. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.5, p.429-434, 1997.
310. SYDENHAM, E.W.; VISMER, H.F.; MARASAS, W.F.O.; BROWN, N.; SCHLECHTER, M.; WESTHUIZEN, L.V.D.; RHEEDER, J.P. Reduction of patulin in apple juice samples – influence of initial processing. **Food Control**, v.6, n.4, p.195-200, 1995.
311. SYLOS, C.M., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Incidence of patulin in fruits and fruits juices marketed in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.16, n.2, p.71-74, 1999.
312. SYPOOS, Z.; REICHART, O.; MÉSZÁROS, L. Microbiological risk assessment in the beverage industry. **Food Control**, v. 16, n.6, p.515-521, 2005.
313. TANGNI, E.K., THEYS, R., MIGNOLET, E., MAUDOUX, M., MICHELET, J.Y., LARONDELLE, Y. Patulin in domestic and imported apple-

- based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.5, p.482-489, 2003.
314. TANIWAKI, M.H., BLEINROTH, E.W., DE MARTIN, Z.J. Bolores produtores de patulina em maçã e suco industrializado. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.19, N.1, p.42-49, 1989.
315. TANIWAKI, M.H., HOENDERBOOM, C.J.M., VITALI, A.A., EIROA, M.N.U. Migration of patulin in apples. **Journal of Food Protection**, v.55, n.11, p.902-904, 1992.
316. TANIWAKI, M.H.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; FLEET, G.B. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, n.1-2, p.125-133, 2001.
317. TANIWAKI, M.H.; HOENDERBOOM, C.J.M.; VITALI, A.A.; EIROA, M.N.U. Migration of patulin in apples. **Journal of Food Protection**, v.55, n.11, p.902-904, 1992.
318. THOMAS, L.V.; INGRAM, R.E.; YU, S.; DELVES-BROUGHTON, J. Investigation of the effectiveness of ascopyrone P as a food preservative. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, n.3, p.319-323, 2004.
319. THUVANDER, A., MÖLLER, T.; BARBIERI, H.E.; JANSSON, A.; SALOMONSSON, A.C.; OLSEN, M. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n.8, p.696-706, 2001.
320. TODA FRUTA. **História: cultura brasileira de maçã**. 2003. Disponível em:
http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=1470.
Acesso em 26 out. 2006.
321. TODA FRUTA. **Qualidade em frutas processadas – Indústria exige do agricultor alto padrão em produtos que virarão sucos, geléias e doces**. 2006. Disponível em:
http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=13914.
Acesso em: 13 dez. 2006.
322. TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.
323. TRAVIS, J.; RYTTER, J. **Fruit pathology fact sheets**. Penn State University. College of Agricultural Sciences. Disponível em:

<http://www.fpath.cas.psu.edu/Fruit_facts/apple/bluemold.html> Acesso em: 13 jan., 2007.

324. TREPTOW, R.O.; QUEIROZ, M.I.; ANTUNES, P.L. Caracterização físico-química e sensorial de quatro cultivares de maçãs (*Malus domestica* Borkh.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.3, p.170-184, 1995.
325. TRUCKSESS, M.W. Natural Toxins. In: HORWITZ, W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th edition. Gaithersburg: AOAC International, 2000. p.1-53.
326. TRUCKSESS, M.W.; TANG, Y. Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. **Journal of AOAC International**, v.82, n.5, p.1109-1113, 1999.
327. TSAO, R.; ZHOU, T. Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.11, p.5231-5235, 2000.
328. TSUCHIYA, M.; KITAZATO, H.; PAWLOWSKI, J. Analysis of internal transcribed spacer of ribosomal DNA reveals cryptic speciation in *Planolabratella opercularis*. **Journal of Foraminiferal Research**, v.33, n.4, p.285-293, 2003.
329. UYTENDAELE, M.; BAERT, K.; GHAFIR, Y.; DAUBE, G.; ZUTTER, L.; HERMAN, L.; DIERICK, K.; PIERARD, D.; DUBOIS, J.J.; HORION, B.; DEBEVERE, J. Quantitative risk assessment of *Campylobacter* spp in poultry based meat preparations as one of the factors to support the development of risk-based microbiological criteria in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, n.2 p.149-163, 2006.
330. VALOR ECONÔMICO. **Femsa e Coca-Cola compram Del Valle**. Disponível em: <http://noticias.uol.com.br/economia/ultnot/valor/2006/12/20/ult1913u62233.jhtm> . Acesso em 20 jan. 2007.
331. VAN DER RIET, W.B.; BOTHA, A.; PINCHES, S.E. The effect of dimethyldicarbonate on vegetative growth and ascospores of *Byssoschlamys fulva* suspended in apple juice and strawberry nectar. **International Journal of Food Microbiology**, v.8, n.2, p.95-102, 1989.
332. VOSE, D. **Risk Analysis**. 2nd. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.

333. WALLS, I. Role of quantitative risk assessment and food safety objectives in managing *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. **Meat Science**, v.74, n.11, p.66-75, 2006.
334. WALLS, I.; SCOTT, V.N. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, n.2-3, p.97-102, 1997.
335. WATANABE, M., SHIMIZU, H. Detection of patulin in apple juices marketed in the Tohoku District, Japan. **Journal of Food Protection**, v.68, n.3, p.610-612, 2005.
336. WATKINS, K.L., FAZEKAS, G., PALMER, M.V. Patulin in Australian apple juice. **Food Australia**, v.42, n.9, p.438-439, 1990.
337. WATSON, D.H.; LINDSAY, D.G. A critical review of biological methods for the detection of fungal toxins in foods and foodstuffs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.33, n.1, p.59-67, 1982.
338. WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. **Journal of Food Science**, v.60, n.3, p.446-450, 1995.
339. WHEELER, J.L., HARRISON, M.A., KOEHLER, P.E. Presence and stability of patulin in pasteurized apple cider. **Journal of Food Science**, v.52, n.2, p.479-480, 1987.
340. WHITE, S.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A.D.W. Cloning and molecular characterization of *Penicillium expansum* genes upregulated under conditions permissive for patulin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.255, n.1, p.17-26, 2006.
341. WHITING, R. C.; ORIENTE, J. C. Time-to-turbidity model for nonproteolytic type B *Clostridium botulinum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n.1, p. 49-60, 1997.
342. WHITING, R.C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.6, p.467-494, 1995.
343. WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v.10, n.2, p.175-177, 1993.
344. WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella* Enteritidis in pasteurized liquid eggs. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, n.2-3, p.111-125, 1997.

345. WHITING, R.C.; CALL, J.E. Time of growth model for proteolytic *Clostridium botulinum*. **Food Microbiology**, v.10, n.4, p.295-301, 1993.
346. WHITING, R.C.; HOGUE, A.; SCHLOSSER, W.D.; EBEL, E.D.; MORALES, R.A.; BAKER, A.; McDOWELL, R.M. A quantitative process model for *Salmonella* Enteritidis in shell eggs. **Journal of Food Science**, v.65, n.5, p.864-869, 2000.
347. WHO, JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). **Position paper on patulin**. Thirtieth session, The Hague, The Netherlands, p.9-13, march, 1998.
348. WHO, JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in foods. Patulin. First draft. WOUTERS, M.F.A.; SPEIJERS, G.J.A. **WHO Food Additives Series**, v. PP, n.35, p.377-402, 1996.
349. WICHMANN, G.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon- γ rather than interleukin-4 production in human blood cells. **Environmental Toxicology**, v.17, n.3, p.211-218, 2002.
350. WIESNER, B.P. Bactericidal effects of *Aspergillus clavatus*. **Nature**, v.149, p.356-357, 1942.
351. WILKE, J. Produção de maçã será 25% maior do que em 2006. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, ano, n., fev., 2007. Caderno C, p.7.
352. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Food safety and foodborne illness. **Fact sheet** N°237, Rome, Jan. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>> Acesso em: 23 jan. 2007a.
353. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **WHO global strategy for food safety: safer for better health** (Food Safety Issues). Rome: World Health Organization. 2002b.
354. WOSIACKI, G., NOGUEIRA, A., Suco de Maçã. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Ed.), **Tecnologia de Bebidas**. Edgard Blücher, São Paulo, p.255-292, 2005.
355. WOSIACKI, G.; DEMIATE, I.M.; CHERUBIN, R.A. Brazilian apple juice processing. **Fruit Processing**, v.5, n.5, p.130-133, 1995.

356. WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B.C.; NOGUEIRA, A. Características de qualidade de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.3, p.347-352, 2004.
357. WOSIACKI, G.; SICHIERI, V.L.F.S.; CERIBELLI, M.I.P.F.; SATAQUE, E.Y.; NAMIUCHI, N.N.; CESAR, E.O. Avaliação do uso da maçã nacional (*Malus domestica*) para fins industriais. I. Características de qualidade dos sucos das variedades Fuji, Gala e Golden Delicious. **Boletim da SBCTA**, v.21, n.2, p.65-78, 1987.
358. WOSIACKI, G. Suco clarificado de maçã - para quem? **TodaFruta**, v.3, n.10, p.40-42, 1989.
359. YAZICI, S., VELIOGLU, S. Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and calcium-d-pantothenate on the patulin content of apple juice concentrate. **Nahrung/Food**, v.46, n.4, p.256-257, 2002.
360. YURDUN, T., OMURTAG, G.Z., ERSOY, O. Incidence of patulin in apples juices marketed in Turkey. **Journal of Food Protection**, v.64, n.11, p.1851-1853, 2001.
361. ZWIETERING, M.H., DE KOOS, J.T., HASENACK, B.E., DE WIT, J.C., VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p.1094-1101, 1991.

CAPÍTULO 8

8. APÊNDICES

8.1. Apêndice 1: Meios de cultura e reagentes

1) CYA: Czapek yeast extract agar (identificação de fungos):

Componente	g
NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Extrato de levedura	5
Sacarose	30
Agar	15
Água destilada (mL)	1000

2) MEA: Ágar extrato de malte (identificação de fungos):

Componente	g
Extrato de malte	6,0
Glicose	6,0
Ágar	6,0
Peptona bacteriológica	0,3
Água destilada (mL)	1000

3)G25-N (25% glycerol nitrate ágar) (identificação de fungos):

Componente	g
K ₂ HPO ₄	0,75
Czapek concentrado (mL)	7,5
Extrato de levedura em pó	3,7
Glicerol	250
Ágar bacteriológico	12
Água destilada (mL)	750

Concentrado Czapek:

Componente	g
NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Água destilada (mL)	100

4) Corante Lacto-fucsina 0,1%:

Componente	g
Ácido fucsínico	0,1
Ácido láctico 85% de pureza (100mL)	100

8.2. Apêndice 2: Propriedades termo-físicas do suco clarificado de maçã

Densidade (Kg/m ³)	1056
Viscosidade (cP)	1,4

8.3. Apêndice 3: Temperatura dos meios de aquecimento e resfriamento da unidade Microthermics Model 25DH

Seções	Processo A	Processo B	Processo C
Meio de aquecimento	97,73	98,84	96,70
Meio ao redor do tubo de retenção	90,73	91,32	90,42
Meio de resfriamento	18,00	18,00	18,00
Meio ao redor do envase	26,40	26,40	26,40