

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Ingrid Duarte dos Santos

**PATULINA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM ATMOSFERA
CONTROLADA DINÂMICA UTILIZANDO UPLC-MS/MS E
MONITORAMENTO EM SUPERMERCADOS**

Santa Maria, RS
2017

Ingrid Duarte dos Santos

**PATULINA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA
DINÂMICA UTILIZANDO UPLC-MS/MS E MONITORAMENTO EM
SUPERMERCADOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Duarte dos Santos, Ingrid
PATULINA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA
DINÂMICA UTILIZANDO UPLC-MS/MS E MONITORAMENTO EM
SUPERMERCADOS / Ingrid Duarte dos Santos.- 2017.
121 p.; 30 cm

Orientadora: Ionara Regina Pizzutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2017

1. Micotoxinas 2. Maçãs 3. Armazenamento em atmosfera
controlada dinâmica 4. UPLC-MS/MS 5. Monitoramento I.
Pizzutti, Ionara Regina II. Título.

Ingrid Duarte dos Santos

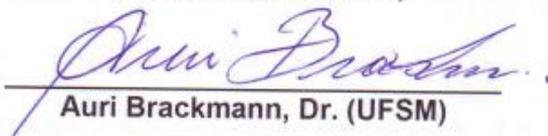
**PATULINA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA
DINÂMICA UTILIZANDO UPLC-MS/MS E MONITORAMENTO EM
SUPERMERCADOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

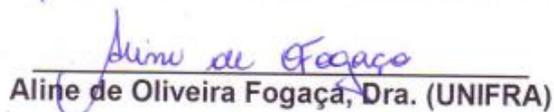
Aprovado em 31 de março de 2017:



Ionara Regina Pizzutti, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Auri Brackmann, Dr. (UFSM)



Aline de Oliveira Fogaça, Dra. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ser a base da minha vida.
- A minha família, em especial aos meus pais, que nunca mediram esforços para me apoiar em todos os meus passos.
- Ao meu namorado Leandro, que desde a minha graduação esteve comigo me auxiliando nos trabalhos desenvolvidos e me dando suporte emocional para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos. Obrigada por ser peça fundamental na minha vida.
- A professora Dra. Ionara, por ter sido além de professora, uma mãe. Obrigada por todo conhecimento, ajuda e carinho.
- A professora Dra. Carmem. Obrigada pela amizade de sempre, pelas palavras de apoio e incentivo.
- Ao NPP, na pessoa do Professor Auri, Fábio e Rogério, por auxiliarem no desenvolvimento deste estudo. Muito obrigada pela parceria e pelo conhecimento adquirido.
- Aos amigos que estão comigo, torcendo por minhas conquistas e que me acompanham ao longo da minha vida.
- Aos queridos colegas e amigos do CEPARC, em especial ao Jonatan, por ter me ensinado a operar equipamentos e sempre estar disposto a me ajudar.
- Aos funcionários Ademir e Valéria que sempre estão dispostos a nos auxiliar em tudo que pedimos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

PATULINA EM MAÇÃS ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA UTILIZANDO UPLC-MS/MS E MONITORAMENTO EM SUPERMERCADOS

AUTORA: Ingrid Duarte dos Santos

ORIENTADORA: Profa. Ionara Regina Pizzutti

Este trabalho teve como objetivo avaliar o grau de contaminação de patulina em maçãs na pós-colheita submetidas a diferentes condições de armazenamento em atmosfera controlada (AC), além de maçãs e sucos disponíveis em supermercados. Em relação às maçãs submetidas ao armazenamento, foram realizados dois experimentos independentes. O primeiro experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, totalizando seis tratamentos com quatro repetições. O fator A consistiu da presença e ausência de 1-MCP. O fator B consistiu: i) AC com 1,2 kPa de O₂ e 2,0 kPa de CO₂; ii) ACD com medição de fluorescência de clorofila (ACD-FC); e iii) ACD com monitoramento do quociente respiratório (ACD-QR 1,3). O segundo experimento também foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, porém em esquema unifatorial, totalizando três tratamentos com quatro repetições. As condições foram: i) AC com 1,2 kPa de O₂ e 2,0 kPa de CO₂; ii) ACD-FC; e iii) ACD-QR 1,3. Em ambos os experimentos foram utilizados frutos provenientes de pomares comerciais da cidade de Vacaria – RS, sendo armazenados durante nove meses nas condições citadas mais sete dias de exposição a 20 °C para simular a vida de prateleira. Posteriormente, os frutos foram submetidos às análises de: ocorrência de podridões, porcentagem de frutos sadios e ocorrência de patulina. Além disso, contaminação com patulina foi avaliada em maçãs e sucos disponíveis comercialmente em supermercados de diferentes regiões da cidade de Santa Maria - RS. O método analítico para determinação de patulina em maçãs e suco de maçã foi desenvolvido e validado no CEPARC. Neste método a amostra foi extraída com acetato de etila acidificada seguida da adição de Na₂SO₄ e posterior etapa de purificação (sílica e Na₂SO₄). O solvente foi evaporado a 65 °C e o resíduo dissolvido em acetonitrila:água (75:25). A técnica analítica empregada foi a UPLC-MS/MS. Os resultados evidenciaram que as condições estudadas de AC e ACD não foram eficientes para impedir a produção de patulina, tanto nas maçãs 'Galaxy' quanto nas 'Fuji Kiku', nas condições estudadas somadas a exposição de 7 dias a 20 °C. Os frutos sadios não foram contaminados com patulina presente nos frutos com podridão armazenados na mesma câmara. Para maçãs 'Galaxy', a aplicação do 1-MCP aumentou a porcentagem de frutos com podridão e a concentração de patulina, não sendo vantajosa sua aplicação nesta cultivar. Nas maçãs 'Fuji Kiku' não houve diferença significativa entre AC e ACD-FC e ACD-QR 1,3 na concentração de patulina, embora todos os frutos desta cultivar tenham apresentado contaminação de patulina mesmo que com valores inferiores ao LMT de 50 µg kg⁻¹. O monitoramento de amostras de maçã e suco de maçã coletadas nos supermercados evidenciou a presença de patulina em ambas as matrizes, com concentrações variando entre <LOQ (25 µg kg⁻¹) a 1297,9 µg kg⁻¹, verificando-se a existência de amostras com concentrações muito acima do limite estabelecido pela legislação brasileira. Futuros estudos são necessários para aumentar o potencial de conservação de maçã, relacionados às novas técnicas de ACD (FC e QR) e aplicação de 1-MCP na determinação de podridões e contaminação por patulina, pois devido à perecibilidade desta fruta, o controle do amadurecimento é fundamental para o aumento da vida útil após a colheita, visando ao mercado interno e a exportação. Além disso, os dados obtidos no monitoramento servem como indicativo, havendo a necessidade de sua continuação em distintos anos agrícolas.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh; micotoxinas; pós-colheita; 1-metilciclopropeno; quociente respiratório; fluorescência de clorofila; monitoramento.

ABSTRACT

PATULIN IN APPLES STORAGE IN DYNAMIC CONTROLLED ATMOSPHERE BY UPLC-MS/MS AND MONITORING IN SUPERMARKETS

Author: Ingrid Duarte dos Santos

Advisor: Ionara Regina Pizzutti

The goal of this study was to evaluate the patulin contamination in post-harvest apples submitted to different storage conditions under controlled atmosphere (CA), in addition to apples and juices available in supermarkets. In relation to apples submitted to storage, two independent experiments were performed. The first experiment was conducted in a completely randomized 2x3 factorial, totaling six treatments with four replications. Factor A was presence and absence of 1-MCP. The factor B was: i) CA with 1.2 kPa O₂ and 2.0 kPa CO₂; ii) DCA with chlorophyll fluorescence measurement (ACD-FC); and iii) DCA with respiratory quotient monitoring (ACD-QR 1,3). The second experiment was also conducted in a completely randomized design, totaling three treatments with four replicates. The conditions were: i) CA with 1.2 kPa O₂ and 2.0 kPa CO₂; ii) DCA-CF; and iii) DCA-RQ 1.3. In both experiments were used fruits from commercial orchards of the Vacaria - RS city, being stored for nine months in the mentioned conditions plus seven days of exposure at 20 °C to simulate the shelf life. Afterwards, the fruits were submitted to the analysis: decay incidence, percentage of healthy fruits and patulin occurrence. In addition, contamination with patulin was evaluated in apples and juices commercially available in supermarkets in all regions of the Santa Maria - RS city. Analytical method for patulin determination in apples and apple juice was developed and validated in CEPARC. In this method, samples were extracted with acidified ethyl acetate followed by the addition of Na₂SO₄. The cleanup step uses silica and Na₂SO₄. The solvent was evaporated at 65 °C and residue dissolved in acetonitrile: water (75:25). The analytical technique employed was UPLC-MS/MS. The results showed that the studied conditions of CA and DCA were not efficient to prevent the production of patulin, in both the 'Galaxy' and 'Fuji Kiku' apples, under the conditions studied in addition to 7 days exposure at 20 °C. Healthy fruits were not contaminated with patulin present in fruits with rot. For apples 'Galaxy', the application of 1-MCP increased the percentage of fruits with rot and the patulin concentration, being not advantageous its application in this cultivar. In the 'Fuji Kiku' apples there was no significant difference between CA and DCA-CF and DCA-RQ 1.3 in the patulin concentration, although all the fruits of this cultivar showed patulin contamination even though values lower than the LMT of 50 µg kg⁻¹. The apple and apple juice samples monitoring collected in supermarkets evidenced the presence of patulin in both matrices, with concentrations ranging from <LOQ (25 µg kg⁻¹) to 754.4 µg kg⁻¹, showed samples with concentrations well above the limit established by Brazilian legislation. Future studies are needed to increase the apple conservation potential, related to the new techniques of DCA (CF and RQ) and 1-MCP application in the rot determination and patulin contamination, because due to the high perishability of this fruit, control of maturation is fundamental to the increase in the shelf life postharvest, aiming at the internal market and export. In addition, the data obtained in the monitoring serve as indicative, requiring the continuation in different agricultural years.

Keywords: *Malus domestica* Borkh; mycotoxins; postharvest; 1-methylcyclopropene; respiratory quotient; chlorophyll fluorescence; monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da molécula da patulina	31
Figura 2 -	Interface do tipo ESI, onde os íons formados são conduzidos para o analisador de massas.....	51
Figura 3 -	Representação da trajetória dos íons em um analisador de massas do tipo Quadrupolo.....	52
Figura 4 -	Representação de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo.....	52
Figura 5 -	Representação do método individual empregado para extração e análise de patulina em maçã e suco de maçã.....	66
Figura 6 -	Ocorrência de podridões em maçã 'Galaxy' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada, somados a sete dias de exposição a 20 °C.....	73
Figura 7 -	Porcentagens de frutos sadios de maçã 'Galaxy' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada, com ou sem aplicação de 1-MCP, somados a sete dias de exposição a 20 °C..	77
Figura 8 -	Ocorrência de podridões em maçã 'Fuji Kiku' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada, somados a sete dias de exposição a 20 °C.....	79
Figura 9 -	Porcentagem de frutos sadios em maçã 'Fuji Kiku' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada, somados a sete dias de exposição a 20 °C.....	80
Figura 10 -	Concentração de patulina em maçãs 'Galaxy' após nove meses nas condições de armazenamento em AC (a) sem e (b) com aplicação de 1-MCP, em 2,0 °C, somados a sete dias de exposição a 20 °C.....	83
Figura 11 -	Concentração de patulina em maçãs 'Galaxy' após sete meses nas condições de armazenamento em atmosfera controlada com e sem aplicação de 1-MCP, em 2,0 °C, mais sete dias de exposição a 20 °C.....	84
Figura 12 -	Concentração de patulina em maçãs 'Fuji Kiku' após nove meses nas condições de armazenamento em AC a 0,5 °C, somados a sete dias de exposição a 20 °C.....	85
Figura 13 -	Correlação entre o índice de podridão (%) e a concentração de patulina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em maçãs 'Galaxy'	87
Figura 14 -	Correlação entre o índice de podridão (%) e a concentração de patulina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em maçãs 'Fuji kiku'.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Constituintes da maçã dados em porcentagem.....	21
Tabela 2 -	Relação dos 15 maiores países produtores de maçã no mundo. Ano de 2012.....	24
Tabela 3 -	Limites máximos tolerados para patulina em maçãs e seus derivados, estabelecidos pela União Europeia, ANVISA e FDA.....	37
Tabela 4 -	Fornecedor do padrão de referência, pureza, data de validade, solvente utilizado no preparo da solução estoque e concentração da mesma.....	58
Tabela 5 -	Condições utilizadas para o armazenamento de maçãs 'Galaxy' maduras sob temperatura de 2,0 °C (+- 0,1). Santa Maria, 2015.	63
Tabela 6 -	Condições de ACD em maçãs 'Fuji Kiku' sob temperatura de 0,5 °C (+-0,1) e Umidade Relativa de 85% (+-2%).....	63
Tabela 7 -	Parâmetros de análise do espectrômetro de massas para análises da patulina.....	66
Tabela 8 -	Concentrações de patulina em amostras de maçã coletadas em supermercados na cidade de Santa Maria - RS, nos anos de 2016 e 2017.....	90
Tabela 9 -	Concentrações de patulina em amostras de suco de maçã coletadas em supermercados na cidade de Santa Maria - RS, nos anos de 2016 e 2017.....	91
Tabela 10 -	Valores de pH dos sucos de maçã.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Atmosfera Controlada
ACD	Atmosfera Controlada Dinâmica
AGAPOMI	Associação Gaúcha de Produtores de Maçã
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica, do idioma inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
API	Ionização à Pressão Atmosférica, do idioma inglês <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
APPI	Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica, do idioma inglês <i>Atmospheric Pressure Photon Ionization</i>
CC	Corrente Contínua
CE	Comissão Europeia
CEPARC	Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes
CI	Ionização Química, do idioma inglês <i>Chemistry Ionization</i>
CID	Dissociação Induzida por Colisão, do idioma inglês <i>Collision-induced Dissociation</i>
EI	Ionização por Impacto de Elétrons, do idioma inglês <i>Electron Ionization</i>
ELL	Extração Líquido-Líquido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Ionização por eletronebulização, do idioma inglês <i>Electrospray Ionization</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAOSTAT	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do idioma inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos, do idioma inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FC	Fluorescência de Clorofila
GC	Cromatografia Gasosa, do idioma inglês <i>Gas Chromatography</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do idioma inglês <i>Liquid Chromatography</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, do idioma inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBRAF	Instituto Brasileiro de Frutas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IT	Espectrômetro de Massas de Armadilha de Íons, do idioma inglês <i>Ion trap</i>
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
LMO	Limite Mínimo de Oxigênio
LOL	Limite Mínimo de Oxigênio, do idioma inglês <i>Low Oxygen Limit</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>

LODi	Limite de detecção do instrumento, do inglês <i>Instrument Limit of Detection</i>
LODm	Limite de detecção do método, do inglês <i>Method Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LOQi	Limite de quantificação do instrumento, do inglês <i>Instrument Limit of Quantification</i>
LOQm	Limite de quantificação do método, do inglês <i>Method Limit of Quantification</i>
MAFF	Ministério Britânico de Agricultura, Pesca e Alimentos, do idioma inglês <i>Ministry of Agriculture Fisheries, and Food</i>
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas, do idioma inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
m/z	Razão massa/carga
NPP	Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORBITRAP	Armadilha de íons orbital, do idioma inglês <i>Orbital Ion Trap</i>
pH	Potencial hidrogênio
QP	Espectrômetro de massas do tipo Quadrupolo
QTOF	Espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-tempo de voo, do idioma inglês <i>Mass Spectrometry Quadrupole Time-of-Flight</i>
QTRAP	Espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-armadilha de íons linear, do idioma inglês <i>Mass Spectrometry Quadrupole Ion Trap</i>
QR	Quociente respiratório
Rf	Rádio frequência
RSD	Desvio Padrão Relativo, do idioma inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SIM	Monitoramento de íon selecionado, do idioma inglês <i>Selected ion monitoring</i>
SRM	Monitoramento de reação selecionada, do idioma inglês <i>Selected reaction monitoring</i>
TQ	Espectrômetro de massas do tipo Triplo quadrupolo
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
UPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à espectrometria de massas sequencial, do idioma inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
1-MCP	1-metilciclopropeno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.2.1	Objetivos gerais	16
1.2.2	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	A MACIEIRA E A MAÇÃ.....	19
2.2	CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS	19
2.3	PRODUÇÃO DE MAÇÃ NO BRASIL	21
2.3.1	Cultivares Galaxy e Fuji Kiku.....	22
2.4	PRODUÇÃO MUNDIAL.....	23
2.5	INDUSTRIALIZAÇÃO	24
2.5.1	Suco	25
2.6	CONTAMINANTES EM MAÇÃS E SEUS DERIVADOS	26
2.6.1	Fungos	26
2.6.2	Micotoxinas	28
2.6.2.1	<i>Micotoxinas em frutas</i>	29
2.6.2.2	<i>Patulina</i>	30
2.6.2.2.1	Características físicas e químicas	30
2.6.2.2.2	Fungos produtores	31
2.6.2.2.3	Coeficiente de difusão	32
2.6.2.2.4	Aspectos toxicológicos	33
2.6.2.2.5	Ocorrência de patulina	35
2.6.2.2.6	Limites Máximos Tolerados (LMTs).....	36
2.6.3	Patologia causada por <i>Penicillium</i> em maçã	38
2.6.4	Influência do armazenamento na produção de patulina	39
2.7	ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS EM ATMOSFERA CONTROLADA.....	40
2.7.1	Atmosfera controlada dinâmica	42
2.7.1.1	<i>Fluorescência de clorofila</i>	43
2.7.1.2	<i>Quociente Respiratório</i>	43
2.7.2	Uso de fitorreguladores	44
2.7.2.1	<i>1-Metilciclopropeno (1-MCP)</i>	44
2.8	DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS.....	45
2.8.1	Preparo da amostra	46
2.8.1.1	<i>Patulina</i>	46
2.8.2	Técnica analítica: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas 47	
2.8.2.1	<i>Cromatografia Líquida (LC)</i>	47
2.8.2.2	<i>Espectrometria de Massas (MS)</i>	48
2.8.2.2.1	Fontes de Ionização	49
2.8.2.2.2	Analisadores de Massas	51
2.8.2.3	<i>Espectrometria de Massas Sequencial (MS/MS)</i>	53
2.9	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	53
2.9.1	Linearidade e curva analítica	54
2.9.2	Seletividade	54
2.9.3	Limite de detecção e quantificação	55
2.9.4	Exatidão	55
2.9.5	Precisão	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	57

3.2	MATERIAIS	57
3.3	SOLVENTES E REAGENTES.....	58
3.4	GASES	58
3.5	ANALITO ESTUDADO: PATULINA.....	58
3.6	PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	59
3.6.1	Preparo da solução estoque	59
3.6.2	Preparo das soluções analíticas de trabalho	59
3.7	ESTUDO DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM ACD	60
3.7.1	Colheita e seleção dos frutos	60
3.7.2	Armazenamento dos frutos	61
3.7.2.1	<i>Quociente respiratório (ACD-QR 1,3)</i>	61
3.7.2.2	<i>Fluorescência de clorofila (ACD-FC)</i>	62
3.7.2.3	<i>1-MCP</i>	62
3.7.4	Análises de qualidade	63
3.8	DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM MAÇÃ E SUCO DE MAÇÃ COLETADOS EM SUPERMERCADOS DE SANTA MARIA-RS.....	64
3.8.1	Amostragem para monitoramento em maçãs e sucos de maçã.....	64
3.8.2	Amostras coletadas	64
3.9	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE PATULINA.....	64
3.9.1	Condições cromatográficas	65
3.9.2	Preparo da amostra e procedimento de extração	66
3.9.2.1	<i>Avaliação de amostras “branco”</i>	67
3.9.3	Validação do método analítico	68
3.9.3.1	<i>Curva Analítica e Linearidade</i>	68
3.9.3.2	<i>Efeito Matriz</i>	68
3.9.3.3	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	70
3.9.3.4	<i>Ensaio de fortificação e recuperação</i>	71
3.10	DETERMINAÇÃO DE pH	71
3.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	ESTUDO DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA.....	73
4.1.1	Ocorrência de podridão e frutos sadios – Maçãs ‘Galaxy’	73
4.1.2	Ocorrência de podridão e frutos sadios – Maçãs ‘Fuji Kiku’	78
4.2	DETERMINAÇÃO DE PATULINA	81
4.2.1	Validação do método analítico	81
4.2.2	Ocorrência de patulina	82
4.3	DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM MAÇÃS E SUCOS DE MAÇÃ COLETADOS EM SUPERMERCADOS DE SANTA MARIA-RS.....	89
5	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXOS	111
	APÊNDICES	119

1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de maçã expandiu-se significativamente nas últimas duas décadas, onde fatores como a produção de variedades modernas, regiões com condições climáticas favoráveis, bem como preocupações com produtividade e conservação, transformaram o Brasil em um grande produtor mundial. No ano de 2014, segundo último dado consolidado pelo IBGE, a área plantada de maçã no Brasil foi de 37.562 hectares, representando uma produção de 1.377.393 toneladas. Dentro desta perspectiva, a região sul representou 99,6% desta produção, onde os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul representaram 46,0 e 50,1% de participação, respectivamente.

O aumento da exigência na qualidade, somado à concentrada produção de maçã em um curto período do ano, faz necessário o uso do armazenamento para fornecer ao mercado consumidor um produto de qualidade por um maior período de tempo. Desta forma, várias tecnologias e estratégias de armazenamento foram desenvolvidas para prevenir a deterioração do fruto, prolongando a vida útil e preservando suas características organolépticas. Dentre os processos de conservação, o armazenamento em atmosfera controlada (AC) é uma das técnicas mais utilizadas no armazenamento de maçãs. Esta técnica consiste no armazenamento refrigerado, com controle da temperatura e umidade relativa, redução na pressão parcial de O_2 e aumento de CO_2 nas câmaras de armazenamento, permitindo o armazenamento de maçãs por até nove meses.

Uma nova tendência na AC convencional é a atmosfera controlada dinâmica (ACD), onde o nível de O_2 pode ser alterado durante o período de armazenamento, mas sempre permanecendo ligeiramente acima do limite de oxigênio mais baixo (LMO). Portanto, o LMO pode ser medido em tempo real nesta técnica de armazenamento. A ACD utiliza alguns métodos para detectar este limite, por exemplo, quociente respiratório (QR) e fluorescência de clorofila (FC). Juntamente com o armazenamento em AC e ACD, pode ser empregado o uso do composto 1-MCP, que auxilia na redução da maturação do fruto e na ocorrência de distúrbios fisiológicos.

A incidência de podridão durante o armazenamento é a principal causa de perdas de maçã no Brasil, o que pode afetar diretamente na qualidade do fruto, além de resultar na produção de micotoxinas, que são metabólitos secundários de fungos que ao serem ingeridos através de alimentos contaminados podem provocar efeitos

tóxicos e carcinogênicos em humanos e animais. Devido ao fato de serem quimicamente estáveis, as micotoxinas tendem a se manter intactas durante o armazenamento e o processamento.

A patulina é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*. O *P. expansum* é conhecido como o principal produtor desta micotoxina, sendo responsável por 70-80% da deterioração em frutos armazenados, especialmente maçãs. Como consequência, maçãs e seus produtos derivados, como o suco, são a principal fonte de patulina na dieta humana. Os frutos fora do padrão comercial são direcionados à industrialização para a elaboração, principalmente de sucos, que são exportados na forma de concentrado. Portanto, o fato de frutos contendo fungos toxigênicos e micotoxinas serem utilizados para produzir subprodutos da maçã, constitui um potencial risco na saúde, principalmente para bebês, já que esta fruta é amplamente utilizada nesta classe de consumidores.

Observa-se um aumento na preocupação com a contaminação de maçãs e seus derivados com fungos toxigênicos e patulina, tanto em nível mundial como no Brasil. Devido essa contaminação afetar o agronegócio de muitos países e representar um risco significativo à saúde dos consumidores, ratifica-se a importância da quantificação da micotoxina patulina, já que a mesma é empregada como indicador da qualidade de alimentos, bem como investigar a eficiência do processo de conservação desses produtos, resultando em maior disponibilidade de alimentos de boa qualidade.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência da micotoxina patulina em maçãs na pós-colheita submetidas a diferentes condições de armazenamento em atmosfera controlada dinâmica, além de maçãs e sucos disponíveis comercialmente em supermercados da cidade de Santa Maria - RS.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o grau de contaminação por patulina em:
 - Maçãs 'Galaxy' expostas as técnicas de monitoramento com quociente respiratório e fluorescência de clorofila associadas ao armazenamento em diferentes condições de atmosfera controlada dinâmica, bem como compará-las com a aplicação de 1-metilciclopropeno (1-MCP);
 - Maçãs 'Fuji Kiku' expostas as técnicas de monitoramento com quociente respiratório e fluorescência de clorofila associadas ao armazenamento em diferentes condições de atmosfera controlada dinâmica;
 - Maçãs e sucos de maçã disponíveis em supermercados de todas as regiões da cidade de Santa Maria – RS em diferentes anos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A MACIEIRA E A MAÇÃ

A macieira (*Malus domestica Borkh*) pertence à família Rosaceae e subfamília Pomoideae e produz como frutos a maçã. A essa família pertencem outras espécies frutíferas importantes, tais como, a pereira, o pessegueiro, a ameixeira, a cerejeira, a nectarineira e a amendoeira. Os frutos são de clima temperado e considera-se que a maçã é uma das mais importantes frutas comercializadas na forma *in natura*, tanto no contexto internacional como nacional (GIRARDI et al., 2004; MELLO, 2004).

As macieiras são cultivadas em todo o mundo, mas estão especialmente concentradas no hemisfério norte. O fator determinante no plantio das macieiras numa região depende do período de baixa temperatura que é necessário para o repouso vegetativo e quebra de dormência (BARRET et al., 2005).

O fruto da macieira apresenta tamanho e formato variável de acordo com a cultivar. Geralmente, a polpa é de cor branca ou creme, crocante, com elevado teor de água. A casca pode ser verde, amarelada, vermelha ou rosada. Em algumas variedades a casca apresenta coloração uniforme, enquanto em outras, apresenta-se estriada. O pedúnculo, de tamanho e espessura variáveis, está inserido na cavidade peduncular, enquanto o cálice situa-se no lado oposto, na cavidade calicular. Em cada fruto podem ser encontrados até dez sementes, relativamente pequenas, inicialmente de coloração clara e, posteriormente, escura (EMBRAPA, 2013).

2.2 CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS

Em virtude da sua composição nutricional, a maçã demonstra ser, mundialmente, uma das frutas preferidas para o consumo sendo indicada para a manutenção da saúde (STEINMETZ e POTTER, 1996).

Além da importância comercial, a maçã apresenta uma série de benefícios quando presente na dieta humana. Estudos mostraram que a ingestão de maçãs e de seus produtos está associada ao controle da glicemia, auxiliando os portadores de diabetes a manter a boa saúde pela presença da pectina. A pectina auxilia também na redução do mau colesterol, pois forma uma barreira de fibra na parede intestinal impedindo a absorção do colesterol e de outras gorduras (CÓRDOVA, 2006).

As maçãs também exercem uma função protetora e benéfica para a mucosa do trato digestório, pois além das fibras, possuem agentes cicatrizantes, sendo seu consumo indicado também para pessoas que sofrem de problemas como azia, gastrite e úlceras, além de auxiliar no funcionamento intestinal (BENEFÍCIOS DA MAÇÃ, 2009).

A composição nutricional da maçã apresenta altos valores de vitaminas do complexo B, vitamina C e E, além do mineral potássio. Além disso, sua composição de fibras, principalmente da pectina, fornece aproximadamente 10% da ingestão diária recomendada desses nutrientes. Segundo Córdova (2006), o principal constituinte da maçã, baseado em sua quantidade, é a água. No entanto, os constituintes de maior valor alimentício são os carboidratos, sendo que aproximadamente 75% consistem em açúcares facilmente assimilados pelo homem.

Entre os açúcares encontram-se a frutose (em maior proporção), sacarose e glicose. Hemiceluloses, celulose e substâncias pécticas fazem parte da fração fibrosa dos carboidratos que juntas, contribuem para a capacidade de retenção de água dos produtos da maçã. Em relação às proteínas, os teores são baixos, sendo a maior parte enzimas envolvida no metabolismo dos frutos durante o desenvolvimento, maturação e pós-colheita. São baixos também os teores de lipídios, estando estes associados a camadas protetoras das células e da epiderme dos frutos. Quanto aos ácidos orgânicos, predomina o ácido málico, juntamente com os açúcares, ésteres e aldeídos, sendo este o principal elemento responsável pelo aroma e sabor característico da fruta (CÓRDOVA, 2006).

A fibra alimentar, considerada o principal componente de vegetais, frutas e cereais integrais, permitiu que estes alimentos pudessem ser incluídos na categoria dos alimentos funcionais, pois a sua utilização dentro de uma dieta equilibrada pode reduzir o risco de algumas doenças como as coronarianas e, certos tipos de câncer. Além de agregar uma série de benefício, pode ser utilizada no enriquecimento de produtos ou como ingrediente, pois é constituída de polissacarídeos, lignina, oligossacarídeos resistentes e amido resistente, entre outros, que tem diferentes propriedades físico-químicas (GIUNTINI, LAJOLO e MENEZES 2003).

Tabela 1 - Constituintes da maçã dados em porcentagem.

Constituintes	%
Umidade	84,1
Carboidratos	14,9
Açúcares	11,1
Fibras	1
Ácidos (málico)	0,47
Proteínas	0,30
Cinzas	0,29
Lipídios	0,40
Energia (Kcal/100g)	-

Fonte: Córdova, (2006).

2.3 PRODUÇÃO DE MAÇÃ NO BRASIL

A cadeia produtiva da maçã possui inserção destacada no cenário da fruticultura brasileira, o que lhe confere inquestionável importância na cadeia agroalimentar do país. A extensão territorial e a diversidade climática do Brasil permitem o cultivo das mais variadas frutas. Até a década de 60 a cultura das macieiras não teve expressão econômica no Brasil. Entretanto, com o incentivo do Governo Federal deu-se o surgimento dos primeiros pomares comerciais que se iniciaram na região de Fraiburgo - SC e posteriormente no Paraná e Rio Grande do Sul, onde se destacaram as variedades 'Gala', 'Fuji' e 'Golden', sendo estas as variedades mais bem adaptadas à região sul do Brasil (AGAPOMI, 2011; TODA FRUTA, 2003a). O Brasil começou a aparecer nas estatísticas internacionais na década de 1980, sendo que em 2001 atingiu a autossuficiência (TODA FRUTA, 2003b).

A tecnologia produtiva foi, em grande parte, introduzida por tradicionais produtores japoneses e europeus, os quais investiram em sistemas de produção mais adequados ao clima e solos brasileiros. Além de sua produtividade, foram obtidos excelentes resultados quanto à qualidade do produto final, o que coloca a maçã brasileira em condições de competir com os melhores produtos do mercado mundial (MOURA et al., 2007).

Devido a macieira ser uma fruteira típica de clima frio, a região sul se tornou a principal produtora de maçã do Brasil. Nessa região ocorrem as melhores condições climáticas para o desenvolvimento, floração e frutificação da macieira, especialmente nas regiões acima de 800 m de altitude do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (EMBRAPA, 2013).

No Brasil, a safra da maçã inicia-se no final de dezembro, nas regiões mais quentes, com a colheita das cultivares de baixo requerimento de frio e se estende até o início de maio, nas regiões mais frias, com a colheita das cultivares de alto requerimento de frio, daí a necessidade de um sistema de armazenagem a frio para conservação da fruta durante o restante do ano (EMBRAPA, 2013).

No ano de 2014, segundo último dado consolidado pelo IBGE, a área plantada de maçã no Brasil foi de 37.562 hectares, representando uma produção de 1.377.393 toneladas. Dentro desta perspectiva, a região sul representou 99,6% desta produção, onde os estados de SC e RS representaram 46,0 e 50,1% de participação, respectivamente (IBGE, 2014).

Segundo dados da Associação Gaúcha de Produção de Maçã (AGAPOMI, 2015), a safra 2014/2015 de maçã no Rio Grande do Sul totalizou 492.053 toneladas, tendo um aumento de aproximadamente 5% quando comparada a safra de 2013/2014 a qual totalizou 468.055 toneladas.

2.3.1 Cultivares ‘Galaxy’ e ‘Fuji Kiku’

A macieira é uma das árvores frutíferas que dispõe de um maior número de variedades. Atualmente, são descritas em torno de 7.500 variedades, porém comercialmente, poucas são utilizadas. No Brasil, quase toda a produção se concentra em duas cultivares, Gala e Fuji, que representam em torno de 90% da área plantada (TODA FRUTA, 2003c).

Dentre os exemplos de mutantes de ‘Gala’, encontra-se a ‘Galaxy’. Já da variedade ‘Fuji’, encontra-se a mutante ‘Kiku’. Na grande maioria dos casos, todas as demais características continuam sendo as mesmas da planta de origem (EMBRAPA, 2013).

Mais de 45% da produção nacional de maçãs é constituída pela cultivar ‘Fuji’. (HUNSCHE et al., 2003). Sua mutante ‘Fuji Kiku’ apresenta excelente sabor e boa suculência tendo, por isso, grande aceitação no mercado nacional e internacional (BRACKMANN et al., 2002). Segundo Argenta et al. (1994), é a cultivar em maior expansão na produção brasileira sendo, portanto, é necessário o seu armazenamento refrigerado para regular a oferta e colocar o produto no mercado na entressafra.

Nos últimos anos, têm-se realizado esforços para melhorar a qualidade dos frutos comercializados dessa cultivar e, assim, atender as exigências dos

consumidores (HUNSCHE et al., 2003). A conservação desta cultivar é bastante variada em função das condições climáticas durante o desenvolvimento dos frutos (BRACKMANN et al., 2002).

A mutante 'Galaxy' apresenta epiderme vermelha rajada, lisa e brilhante, polpa firme, crocante, suculenta, bem balanceada em ácidos e sólidos solúveis (BRACKMANN et al., 2008 e BRACKMANN et al., 2009). Essa maçã é comercialmente vantajosa por apresentar coloração da epiderme mais vermelha e intensa e sabor adocicado, enquadrando-se dentro das exigências dos consumidores brasileiros, assim como a 'Fuji Kiku' (LIMA, 1999).

A colheita de maçãs 'Galaxy' se concentra no mês de fevereiro e de maçãs 'Fuji kiku' concentra-se em abril, portanto, necessitam ser eficientemente armazenadas para serem ofertadas durante o ano todo.

Porém, quando em armazenamento refrigerado, o aparecimento de distúrbios logo após três meses limitam bastante essa disponibilidade, pois diminuem a qualidade da fruta. Para que a qualidade das maçãs seja mantida por maior tempo durante o armazenamento, deve-se respeitar o ponto ideal de colheita, que é determinado pelas modificações bioquímicas e morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento dos frutos (BRACKMANN, 1992).

2.4 PRODUÇÃO MUNDIAL

A maçã é cultivada em todos os continentes e os maiores produtores estão localizados no Hemisfério Norte do planeta, principalmente na Ásia e na Europa. Em nível mundial, de acordo com os últimos dados publicados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAOSTAT, 2012), os 15 países com maior produção de maçã somam uma produção total de cerca de 63 milhões de toneladas da fruta. A Tabela 2 mostra os 15 países com maior produção mundial de maçã e os respectivos volumes produzidos em 2012.

Tabela 2 - Relação dos 15 maiores países produtores de maçã no mundo. Ano de 2012.

Posição	País	Produção total (toneladas)
1	China	37.000.000
2	EUA	4.110.046
3	Turquia	2.889.000
4	Polônia	2.877.336
5	Índia	2.203.400
6	Itália	1.991.312
7	Irã	1.700.000
8	Chile	1.625.000
9	Rússia	1.403.000
10	França	1.382.901
11	Brasil	1.335.478
12	Argentina	1.250.000
13	Ucrânia	1.126.800
14	Alemanha	972.405
15	Uzbequistão	820.000

Fonte: Adaptado de FAOSTAT, 2012.

2.5 INDUSTRIALIZAÇÃO

Como acontece com a maioria das produções agrícolas, existe uma fração de safra de maçã que acaba não sendo comercializada no mercado *in natura*, que pode chegar a 30% da produção nacional, sendo destinado à industrialização (WOSIACKI, NOGUEIRA e SILVA, 2000).

As maçãs podem ser classificadas em comerciais ou industriais, de acordo com a finalidade. As maçãs comerciais são consumidas frescas (*in natura*) e, portanto, devem atender a padrões rígidos de qualidade. Os Estados Unidos são um dos poucos países produtores de maçã onde existem algumas lavouras específicas para frutas industriais (THE WORLD APPLE REPORT, 2008).

No Brasil, os pomares não produzem frutas exclusivas para diferentes classes de maçãs. Assim, as frutas chamadas industriais são resultantes de um processo de seleção e classificação das frutas comerciais. Na comercialização das maçãs, a etapa de classificação gera um descarte de 15 a 30% de frutas que não alcançaram o padrão exigido para o consumo (NOGUEIRA et al., 2007).

A colheita é feita de acordo com os critérios de qualidade relacionados a características que se desenvolvem pós-colheita, durante a maturação dos frutos. Frutos destinados à comercialização imediata e à exportação são aqueles que apresentam melhor qualidade em termos de aparência, como coloração uniforme, forma característica, ausência de podridões e danos mecânicos. Frutos com maior

tamanho ou mais aromáticos, com elevado teor de sólidos solúveis e com coloração mais intensa são obtidos com colheita tardia (TU, NICOLAI e BAERDEMAEKER, 2000).

Frutas fora do padrão comercial são direcionadas à industrialização, para a elaboração, principalmente, de sucos que são exportados na forma de concentrado (NOGUEIRA et al., 2007). O percentual de industrialização de maçãs no país tende a aumentar, devido à demanda crescente pelo suco pronto para consumo no mercado interno. As maçãs industriais também são usadas na fabricação de sidra, vinagre, purê, geleias, alimentos infantis (*baby foods*), entre outros produtos (NOGUEIRA et al., 2004). Nos Estados Unidos, em torno de 40% de toda maçã produzida é processada, sendo que mais da metade é destinada à produção de suco (THE WORLD APPLE REPORT, 2008).

Com o aumento da produção nacional, aumentaram as exportações da fruta *in natura* e a venda para as fábricas de suco (WOSIACKI et al., 2002). A maior parte da produção nacional de suco concentrado de maçã destina-se à exportação, apresentando grande concorrência com a Argentina e Chile, que são grandes produtores mundiais com tradição no processamento de maçãs (PRADO, 2000).

Os frutos que não se destinam imediatamente ao mercado consumidor são armazenados em câmaras frigoríficas que contribuem para diminuição do seu metabolismo, conservação das características físico-químicas e diminuição no crescimento de fungos.

2.5.1 Suco

O Decreto nº 6.871, de junho de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. Segundo este decreto, o suco ou sumo, é a bebida não fermentada, não concentrada, ressalvados alguns casos, e não diluída, destinada ao consumo, obtido da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

Quanto ao processamento e constituição o suco pode ser classificado como:

- Suco Integral: suco sem adição de açúcares na sua concentração e composição natural.

- Suco Concentrado: suco parcialmente desidratado, que quando reconstituído deverá apresentar teor de sólidos solúveis originais do suco integral, ou teor de sólidos solúveis mínimo estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco.
- Suco desidratado: suco no estado sólido, obtido pela desidratação do suco integral.
- Suco Misto: suco obtido pela mistura de frutas, combinação de frutas e vegetais combinação das partes comestíveis de vegetais ou mistura de suco de fruta e vegetal.
- Suco Reconstituído: suco obtido pela diluição do suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor mínimo de sólidos solúveis estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco integral.
- Néctar: é a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal ou de seu extrato, adicionado de açúcares, destinada ao consumo direto.

Ainda, segundo a Instrução Normativa nº 01, de 7 de Janeiro de 2010 do MAPA, o suco de maçã é definido como uma bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da maçã, através de processo tecnológico adequado, devendo apresentar coloração branca a translúcida, sabor e aroma próprios, sendo que o mesmo deve obedecer aos padrões de identidade e qualidade fixada para o suco de frutas.

No Brasil, o suco de maçã é pouco comercializado devido à baixa procura por parte dos consumidores. Entretanto, no mercado internacional, o suco de maçã é um dos mais consumidos, o que torna o fato da contaminação com fungos e micotoxinas preocupante, uma vez que o Brasil exporta esse produto para diversos países (WELKE et al., 2009).

2.6 CONTAMINANTES EM MAÇÃS E SEUS DERIVADOS

2.6.1 Fungos

A presença de fungos em alimentos processados representa condições insalubres da transformação e/ou qualidade inaceitável da matéria-prima (COUSIN, ZEIDLER e NELSON, 1984). O reino dos fungos compreende um grupo de organismos que podem se classificar em leveduras e fungos filamentosos ou bolores, sendo os fungos filamentosos os produtores de micotoxinas (CARRILLO, 2003).

Os fungos filamentosos são organismos eucariontes e multicelulares, sendo extremamente comuns na natureza, podendo ser utilizados na medicina e na indústria. Porém, sabe-se que a atividade de fungos ocasiona alterações no sabor, odor e na qualidade dos alimentos, podendo causar transformações indesejáveis, devido aos diferentes graus de deterioração (VECCHIA e FORTES, 2007).

Para seu crescimento, os fungos utilizam uma série de substâncias químicas denominadas metabólitos primários, como por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios. O uso de metabólitos primários está associado com a fase de crescimento rápido (CARRILLO, 2003).

Os metabólitos secundários são formados no final da fase exponencial de crescimento e não são importantes para o crescimento ou metabolismo de seu produtor. De forma geral, a formação desses metabólitos se dá por grandes quantidades de precursores de metabólitos. A produção de micotoxinas é uma forma que o fungo encontra para reduzir a quantidade de precursores que não são necessários para o seu metabolismo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Entretanto, o desenvolvimento dos fungos não está necessariamente associado com a produção de micotoxinas. Dentro de uma espécie, o potencial micotoxigênico, bem como a multiplicação desses fungos depende largamente da cepa, temperatura, umidade relativa do ambiente e características intrínsecas da matriz colonizada pelo fungo (nutrientes, acidez, presença de conservantes antimicrobianos, entre outras) (DRUSCH e RAGAB, 2003).

Autores afirmam que a ausência do fungo em alimentos não garante a ausência das micotoxinas, visto que, são compostos estáveis. Esses metabólitos podem ser encontrados em alimentos quando o fungo não está mais presente. Além disso, um fungo pode produzir diferentes micotoxinas e uma micotoxina pode ser produzida por vários fungos diferentes (TANIWAKI e SILVA, 2001; KOE et al., 2001).

As micotoxinas de maior importância são produzidas principalmente por três gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (HUSSEIN e BRASELL, 2001; GILBERT e POHLAND, 2003). As espécies de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*

costumam contaminar alimentos durante a secagem e armazenamento enquanto que as espécies de *Fusarium sp.* contaminam as plantas antes ou depois da colheita (HERMANNNS et al., 2006).

2.6.2 Micotoxinas

O termo micotoxinas é composto pela palavra grega *Mikes*, que significa fungo, e da palavra latina *Toxicum*, que significa veneno. São metabólitos secundários produzidos por várias espécies de fungos que podem causar uma variedade de síndromes clínicas e doenças conhecidas como micotoxicoses, tanto em animais como no homem (MURRAY et al., 2006; JESTOI, 2008).

As micotoxinas são termoestáveis resistindo a temperaturas de aproximadamente 270 °C, possuem baixo peso molecular e resistem à ação de enzimas do sistema digestivo (ASTOVIZ e SUAREZ, 2005). Como possuem grande estabilidade química, mesmo após a remoção dos fungos na industrialização, essas toxinas permanecem no alimento (LOPES et al., 2005).

Mais de 100 fungos são considerados toxigênicos e aproximadamente 300 substâncias já foram identificadas como micotoxinas, onde se destacam a aflatoxina, ocratoxina, zearalenona, fumonisina, desoxinivalenol e patulina (HUSSEIN e BRASELL, 2001; RODRÍGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002; MURPHY et al., 2006). Porém, é difícil estimar o número real desses metabólitos que estão envolvidos na ocorrência de micotoxicoses devido à diversidade de seus efeitos tóxicos (MURRAY et al., 2006; JESTOI, 2008).

As micotoxicoses ocorrem quando há ingestão das toxinas através dos alimentos contaminados, podendo desencadear desde uma doença aguda a uma doença crônica, como também problemas nefrotóxicos, imunotóxicos, teratogênicos, mutagênicos, carcinogênicos e até a morte (MURRAY et al., 2006). Além desses efeitos, as micotoxicoses podem estar associadas a disfunções hormonais graves, aumento da susceptibilidade a doenças, redução da expectativa de vida e ainda desordens dos sistemas nervoso central, cardiovascular, pulmonar e trato intestinal (RAI e VARMA, 2010). Por estas razões, as micotoxinas representam um risco à saúde humana e animal.

A gravidade, bem como, os sintomas de uma micotoxicose depende do tipo e da toxicidade da micotoxina, a quantidade, a duração e via da exposição, o sexo, a

idade, o estado nutricional e a saúde do indivíduo exposto (BANDO et al., 2007). Por isso, as micotoxinas são compreendidas dentro do grupo dos contaminantes mais importantes em alimentos devido ao seu impacto negativo sobre a saúde pública, segurança alimentar e economia de muitos países, particularmente os países em desenvolvimento (PIÑEIRO et al., 2003).

A diversidade química das micotoxinas já conhecidas representa uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento das técnicas analíticas. Muitos dos métodos existentes apresentam limitações, tais como altos limites de detecção e baixa recuperação ou ainda problemas relacionados à repetibilidade nos resultados das análises (JESTOI, 2008).

Técnicas de detecção altamente seletivas, tais como a espectrometria de massas (MS), permitem a detecção e quantificação de concentrações extremamente baixas de micotoxinas (JESTOI, 2008).

O estudo das micotoxinas incluindo a sua detecção, biossíntese e toxicologia aliadas ao estudo sobre epidemiologia e controle dos fungos que as produzem é de fundamental importância para manutenção de um abastecimento seguro de alimentos à população.

2.6.2.1 Micotoxinas em frutas

As frutas, de um modo geral, trazem a característica de serem alimentos de fácil deterioração, devido, principalmente, à quantidade de água livre, o que afeta diretamente a conservação e o uso prolongado da fruta. No período pós-colheita e durante o transporte e armazenamento desses produtos agrícolas, a presença de fungos toxigênicos pode ser influenciada por muitos fatores, dentre eles, nível de umidade, temperatura, aeração e tempo de armazenamento.

A maioria das frutas tem alta acidez, com pH variando entre 2,5 e 5. Esta faixa é considerada o mais importante fator na determinação dos tipos de micro-organismos que podem deteriorar essa classe de alimentos. Os fungos capazes de tolerar essa faixa de pH, são os principais micro-organismos deteriorantes de frutas e de produtos derivados de frutas (STINSON et al., 1981).

As frutas tornam-se mais susceptíveis à invasão de fungos durante o processo de maturação, pois o pH dos tecidos aumenta, a casca torna-se mais macia, carboidratos solúveis são formados e as barreiras de defesa enfraquecem (STINSON

et al., 1981). A contaminação de derivados de frutas com micotoxinas geralmente resulta do uso de frutas com qualidade deficiente no processamento (SYDENHAM et al, 1997).

Com isso, a presença de micotoxinas em frutas não tem apenas causado problemas de saúde, mas também tem resultado em perdas econômicas, especialmente em países exportadores de frutas e seus produtos derivados (KOE et al., 2001).

2.6.2.2 Patulina

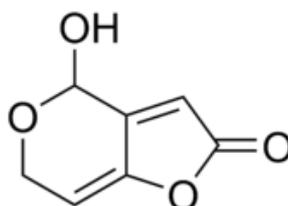
2.6.2.2.1 Características físicas e químicas

A patulina vem sendo empregada como indicador da qualidade nos frutos e produtos de maçã (MOSS, 2008). Quimicamente, a patulina é uma lactona de nome químico (4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]pirano-2 (6H)-ona (Figura 1). É uma micotoxina da classe hidroxifuropirano, chamada clavicina, claviformina ou expansina, apresenta fórmula empírica $C_7H_6O_4$ e seu peso molecular é de 154,12 Da. Ela forma cristais incolores, tem ponto de fusão de 111°C, é solúvel em água, etanol, acetona, acetato de etila, éter e clorofórmio, mas é insolúvel em benzeno e éter de petróleo. (CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS, 1998).

Apresenta estabilidade em ácidos diluídos e é resistente à temperatura de 125 °C na faixa de pH entre 3,5 e 5,5, ocorrendo o inverso em soluções alcalinas e compostos sulfurosos representados por metabissulfito e radicais sulfidrilas, quando diminui a sua atividade biológica (GONÇALEZ, PINTO e FELICIO, 2001; SCUSSEL, 1998).

O efeito do pH na destruição térmica da patulina foi investigado através de testes realizados em soluções aquosas a pH 3,5; 4,5 e 5,5 contendo a toxina. Estas soluções foram submetidas às temperaturas de 105, 110, 115, 120, 125 °C. Os dados mostraram que a destruição da micotoxina em todas as temperaturas foi sempre maior em pH 5,5 do que em pH 3,5, indicando que a patulina é mais estável em solução ácida. Desta forma, pode-se concluir que esta toxina possui relativa estabilidade aos tratamentos térmicos geralmente aplicados a alimentos ácidos (LOVETT e PELLER, 1973).

Figura 1: Estrutura química da molécula da patulina.



Fonte: Moss, 2008.

2.6.2.2.2 Fungos produtores de patulina

A patulina é produzida por mais de 60 espécies de fungos e cerca de 30 gêneros, dentre eles *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*, sendo o *P. expansum* o principal produtor (GÖKMEN e ACAR, 1998). Esta espécie é um fungo psicotrófico e já foi encontrado em maçãs, cerejas, pêssegos, nectarinas, peras, damascos e uvas. É considerado responsável por 70 a 80% da deterioração de frutas armazenadas, em especial de maçãs (CALDAS et al., 2008; LEGGOTT e SHEPHARD, 2001). Como consequência, maçãs e seus produtos derivados são a principal fonte de patulina na dieta humana.

A patulina foi isolada pela primeira vez de *Penicillium claviforme*, nomeada aviformina, mas em razão de seu frequente isolamento partindo de *Penicillium patulum*, chama-se patulina. Inicialmente, era considerada um antibiótico, mas pelos seus efeitos tóxicos em animais, foi classificada como uma toxina (GONÇALEZ, PINTO e FELICIO, 2001; SCUSSEL, 1998).

A atividade de água exerce forte influência sobre o desenvolvimento dos micro-organismos que causam degradação do alimento. Em geral, o valor ótimo de atividade de água para os fungos crescerem é diferente do valor ótimo da atividade de água em que o nível máximo de formação de micotoxinas é observado (DRUSCH e RAGAB, 2003). Segundo Magan e Olsen (2004), a faixa de temperatura para o crescimento e produção de patulina por *P. expansum* é 0 – 24 °C e a atividade de água máxima é de 0,99.

Estudos mostram que o armazenamento das frutas a baixas temperaturas não é suficiente para prevenir a formação de micotoxinas, pois o *P. expansum* é capaz de crescer e produzir patulina em temperaturas menores que 5°C (NORTHOLT e

BULLERMAN, 1982). Relaciona-se o aparecimento do *P. expansum* nas frutas com a diminuição da temperatura e presença das fontes de carbono como a frutose, glicose, sacarose e ácido málico (CALDAS et al., 2008). Com isso, autores concluem que o armazenamento de frutas à baixa temperatura não é suficiente nem para inibir o crescimento deste fungo, tampouco para evitar produção da toxina (WELKE et al., 2009).

2.6.2.2.3 Coeficiente de difusão

O diâmetro das lesões nos frutos pode afetar os níveis de patulina (MARÍN et al., 2006). Foi observada uma correlação direta entre a concentração de patulina e o tamanho das lesões (MARTINS et al., 2002). Investigações mostraram que, em geral, a concentração desta toxina nas amostras de suco de maçã aumentou proporcionalmente com o uso de maçãs lesionadas. Frutas sadias produziram suco de maçã com concentrações de patulina inferiores a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que sucos obtidos a partir de maçãs com 30, 60 e 100% lesionadas apresentaram patulina em concentração superior a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (KADAKAL e NAS, 2002).

Marín et al., (2006) avaliaram o grau de contaminação por patulina em maçãs infectadas com *P. expansum*, armazenadas à temperatura ambiente (20 °C) por curtos períodos de tempo (5 dias) e sua relação com a cultivar (Golden ou Fuji), grau de maturação, tamanho das lesões e capacidade migratória da toxina no tecido sadio. Altas concentrações de patulina foram encontradas em maçãs Golden, maduras e que apresentavam lesões maiores. A migração da toxina pelo tecido sadio da fruta era maior quanto maior o tamanho da lesão, chegando a 4 cm quando apresentavam grandes áreas afetadas e de 2 cm em lesões menores. Os autores sugerem que a remoção do tecido afetado e tecido sadio próximo é uma boa prática para prevenção de toxina em derivados de maçã.

Rychlik e Schieberle (2001) avaliaram a capacidade migratória da toxina em maçãs, encontrando concentrações de patulina em porções de até 4 cm de distância da lesão, sendo essas com valor menor que $6 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ de patulina/g de tecido sadio. Celli (2006) quantificou a concentração de patulina em podridões de maçã, bem como no tecido sadio ao redor da lesão (1 cm). Neste estudo, foi encontrada patulina em todos os tecidos deteriorados e sadios, chegando a 115,7 e 5,0 μg de patulina por grama de tecido, respectivamente.

A biossíntese de patulina ocorre quando a taxa de crescimento do fungo diminui em virtude das limitações do consumo de nitrogênio (GROOTWASSINK e GAUCHER, 1980). Segundo Doores (1983) maçãs sadias carregam uma carga de bolores da ordem de 103 a 105 organismos por fruta.

A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas do fruto, mecanicamente ou por pragas, onde se observa o apodrecimento. TANIWAKI et al. (2001) observou que a intensidade de difusão dessa micotoxina é de 1 cm em direção ao tecido sadio. Entretanto, outros estudos encontraram patulina a 2 cm além do tecido deteriorado de maçãs (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 2001). Já em tomates, a micotoxina penetra em toda a fruta. Isto ocorre devido ao alto conteúdo de água e baixa quantidade de polissacarídeos estruturais que o tomate possui, assim o coeficiente de difusão da patulina em tomates é maior do que em maçãs (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 2001).

Normalmente a patulina é encontrada em altas concentrações na parte da fruta onde há presença de esporos (93 a 95% de toda toxina) e devido a sua hidrossolubilidade se difunde para outras partes sadias do fruto (BAERT et al., 2006). Portanto, a patulina pode ser detectada em frutas visivelmente sadias. Doores (1983) afirma que embora a patulina pode estar presente em maçãs aparentemente sadias destinadas ao consumo direto, é normalmente encontrado em níveis mais elevados em frutos de baixa qualidade destinados à transformação em suco, sidra, purês e geleias.

Outros autores afirmaram que esta micotoxina pode ser encontrada em concentrações mais altas na parte da fruta não deteriorada pelo fungo. Por esta razão, recomenda-se a retirada da podridão e do tecido sadio próximo para prevenção da contaminação pela patulina (EMBRAPA, 2014).

2.6.2.2.4 Aspectos toxicológicos

Desde 1941, a patulina tem sido objeto de estudo, primeiramente por sua ação como antibiótico e depois por suas propriedades tóxicas e carcinogênicas. A partir disso, experimentos em animais de laboratório demonstraram que esta micotoxina produz diversos efeitos nocivos, incluindo mutagenicidade, teratogenicidade, carcinogenicidade, imunossupressão e intoxicações agudas caracterizadas por hemorragias, edema pulmonar, danos nos capilares hepáticos, rins, baço, bem como,

edema cerebral (GÖKMEN e ACAR, 1998; RICHARD et al., 2003; PÁDUA e MACHINSKI JUNIOR, 2005).

Em nível celular, a patulina tem mostrado efeitos que incluem rompimento da membrana de células plasmáticas e inibição da síntese de DNA. De acordo com Arafat e Musa (1995) a toxina inibe o crescimento e a síntese de proteína em cultura de tecido hepático e isso se deve ao bloqueio da captação dos aminoácidos por meio da membrana e também à sua incorporação na proteína.

Speijers et al. (1988) concluíram que a patulina causou danos ao fígado e aos rins de ratos, além de revelar toxicidade ao sistema imunológico. Também mostrou genotoxicidade e possível atividade mutagênica em células mamárias de ratos em estudo *in vitro* (BONDY e PETSTKA, 2000; SCHUMACHER et al., 2006). SCHUMACHER et al. (2005), ao estudar a mutagenicidade da patulina em células de pulmão de hamster chinês, afirmaram que a patulina é uma genotoxina.

Sua atividade carcinogênica é atribuída à insaturação α , β , junto com uma dupla ligação conjugada externa, unida na posição 4 do anel lactona (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 2001; MOAKE, PADILLA-ZAKOUR e WOROBO, 2005). A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer* – IARC) classifica a patulina como carcinógeno do grupo 3 - Confirmado carcinógeno animal com relevância desconhecida para seres humanos (IARC, 2010). A dose de letalidade – DL50 para camundongos varia de 5 a 30 mg kg⁻¹ de peso corpóreo (BOONZAAIJER, BODELDIJK e VAN OSENBRUGGEN, 2005).

O resultado dos estudos em humanos, como um todo, ainda é inconclusivo, porém sugere que sintomas agudos pelo consumo de patulina podem incluir agitação, convulsões, congestão pulmonar, edema, ulceração, hiperemia, distensão gastrointestinal, hemorragia intestinal, degeneração de células epiteliais, inflamação intestinal, vômitos e danos nos rins em decorrência do consumo de derivados de maçã contaminados com essa micotoxina (LAI et al., 2000; MAHFOUD et al., 2002). Após ingestão, a patulina é excretada (cerca de 87%), sendo 49% nas fezes, 36% na urina e de 1 a 2% pela via respiratória na forma de dióxido de carbono (MOSS, 2008).

2.6.2.2.5 Ocorrência de patulina

Estudos sobre a ocorrência de patulina têm sido realizados em diversos países, além do Brasil. A frequente presença desta toxina em produtos de maçã mostra que a patulina é resistente aos processos de fabricação (LEGGOTT e SHEPHARD, 2001).

A ocorrência da patulina em uva fina (*Vitis vinifera* L. cv, Rubi com sinais de podridão ácida causada por *Penicillium* spp. foi avaliada, porém, nas 40 amostras analisadas, não foi detectada contaminação por esta micotoxina (CALDAS et al., 2008). Também não foi detectada a presença de patulina em 84 amostras de polpa comercial de tomate, sendo o limite de detecção de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (KAWASHIMA et al., 2002). Treze marcas de suco de maçã comercializadas em Belo Horizonte, MG foram coletadas entre março e setembro de 1999, onde esta micotoxina foi detectada em apenas uma amostra ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) (PRADO et al., 2000).

Alimentos infantis como os purês de maçãs, frequentemente utilizados em papinhas de bebê, podem apresentar elevada contaminação, o que se torna mais preocupante pelo efeito correlato de dose ingerida x peso corporal (CELLI, 2006). Os produtos comerciais obtidos a partir de maçã com maior valor agregado são os sucos clarificados e/ou reconstituídos e os fermentados e também base para sidras. A presença de patulina em sucos de maçã está relacionada à contaminação da matéria-prima com fungos produtores da micotoxina e é de conhecimento técnico que o processo de clarificação não diminui significativamente o conteúdo de patulina no suco (BISSESSUR, PERMAUL e ODHAV, 2001).

Já em *apple cider* inoculado com *P. expansum* (105 esporos/mL) depois de incubação por 14 dias de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, altos níveis de patulina (538 a $1822 \mu\text{g L}^{-1}$) foram detectados. Mesmo quando o produto foi incubado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, concentrações de patulina variaram de 75 a $396 \mu\text{g L}^{-1}$ e foram detectados após 24 dias de incubação (MAcCALLUM et al., 2002).

Hasan (2000) determinou as espécies de fungos predominantes e ocorrência de micotoxinas em maçãs sadias (100) e deterioradas (100). *Aspergillus flavus* (100%), *Aspergillus niger* (63%), *Penicillium expansum* (50%) e *Rhizopus stolonifer* (50%) eram os fungos isolados com maior frequência em frutas saudáveis. *A. niger* foi o micro-organismo mais comum em maçãs deterioradas (83%), seguido por *A. flavus* (67%), *P. expansum* (58%), *R. stolonifer* (53%) e *Alternaria alternata* (42%). As micotoxinas encontradas em maçãs podres foram patulina e aflatoxina. A condição ótima para produção de patulina por *P. expansum* foi de $15 \text{ }^\circ\text{C}$ após 15 dias.

Embora esta micotoxina possa ser detectada em várias matérias-primas dentro da indústria alimentar, as maçãs e os seus subprodutos são a principal preocupação relativa à presença de patulina.

2.6.2.2.6 Limites máximos tolerados (LMTs)

A legislação sobre alimentos serve para proteger a saúde dos consumidores e os interesses econômicos dos produtores de alimentos (MAGAN e OLSEN, 2004). Devido aos riscos para saúde, organizações nacionais e internacionais estabeleceram limites máximos de micotoxinas em alimentos, a fim de garantir a segurança dos mesmos (GONZÁLEZ et al., 2010). A legislação sobre micotoxinas varia de acordo com o país, sendo que o nível aceitável é diferente para cada tipo de alimento.

No Brasil, a Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, cita os limites máximos toleráveis de micotoxinas estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Segundo esta RDC, o limite máximo tolerável para patulina em suco de maçã e polpa de maçã é de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (ANVISA, 2011).

Países da Europa e Estados Unidos também estabelecem níveis máximos para conteúdo de patulina em derivados de maçã. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda concentrações inferiores a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e o *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um documento, “*The Draft Guidance Document of FDA Components and Industry on Apple Juice and Apple Juice Products*”, que estabelece o limite de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para sucos de maçã e derivados (EUROPEAN COMMUNITY, 2006).

Muitos países têm adotado a recomendação do *Codex Alimentarius*, que indica um nível máximo permitido de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de patulina em suco de maçã. Esse fato estimula países exportadores, como o Brasil, a pesquisarem a qualidade micotoxicológica dos seus produtos, a fim de se tornarem competitivos no mercado internacional e de fornecerem alimentos seguros.

O Ministério Britânico de Agricultura, Pesca e Alimentos (MAFF) tem monitorado os níveis de patulina em sucos de maçã desde 1980. Quando contaminações acima de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ foram confirmadas pela primeira vez, em 1992, foi sugerido o limite máximo permitido de até $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (UNITED KINGDOM, 1993).

Com o estabelecimento de programas de controle, a redução dos níveis de patulina em sucos de maçã alcançou 60%. Outros países como Suécia, Bélgica e

Noruega também estabeleceram concentração máxima permitida de até 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, como recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OUGH e CORISON, 1980).

Os níveis máximos tolerados das micotoxinas que vem sendo impostos pelas legislações nacionais e internacionais aumentam a necessidade do desenvolvimento de novos métodos e otimização daqueles já existentes, uma vez que resultados não confiáveis de um determinado laboratório podem acarretar problemas graves de segurança do alimento, e, como consequência, impedimento de exportações (JESTOI, 2008).

Na tabela 3, encontram-se os valores dos limites máximos tolerados para patulina nos diferentes produtos derivados de maçã segundo o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia, regulamento este que, fixa os teores máximos de certas micotoxinas presentes em determinados gêneros alimentícios, juntamente com os limites fixados pela ANVISA e FDA.

Tabela 3 - Limites máximos tolerados para patulina em produtos de maçãs estabelecidos pela União Europeia, ANVISA e FDA.

Órgão	Produtos	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$)
União Europeia	Sucos de frutas e néctar de frutas, em particular suco de maçã e ingredientes para outras bebidas	50
	Concentrados de sucos de frutas após reconstituídos conforme instrução do fabricante	50
	Bebidas alcoólicas, sidra e outros drinques fermentados derivados de maçã ou contendo suco de maçã	50
	Produtos sólidos de maçã, incluindo compotas, purê de maçã para consumo direto	25
	Suco de maçã e produtos sólidos de maçã incluindo compotas e purê de maçã, para crianças	10
	Outros <i>baby food</i>	10
ANVISA	Suco de maçã	50
	Polpa de maçã	50
FDA	Suco de maçã e derivados	50

2.6.3 Patologia causada por *Penicillium* em maçã

Dentre os micro-organismos causadores de doenças, os fungos são a principal causa de perdas em maçãs. As podridões de maçãs são causadas principalmente por *Penicillium expansum*, ocasionalmente por *Alternaria alternata* e por *Botrytis cinera*.

Estes fungos estão presentes na maior parte dos países produtores de pomáceas (SPADARO et al., 2004).

Dentre as doenças associadas à maçã, a “podridão azul” (“*blue rot*”) causada por *P. expansum*, é a mais comum e destrutiva de todas as podridões que afetam as maçãs, principalmente durante a estocagem (JANISIEWICZ e KORSTEN, 2002).

Esta podridão é responsável por 80 a 90% das perdas ocasionadas por podridões em pós-colheita (VINAS et al., 1998). Apresenta manchas macias e aquosas e a parte deteriorada separa-se facilmente do tecido não contaminado. Estes focos de podridão podem conter uma grande quantidade de patulina. Já foram detectados até 150 g desta micotoxina em 1 kg de suco extraído de maçãs deterioradas (SCUSSEL, 1998). As frutas infectadas têm odor e gosto característicos de mofo, desenvolvendo massas verde-azuladas de esporos que aparecem na superfície das frutas.

Mesmo quando efetuados todos os tratamentos culturais recomendáveis, as perdas causadas por *P. expansum* na cultivar Fuji, por exemplo, podem atingir até 8% das frutas, após seis meses de armazenamento refrigerado (EMBRAPA, 2004).

O controle da podridão azul das maçãs tem sido a preocupação de produtores ao redor de todo o mundo. Várias medidas vêm sendo adotadas com o intuito de reduzir as podridões pós-colheita, dentre as quais destacam-se o controle químico (inibidores de amadurecimento, fungicidas sistêmicos e protetores), o controle biológico (antagonistas), o controle físico (refrigeração, tratamento térmico, radiação, atmosfera controlada ou modificada) e a indução de resistência (eliciadores bióticos e abióticos) (JANISIEWICZ e KORSTEN, 2002).

Em pós-colheita de maçãs, o controle de doenças geralmente é feito com a imersão de frutos em soluções fungicidas. Fungicidas sintéticos como tiofanato metílico, iprodiona e imazalil são utilizados para o controle de podridões deste período. Entretanto, o aumento do interesse público e das autoridades da área da saúde sobre a presença de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas e o acúmulo dessas substâncias no ambiente e nos seres vivos têm estimulado a pesquisa de métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. Outras desvantagens do emprego de fungicidas advêm da seleção de estirpes de fitopatógenos resistentes aos ingredientes ativos registrados (JANISIEWICZ e KORSTEN, 2002).

Nesse contexto, a busca por meios alternativos de controle e inibição de fitopatógenos vem acompanhada de pesquisas na área de armazenamento em atmosfera controlada ou utilização de inibidores da maturação como o 1-metilciclopropeno (1-MCP).

2.6.4 Influência do armazenamento na produção de patulina

Sabe-se que mesmo no armazenamento refrigerado, pode ocorrer a presença de *P. expansum*, além da produção de patulina. Wilson e Nuovo (1973) isolaram 60 cepas de *P. expansum* produtoras de patulina em maçãs com deterioração, mantidas sob armazenagem de 0 °C. Northolt e Bullerman (1982) confirmaram o fato, constatando o desenvolvimento e produção de patulina em maçãs armazenadas a 1 °C.

Um estudo conduzido por Ross et al. (1998) foi desenvolvido a fim de avaliar a produção de patulina em maçãs nas cultivares Gala e Fuji inoculadas com *P. expansum* e *P. variable* isolado de maçãs. Para isso, foram utilizadas temperaturas de armazenamento empregadas na indústria (0 °C), de câmara fria (4 °C) e temperatura ambiente (25 °C) nos tempos de 15, 30, 60 e 90 dias. A produção de patulina ocorreu em todas as combinações de armazenagem, constatando que à medida que se elevava a temperatura, era acelerado o desenvolvimento dos fungos e a produção de patulina. A 0 °C o aparecimento de patulina só foi detectado em 60 dias, a 4 °C em 30 dias e a 25 °C em 15 dias. As variações de pH não foram significativas e a deterioração macroscópica aumentava conforme o aparecimento de toxina. Os autores concluíram que os riscos frequentes de produção de patulina nas temperaturas de refrigeração indicam a necessidade de melhor controle nos estágios de colheita e armazenagem de maçãs.

Em estudo realizado por Jackson et al. (2003), avaliou-se como as condições de armazenamento afetam os níveis de patulina. A patulina não foi detectada em maçãs selecionadas, colhidas diretamente das árvores e não pasteurizadas, mas foi detectada, em altos níveis, em maçãs que tiveram contato com o solo no momento da colheita, durante seu armazenamento ou processamento e que também não foram pasteurizadas. O mesmo foi observado no concentrado desses dois tipos de maçãs armazenado de 4 a 6 semanas em temperatura de 0 a 2 °C.

Em outro estudo, autores investigaram o efeito da temperatura de armazenamento sobre a redução de patulina em sucos concentrados durante 6 meses, mantidos a 22 °C e a 30 °C, contaminados com toxina nas concentrações de 64, 105 e 150 µg L⁻¹. Os resultados demonstraram uma redução de patulina, sendo tempo e temperatura dependentes. Após 1 mês de armazenamento a 22 °C a redução foi de 45 a 64% e a 30 °C, de 66 a 86%, sendo gradativo até o quarto mês, quando não mais encontraram teores detectáveis da toxina (KOCA e EKSI, 2005).

Já, Baert et al. (2007) estudaram a influência das condições de armazenagem (temperatura e nível de O₂) no crescimento e na produção de patulina por diferentes cepas de *P. expansum* em um meio de cultura e em maçãs. O crescimento foi fortemente influenciado pela temperatura, enquanto que a atmosfera utilizada (20,3 e 1% de O₂; <1% CO₂) não teve efeito. O crescimento ótimo foi observado a 25 °C para cada cepa testada. A produção de patulina foi estimulada quando houve diminuição da temperatura (de 20 °C para 10 ou 4 °C).

Pelos dados da literatura, a frequente ocorrência de *P. expansum*, produtor de patulina em frutas, aponta a importância do controle durante o armazenamento das maçãs para evitar riscos de ingestão desta micotoxina.

2.7 ARMAZENAMENTO DE MAÇÃS EM ATMOSFERA CONTROLADA

O aumento da exigência na qualidade, somado à concentrada produção de maçã em um curto período do ano, faz necessário o uso do armazenamento para fornecer ao mercado consumidor um produto de qualidade por um maior período de tempo.

As maçãs apresentam atividade metabólica depois de colhidas o que reduz sua vida útil durante o armazenamento. Portanto, o armazenamento das frutas ocorre sob refrigeração e, muitas vezes, em atmosfera controlada (AC) de forma a diminuir a taxa de respiração das maçãs e retardar seu metabolismo, amadurecimento e deterioração (BRACKMANN et al., 2004).

A AC é uma das técnicas mais utilizadas no armazenamento de maçãs (BRACKMANN et al., 2009; WEBER et al., 2011 e WEBER et al., 2012). A mesma consiste do armazenamento refrigerado, com controle da temperatura e umidade relativa (UR) do ambiente de armazenagem, além da redução na pressão parcial de O₂ e aumento de CO₂ nas câmaras de armazenamento (GIRARDI et al., 2004). O seu

uso com maçãs foi primeiramente reportado no ano de 1927, por Kidd e West (MATHOOKO, 1996).

O controle da temperatura no armazenamento é importante, pois contribui para manutenção da qualidade pós-colheita de frutos, onde reduz a velocidade das reações bioquímicas, retardando o amadurecimento dos frutos (CHITARRA e CHITARRA, 2005). A estocagem é realizada geralmente à temperatura de 0 °C, podendo variar de -0,5 °C até 2 °C, dependendo da variedade (GIRARDI e BENDER, 2003).

Já o controle da UR se faz importante, pois em baixa UR, ocorre perda de massa e murchamento dos frutos, além do aumento da produção de etileno, acelerando a senescência dos frutos e, em elevada UR, pode ocorrer proliferação de patógenos. Todavia, a indução da perda de massa até certo limite pode ser benéfica para manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs. A UR é controlada entre 92 e 96% (BRACKMANN et al., 2008; GIRARDI e BENDER, 2003).

No armazenamento sob baixas pressões parciais de O₂ e altas pressões parciais de CO₂, os efeitos benéficos incluem redução da taxa respiratória e da produção de etileno, conservando, assim, as características físico-químicas e inibindo a ocorrência de alguns distúrbios fisiológicos.

Dependendo dos padrões de armazenagem exigidos para cada variedade, o teor de O₂ pode ser reduzido para a faixa de 1,0 a 2,5% e o teor de CO₂ elevado para 0,5 a 4,5% (GIRARDI e BENDER, 2003). Para atingir estes níveis, é preciso injetar nitrogênio na forma gasosa dentro da câmara, o qual ocupa o lugar do oxigênio e fica desta maneira, inerte (BRACKMANN et al., 2008).

A atmosfera controlada fornece vantagens ao prolongar de 50 a 80% o período de conservação da fruta, mantendo sua qualidade através do retardamento do amadurecimento. Em vista do interesse na ampliação da exportação de frutas brasileiras, o controle na armazenagem se tornou essencial para garantir a qualidade das mesmas (IBRAF, 2008).

No entanto, mesmo em AC ocorrem perdas durante um armazenamento prolongado, em função da presença de etileno no ambiente de armazenagem. Essas perdas referem-se especialmente a ocorrência de distúrbios fisiológicos e podridões (WATKINS, 2010). Neste sentido, buscam-se técnicas complementares a AC que ajudem a manter a qualidade e prolongar o armazenamento.

2.7.1 Atmosfera controlada dinâmica

Com uma preocupação crescente pelo consumo de alimentos sem contaminantes, faz-se necessário o uso de técnicas de armazenamento que trabalham mais detalhadamente o manejo das concentrações gasosas do ambiente de armazenagem sem aplicação de compostos químicos. Uma técnica recente é a atmosfera controlada dinâmica (ACD), em que as concentrações de O₂ variam durante a armazenagem, conforme necessidade do fruto armazenado, mas permanecem ligeiramente acima do limite mínimo de O₂ (LMO). Com isso, o LMO pode ser monitorado em tempo real nas câmeras de armazenagem. Quando iniciar a fermentação devido às baixas pressões parciais de oxigênio, é injetado 0,2 a 0,3 kPa de O₂ no ambiente da câmara e, desta forma, a respiração anaeróbica é reduzida, não permitindo a ocorrência de dano ao fruto (GASSER et al., 2008; WATKINS, 2008).

DeLong et al. (2007) afirmam que esta tecnologia mantém maior qualidade dos frutos, comparado ao armazenamento em atmosfera controlada tradicional e, ainda, pode ser uma opção de uso em um sistema de produção orgânico, por não usar compostos químicos.

Apesar dos benefícios da ACD, esta técnica tem como inconveniente o uso de equipamentos sofisticados que são necessários para o acompanhamento do estresse nos frutos. Além disso, há a necessidade de profissionais especializados para o acompanhamento desta nova técnica (BOTH, 2012).

Dentre as técnicas de ACD, se destaca o monitoramento com base na fluorescência de clorofila (FC), quociente respiratório (QR) e ainda, como associação a essas técnicas pode-se fazer o uso do 1-metilciclopropeno (1-MCP).

2.7.1.1 Fluorescência de clorofila (FC)

Para reduzir o oxigênio para níveis muito baixos (0,3 até 0,4 kPa), é necessário empregar uma técnica para monitorar o LMO durante todo o período de armazenagem. Uma metodologia usada é baseada na fluorescência da clorofila (FC) (DEELL et al., 2002; PRANGE et al., 2007).

Nesta metodologia, um sensor monitora a fluorescência da clorofila. Quando os níveis de oxigênio são reduzidos abaixo do LMO, as clorofilas presentes na epiderme da fruta emitem uma fluorescência, que é capturada pelo sensor e dirigida para o software, o que indica que o oxigênio é inferior a LMO e deve ser aumentado. Assim, este método de armazenamento permite que a redução dos níveis de oxigênio seja muito baixa, mas que o metabolismo dos frutos ainda a toleram. Durante o armazenamento utilizando esta metodologia, os níveis de oxigênio são alterados de acordo com o metabolismo das frutas, especialmente durante o início do armazenamento (RAFFO et al., 2009), resultando em uma atmosfera controlada dinâmica (ACD-FC).

As clorofilas respondem ao estresse provocado pela baixa pressão de O_2 . À medida que os níveis de O_2 caem dentro da câmara de armazenamento, a emissão de fluorescência permanece relativamente estável até que o LMO seja atingido, sendo que após, a emissão de fluorescência aumenta consideravelmente (DeELL et al., 2002), indicando que os níveis de O_2 da atmosfera da câmara de armazenamento devem ser aumentados de 0,2 a 0,3 kPa, permanecendo assim até o final do armazenamento ou até novo estresse.

2.7.1.2 Quociente respiratório (QR)

Outra alternativa é o monitoramento do quociente respiratório (QR), baseado na razão entre a produção de CO_2 e o consumo de O_2 pelo metabolismo respiratório dos frutos (WEBER et al., 2015). Quanto maior a respiração anaeróbica, maior o QR. O princípio da utilização do QR é como uma medida da baixa tensão de oxigênio conhecida há muitos anos, no entanto, é recente a sua utilização em ACD.

Em condições aeróbicas, o QR terá um valor reduzido e, devido à sua forte natureza não linear, o QR vai aumentar exponencialmente à medida que a concentração de oxigênio se aproximar de zero, devido a uma mudança da respiração aeróbica para a anaeróbica ou fermentação (GASSER et al., 2008). Com o monitoramento do QR os níveis de O_2 podem variar diariamente, dependendo do metabolismo dos frutos, a fim de manter constante um QR pré-definido.

2.7.2 Uso de fitorreguladores

2.7.2.1 1-metilciclopropeno (1-MCP)

O 1-metilciclopropeno (1-MCP) é um composto volátil, não tóxico, com peso molecular de 54 g e fórmula C_4H_6 , que se liga de forma irreversível aos receptores de etileno nas membranas das células, impedindo a ligação do etileno ao receptor e bloqueando sua ação. Além disso, a afinidade do 1-MCP a esses receptores é aproximadamente 10 vezes maior do que a do etileno, e o inibidor é ativo em concentrações muito mais baixas do que este fitohormônio. Também é relatado que o 1-MCP inibe a biossíntese do etileno em algumas espécies. Assim, a aplicação do 1-MCP inibe o estímulo fisiológico e a transdução de sinal desencadeada pelo etileno, reduzindo o amadurecimento e ocorrência de distúrbios em frutos climatérios (BLANKENSHIP e DOLE, 2003).

O armazenamento em AC pode prolongar o efeito de 1-MCP sobre as características físicas e sensoriais de maçãs e estas duas tecnologias geralmente são mais eficientes quando combinadas (WATKINS et al., 2000). De acordo com Watkins et al. (2000), as respostas à aplicação do 1-MCP variam em função da espécie, cultivar, região e condição de armazenamento. Além disso, a temperatura e o tempo de exposição ao produto também afetam a eficiência do mesmo (DeELL et al., 2002).

Quando utilizado em combinação com baixa temperatura, o efeito do 1-MCP aumenta a vida útil de maçãs em comparação com o uso de 1-MCP em frutos conservados em temperatura mais elevada. Este resultado sugere que a taxa de formação de novos receptores de etileno é suprimida pela baixa temperatura, aumentando assim a eficiência do 1-MCP (BLANKENSHIP e DOLE, 2003).

Portanto, o 1-MCP tem grande importância para a ciência, pois é poderosa ferramenta para um melhor entendimento dos eventos envolvidos com a maturação e senescência dos frutos (WATKINS, 2010).

2.8 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

A determinação de micotoxinas em alimentos, ração animal, amostras biológicas, entre outros, é considerada um desafio devido a diversidade das matrizes

com diferentes complexidades e a variedade de espécies moleculares que necessitam ser determinadas (SAEGER, 2011).

Quando a determinação desses analitos se dá através de técnicas cromatográficas, é necessário o preparo da amostra para extraí-los e, em algumas situações uma etapa de purificação para remover componentes da matriz que possam interferir durante a análise instrumental. Em outros casos também se faz necessária uma etapa de pré-concentração, para alcançar os limites de detecção e quantificação requeridos (GONZÁLEZ et al., 2010; SAEGER, 2011).

Além de fatores como precisão e reprodutibilidade, procedimentos analíticos são caracterizados por três critérios práticos: i) velocidade com que a análise pode ser realizada, ii) nível de habilidade técnica necessária para efetuar o ensaio, e iii) se o ensaio proporciona um resultado qualitativo ou quantitativo (CAST, 2003).

Um grande número de métodos analíticos tem sido desenvolvido para análise de micotoxinas, incluindo a patulina. Esses métodos necessitam apresentar baixos limites de detecção, a fim de cumprir com os requisitos legais de organizações nacionais e/ou internacionais; ser seletivo para evitar interferências; ser facilmente aplicado em laboratórios de rotina; ser econômico para o laboratório e fornecer resultados confirmatórios para o analito detectado (GONZÁLEZ et al., 2010).

Técnicas de detecção altamente seletivas, tais como a espectrometria de massas (MS) permitem a detecção e quantificação de concentrações extremamente baixas de micotoxinas (JESTOI, 2008). Recentes avanços em instrumentação analítica têm destacado o potencial dos métodos baseados em UPLC-MS/MS (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*), pois estes permitem a determinação de analitos como a patulina e sua confirmação de forma bastante confiável (GONZÁLEZ et al., 2010).

2.8.1 Preparo da amostra

No preparo das amostras para análise cromatográfica, o custo e o tempo, bem como as fontes de erros durante a análise são considerados. O preparo da amostra representa cerca de 60% do tempo e do custo da análise (SAEGER, 2011).

Inicialmente, a amostra pode ser triturada por via seca ou via úmida. Após esta etapa, a mesma deve ser homogeneizada, e dela retirada uma subamostra para a extração e quantificação dos analitos (CAST, 2003). O preparo da amostra pode

influenciar fortemente a recuperação dos analitos, podendo afetar, a exatidão e precisão de todo o método analítico (SAEGER, 2011).

Uma vez que o analito foi extraído da matriz, o extrato líquido pode ser purificado para remover impurezas que possam dificultar a detecção e a quantificação do mesmo. A purificação é um requisito para alguns, mas não para todos os métodos analíticos (CAST, 2003). Além de remover impurezas da amostra, em alguns casos esta etapa consiste também em uma etapa de pré-concentração do analito.

As micotoxinas são moléculas com diferentes propriedades físico-químicas. Devido a isso, normalmente, os procedimentos específicos de extração e purificação eram otimizados apenas para uma micotoxina alvo. Nos últimos anos a tendência é que se busque desenvolver métodos de extração diferenciados, capazes de realizar a extração simultânea de várias micotoxinas ou de um grupo de micotoxinas que apresentem características químicas semelhantes (GONZÁLEZ et al., 2010; SAEGER, 2011). Entretanto, a patulina pode ser determinada somente por método analítico individual. Pelas suas características físico-químicas, métodos multirresíduos não foram capazes de extraí-la.

2.8.1.1 Patulina

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de patulina, incluindo cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida, cromatografia gasosa e eletroforese capilar. A maioria dos métodos utiliza, na etapa de preparação de amostras, a extração líquido-líquido (ELL). A ELL se baseia na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, orgânica e aquosa, sendo que a eficiência da separação está relacionada à afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (LEGGOTT e SHEPHARD, 2001).

Métodos de baixo custo e menor tempo de análise, com o emprego de quantidades reduzidas de solventes orgânicos e, conseqüentemente, menor geração de resíduos tóxicos, têm sido desenvolvidos. A HPLC-UV (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet*) é um método comumente usado para determinação e quantificação de patulina, visto que essa toxina é relativamente polar e exibe amplo espectro de absorção (GÖKMEN e ACAR, 1999).

O método oficial adotado pela AOAC para suco de maçã (método 995.10) é baseado na HPLC-UV, com um limite de quantificação de 5 µg L⁻¹. Neste método o

suco é extraído 3 vezes com acetato de etila, seguido de desidratação com sulfato de sódio. O solvente é evaporado sob vazão de nitrogênio gasoso a 40 °C e o resíduo é dissolvido em acetonitrila:água (10:90). A cromatografia líquida utiliza coluna C₁₈ de fase reversa (5 µm, 250 x 4,6 mm) e detector UV fixado em 276 nm. O sistema é isocrático, com vazão de 1 mL min⁻¹ e fase móvel acetonitrila:água (5:95) (AOAC, 2000).

2.8.2 Técnica Analítica: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

2.8.2.1 Cromatografia líquida

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia se tornou destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise como espectrofotometria por absorção no visível e ultravioleta ou espectrometria de massas (CHIARADIA, COLLINS e JARDIM, 2008).

A grande aplicabilidade desta técnica é atribuída a sua capacidade de separação de moléculas não voláteis e termossensíveis, que constituem 80% dos compostos sintéticos e naturais. No entanto, a identificação em amostras complexas pode ser um problema para a cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) quando esta estiver acoplada a detectores tradicionais como UV e fluorescência (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

A LC tem sido a técnica analítica mais amplamente utilizada para determinação de micotoxinas, considerando seu desempenho satisfatório em termos de exatidão, precisão, sensibilidade e reprodutibilidade (TURNER et al., 2009; PITTET, 2005; SFORZA et al., 2006). A HPLC com diferentes detectores é frequentemente utilizada em análises de rotina e também, na realização de pesquisas. Entretanto, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas está ganhando cada vez mais espaço (TURNER et al., 2009).

Através da combinação de MS com LC, componentes das amostras são separados uns dos outros (por LC) e tem suas massas individuais analisadas (por MS) para isolar, identificar e quantificar qualquer componente ionizável. Desta forma, o acoplamento LC-MS tem sido utilizado com inúmeras aplicações em vários campos da ciência e da análise química, e é usado para a análise de uma ampla faixa de

compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas grandes como, por exemplo, proteínas (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

Apesar dos fatores limitantes na utilização da cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massas (LC-MS), como o alto custo dos equipamentos, os requisitos de laboratório relativamente avançados e as limitações no tipo dos solventes utilizados na extração e separação, nos últimos anos esta técnica tornou-se muito utilizada (GONZÁLEZ et al., 2010). A LC-MS tem avançado nos últimos dez anos para a posição de técnica de referência na área de determinação de micotoxinas (KRALJ e PROSEN, 2009).

A necessidade de métodos empregando espectrometria de massas em sequência (LC-MS/MS) é ainda maior porque a identificação inequívoca do analito e a quantificação exata são pré-requisitos em análise de alimentos, de acordo com recentes leis e regulamentos nacionais e internacionais. Além disso, a LC-MS/MS prevê um grau avançado de segurança na identificação do analito devido ao seu elevado grau de seletividade. Estas técnicas permitem a determinação simultânea de compostos em concentrações relativamente baixas.

2.8.2.2 Espectrometria de massas

Com a MS, muitas classes, de diferentes analitos, presentes em uma grande diversidade de matrizes, podem ser identificadas e quantificadas com alta precisão. Essa técnica é uma das ferramentas analíticas mais valiosas e amplamente disponíveis na atualidade (LANÇAS, 2009).

O fundamento desta técnica é a ionização das moléculas e identificação dos íons de acordo com a relação massa/carga (m/z). A formação de íons é uma etapa crítica de qualquer aplicação da MS, pois independentemente do analisador de massas, a análise de massas requer íons (LANÇAS, 2009). Os principais componentes destes instrumentos são a fonte de ionização e o analisador de massas.

2.8.2.2.1 Fontes de ionização

Na técnica de LC-MS são encontradas incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico com a relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas. As

vazões utilizadas em LC são relativamente grandes (da ordem de 1 mL min^{-1}), de maneira que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo a líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}$. Assim, uma das mais importantes funções de uma interface empregada em LC-MS é remover toda, ou, pelo menos uma parte significativa da fase móvel (REICHERT, 2015).

As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento LC-MS foram baseadas no impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) e ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*), entretanto devido as diferentes características existentes entre as fases móveis empregadas nas duas técnicas de separação (GC e LC), este acoplamento mostrou-se inadequado para análise de compostos em baixas concentrações, além de não apresentarem robustez necessária. Entretanto, novas fontes foram desenvolvidas, onde as que demonstraram melhor desempenho no acoplamento LC-MS são aquelas onde a ionização ocorre sobre pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) (LANÇAS, 2009).

Desta forma, para o acoplamento da LC ao MS foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas. Os modos de ionização mais utilizados no momento são: Eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a Ionização por Fótons a Pressão Atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*).

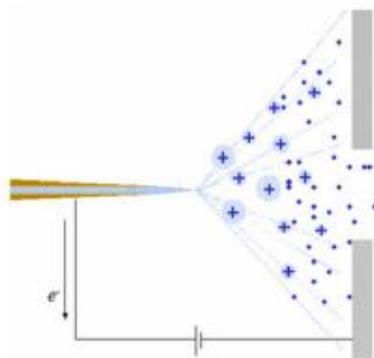
Em ESI (modo de ionização utilizado neste estudo), o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido (na FM, no caso do eluente da LC) passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem (CHIARADIA, COLLINS e JARDIM, 2008). A ESI pode ser operada no modo positivo ou negativo; as gotículas que saem do aerossol terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons, ocorrendo um processo de oxidação. De forma análoga, no modo negativo o oposto ocorrerá (LANÇAS, 2009).

Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (aerossol) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N_2) na região do aerossol. A medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é

reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada "explosão coulômbica", que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que sejam produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (Figura 2).

Como em ESI a ionização ocorre diretamente na solução, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação. Uma vez que em ESI são gerados íons com múltiplas cargas, esta técnica pode ser aplicada a substâncias com massas molares relativamente grandes.

Figura 2 – Interface do tipo ESI, onde os íons formados são conduzidos para o analisador de massas.



Fonte: Adaptado de LANÇAS, 2009.

2.8.2.2.2 Analisadores de massas

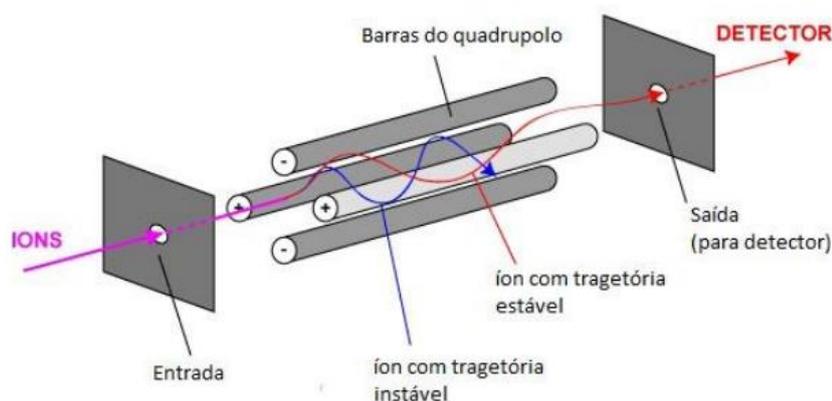
Existem vários tipos de analisadores de massas, cada qual com suas características de construção e operação que os diferem entre si, por suas vantagens e limitações. Uma vez que existe uma ampla variedade de analisadores de massas, sua escolha deve ser efetuada considerando-se a aplicação (ex. faixa de massas desejada), desempenho desejado (ex. resolução) e custo. Em função destes fatores, não há um analisador de massas o qual seja ideal para todas as aplicações (LANÇAS, 2009).

Dentre os analisadores disponíveis atualmente, estão os quadropolos (QP, do idioma inglês *Quadrupole*), os triplos quadropolos (TQ, do idioma inglês *Triple*

Quadrupole), armadilha de íons (IT, do idioma inglês *Ion trap*), armadilha de íons orbital (ORBITRAP, do idioma inglês *Orbital Ion Trap*), tempo de voo (QTOF, do idioma inglês *Quadrupole Time-of-Flight*) e triplo quadrupolo-armadilha de íons linear (QTRAP, do idioma inglês *Mass Spectrometry Quadrupole Ion Trap*).

O QP é o analisador de massas mais empregado, principalmente devido a sua simplicidade, boa linearidade, facilidade de ser entendido e operado (LANÇAS, 2009). Este tipo de analisador é constituído de quatro barras cilíndricas feitas de metal, dispostas na forma de um quadrado onde os íons do analito são direcionados para o centro do quadrado. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto o outro par é mantido a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (CC) e rádio frequência (Rf) é aplicada nas barras. O par positivo atua com um filtro para valores de massas mais elevados, enquanto que o par negativo para as massas menores. Deve-se ter um controle preciso sobre as voltagens e rádio frequência, aplicada às barras dos polos, que geram um campo eletrostático que age como filtro de massas. Esses campos determinam quais as razões m/z podem passar através dos filtros, em uma determinada voltagem, as quais serão detectadas. Os demais íons terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados (Figura 3) (LANÇAS, 2009).

Figura 3 – Representação da trajetória dos íons em um analisador de massas do tipo Quadrupolo.

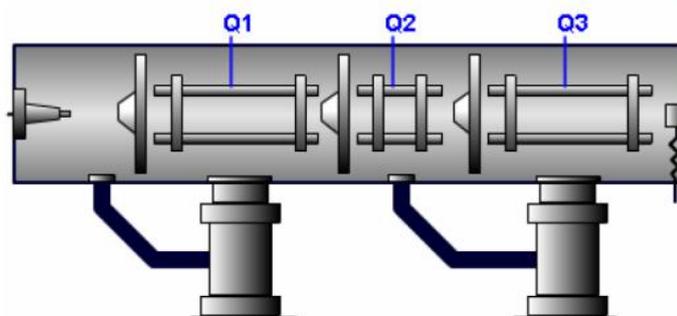


Fonte: Adaptado de EARL (*Electronic Analytical Reference Library*).

O TQ é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo (Q2) não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão. A fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1) ocorre geralmente por dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *Collision-*

induced Dissociation) com um gás inerte, e também, é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3) (Figura 4).

Figura 4 – Representação de um analisador de massas do tipo tripo quadrupolo.



Fonte: Adaptado de EARL (*Electronic Analytical Reference Library*).

2.8.2.3 Espectrometria de massas sequencial (MS/MS)

A espectrometria de massas multidimensional (*tandem MS/MS*) inclui dois passos adicionais entre a formação e a detecção dos íons: i) o isolamento de um íon precursor e; ii) sua fragmentação em íons produtos característicos, para formar um espectro completo. Por isso essa técnica é utilizada para análise de compostos alvo, onde cada um necessita sua própria condição (PIZZUTTI, 2006; STASHENKO e MARTÍNEZ, 2010). O TQ, citado anteriormente, é um exemplo de espectrômetro de massas multidimensional.

Com o uso desta técnica, a informação estrutural do analito é aumentada devido à fragmentação dos íons precursores em íons produtos. O espectro formado por esses íons é característico de cada substância, visto que cada um deles tem um padrão de fragmentação único devido ao arranjo dos átomos que formam a molécula (DIAS, 2014).

Além disso, a MS/MS auxilia na eliminação de interferências provenientes da presença de substâncias da matriz, visto que o alvo da análise são as massas específicas detectadas pelo espectrômetro de massas. Portanto, técnicas de MS são essenciais para pesquisas avançadas em segurança dos alimentos e também no monitoramento ambiental. Estas áreas são importantes para garantir a saúde dos seres humanos e animais.

O uso da LC-MS/MS reduz a necessidade de etapas de purificação das amostras e proporciona menor probabilidade de resultados falso positivos e falso

negativos, resultando então, em uma redução no tempo e custos de análise (HIEMSTRA e DE KOK, 2007).

Para atender a essa necessidade, deve-se contar com métodos analíticos de tal sensibilidade e precisão que permitam a avaliação da contaminação de alimentos por micotoxinas, devendo ter a característica de ser de execução simples, rápida e de baixo custo.

2.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A adequação ao uso de métodos analíticos aplicados a ensaios rotineiros é geralmente avaliada através de estudos de validação. A validação é uma avaliação que garante que as informações geradas por um método analítico sejam confiáveis e interpretáveis sobre a amostra a que se refere (EURACHEM, 1998).

Há vários conceitos e definições, provenientes tanto de pesquisadores quanto de agências e normas reguladoras nacionais e internacionais, que objetivam responder questões condizentes à função da validação de métodos e de que maneira deve ser realizada (PIZZUTTI, 2006).

Órgãos de credenciamento, como a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), exigem o item “validação de métodos analíticos” como um requisito fundamental para a qualidade assegurada e demonstração da competência técnica analítica dos laboratórios (RIGHI, 2011).

Segundo o INMETRO (2011) validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos. Nesse contexto, dentro dos parâmetros importantes envolvidos na validação de métodos analíticos estão a linearidade, seletividade, estudos de exatidão e precisão e os limites de detecção e quantificação.

2.9.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2011).

Este parâmetro pode ser observado pelo gráfico dos resultados dos ensaios (resposta do equipamento) em função da concentração do analito para as diferentes concentrações estudadas.

2.9.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de discriminação entre o analito a ser determinado e substâncias análogas. Um método que apresenta alta seletividade é capaz de determinar o analito de forma exata mesmo em presença de interferentes provenientes da matriz (ALBANO e RODRIGUES, 2009). Um método que produz respostas para vários analitos, porém, capaz de distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2011).

2.9.3 Limites de detecção e quantificação

Nas determinações de analitos presentes nas amostras em níveis de traço, a determinação da menor concentração em que o analito pode ser detectado com confiabilidade é muito importante para evitar resultados errôneos (INMETRO, 2011).

O limite de detecção de um método é definido como a concentração mínima do analito medida e declarada com 95 ou 99% de confiança que a concentração do analito é maior que zero.

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Na prática, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, após averiguar se a exatidão e precisão alcançadas são satisfatórias (INMETRO, 2011).

2.9.4 Exatidão

Exatidão é o grau de concordância entre os resultados de uma medição e um valor verdadeiro de um mensurando. A exatidão traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro (ALBANO e RODRIGUES, 2009).

Os processos utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011).

2.9.5 Precisão

A precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos e quanto menor for a amplitude de medidas, maior será a precisão. Esta medida reflete a tendência de maior ou menor afastamento (erro) entre os resultados dos ensaios (ALBANO e RODRIGUES, 2009).

As três maneiras mais comuns de expressá-la são através da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Cromatógrafo a líquido calibrado, sistema Acquity UPLC-MS/MS (Waters, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
 - Coluna cromatográfica BEH C₁₈, 150 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 µm de tamanho de partícula (Waters, EUA);
- Detector MS triplo quadrupolo calibrado, Xevo TQS (Waters, EUA) utilizando o modo de ionização por eletronebulização (ESI), operando no modo negativo;
- Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e TargetLynx versão 4.1, validado (Waters, EUA);
- Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Millipore, EUA);
- Multiprocessador (Walita Master, Brasil);
- Balança analítica de precisão com quatro casas decimais, calibrada (Sartorius, Alemanha);
- Balança analítica de precisão com duas casas decimais, calibrada (Mettler, Suíça);
- Mesa agitadora modelo 3016 (GFL, Alemanha);
- Centrífuga Hareaus Varifugue (Thermo Scientific, Alemanha);
- Pipetador automático Handy Step, calibrado (Brand, Alemanha);
- Concentrador de amostras (Labconco Corporation, EUA);
- Homogeneizador Vórtex Genie 2 (Scientific Industries, EUA).
- Medidor de pH (Bel Engineering, Itália);

3.2 MATERIAIS

- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 15 e 50 mL (Nalgene, EUA);

- Frascos de vidro para armazenamento de soluções nos volumes de 16 e 22 mL (National Scientific, EUA);
- Balões volumétricos calibrados de 5, 10 e 200 mL (Blau Brand, Alemanha ou Restek, EUA);
- Tubo de centrífuga em vidro cônico de 10 mL (Laborglas, Brasil).
- Vials (Waters, EUA);
- Frascos de vidro âmbar para armazenamento de soluções;
- Vidrarias comuns de laboratório.

3.3 SOLVENTES E REAGENTES

- Acetato de etila, acetonitrila, ácido acético glacial, todos grau pesticida (J.T. Baker Chemicals, EUA ou Mallinckrodt, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q (Milford, EUA);
- Bondesil Sílica (Agilent Technologies, EUA);
- Sulfato de sódio anidro (UCT – Inglaterra);
- Formiato de amônio (Sigma – Aldrich, Alemanha);

3.4 GASES

- Argônio 99,999% de pureza (Air Liquide, Brasil);
- Nitrogênio 99,999% de pureza (Peak Scientific, EUA).

3.5 ANALITO ESTUDADO - PATULINA

Na Tabela 4 encontra-se o fornecedor, pureza do material de referência, data de validade, solvente de preparo e concentração da solução estoque da patulina.

Tabela 4 – Fornecedor do padrão de referência, pureza, data de validade, solvente utilizado no preparo da solução estoque e concentração da mesma.

Analito	Fornecedor	Pureza (%)	Data de validade	Solvente	Concentração da solução estoque (mg L⁻¹)
Patulina	Romer Labs	99,7	06/2014	Água/Acetonitrila	100

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

3.6.1 Preparo da solução estoque

A solução estoque foi preparada na concentração de 100 mg L^{-1} levando em consideração a solubilidade e o grau de pureza do analito, especificado pelo fabricante. O material de referência da substância foi pesado e efetuou-se o cálculo do volume de solvente a ser adicionado para alcançar a concentração.

O material de referência foi pesado diretamente em frasco de vidro âmbar contendo tampa com batoque de teflon, com capacidade de 22 mL. Em seguida, o mesmo foi dissolvido no volume calculado do solvente apropriado de acordo com a solubilidade fazendo-se o uso de pipetador automático calibrado. O frasco foi fechado, agitado manualmente e então levado para banho de ultrassom por cerca de 5 minutos a fim de solubilizar qualquer partícula sólida remanescente.

3.6.2 Preparo das soluções analíticas de trabalho

Preparou-se 500 mL de solução de água com 25% de acetonitrila para o preparo das soluções da curva analítica de trabalho e para reconstituição do resíduo após a evaporação. Para isso, 125 mL de acetonitrila foi pipetado, com o uso de pipetador automático, em 375 mL de água ultrapura.

A partir da solução estoque de 100 mg L^{-1} , preparou-se duas soluções intermediárias de 1 e 10 mg L^{-1} . Estas foram utilizadas para a confecção das curvas analíticas de trabalho, nas concentrações de 50, 75, 100, 200, 300, 500 e 700 ng mL^{-1} (Apêndice A).

Para a confecção da curva analítica em solvente orgânico, volumes calculados das soluções (1 e 10 mg L^{-1}) foram adicionados em sete balões volumétricos calibrados de 10 mL e o volume foi completado com solução de água com 25% de acetonitrila. Essas soluções também foram utilizadas no preparo das curvas analíticas em extrato da matriz.

Para a confecção da curva analítica em extrato da matriz, as matrizes de maçã e suco de maçã foram extraídas conforme procedimento de extração descrito em 3.9.2. Após essa etapa foram adicionados 3 mL do extrato “branco” em acetato de etila/ácido acético em 7 tubos de evaporação (um para cada ponto da curva analítica)

e o resíduo ao final da evaporação foi reconstituído com 0,75 mL de cada uma das soluções da curva analítica em solvente. Dessa maneira, tanto a curva analítica preparada em solvente orgânico quanto aquela preparada em extrato “branco” da matriz possui a mesma composição de solventes, bem como as mesmas concentrações.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em congelador a -30 °C. Antes do uso, tais soluções foram retiradas com antecedência do congelador e deixadas em repouso até atingirem a temperatura aproximada de 20 °C (laboratório com temperatura controlada de até 25 °C). Após, as mesmas foram colocadas em banho de ultrassom por cinco minutos, para então ser manuseada.

A quantificação foi realizada por padronização externa, ou seja, levando-se em consideração apenas as áreas dos picos do analito em estudo.

3.7 ESTUDO DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA

Esta parte do trabalho foi realizada através da cooperação entre o Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC) e o Núcleo de Pesquisa em Pós-Colheita (NPP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.7.1 Colheita e seleção dos frutos

Foram conduzidos dois experimentos com armazenamento de maçãs, o primeiro da cultivar ‘Galaxy’ e o segundo da cultivar ‘Fuji Kiku’, ambos no ano de 2015. Os frutos, provenientes de pomares comerciais localizados no município de Vacaria-RS, foram colhidos na plena safra das empresas de maçã, desta forma representando exatamente as condições de maturação que são utilizadas em nível comercial. A colheita das maçãs ‘Galaxy’ foi realizada no dia 13 de fevereiro de 2015 e das maçãs ‘Fuji Kiku’ no dia 07 de abril 2015.

Após a colheita, realizou-se uma pré-seleção dos frutos, eliminando-se aqueles com diâmetro muito pequeno ou aqueles excessivamente grandes, de forma de que as amostras fossem constituídas com frutos de tamanho médio de aproximadamente 130 gramas. Em seguida, os frutos foram transportados para o NPP, onde foram

instalados os experimentos, nos dias 14 de fevereiro de 2015 (maçãs 'Galaxy') e no dia 08 de abril de 2015, para (maçãs 'Fuji Kiku').

Para a formação das unidades experimentais, coletaram-se os frutos de forma aleatória das caixas usadas para o transporte, sendo que nesta etapa novamente foram retirados os frutos que apresentavam danos mecânicos em função do transporte ou colheita, lesões causados por insetos, podridões ou que estavam excessivamente maduros.

Os experimentos foram conduzidos com delineamento inteiramente casualizado, sendo quatro repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por 25 frutos, resultando em 100 frutos por tratamento.

3.7.2 Armazenamento dos frutos

As maçãs 'Galaxy' e 'Fuji Kiku' foram armazenadas em câmaras experimentais de ACD, com um volume de 233 L e colocadas dentro de uma câmara frigorífica, em que a temperatura foi mantida a 2,0 °C ($\pm 0,1$ °C) (Galaxy) e 0,5 °C (Fuji kiku) ao longo de todo os experimentos. A temperatura foi controlada por meio de um termômetro de mercúrio de alta precisão, com o bulbo inserido na polpa de um fruto. A umidade relativa também foi monitorada utilizando psicrômetros com termômetros de mercúrio nas câmaras, a qual foi mantida em 94%. As descrições dos experimentos estão dispostas nas tabelas 5 e 6.

As condição padrões de AC foram de 1,2 kPa de O₂ e 2,0 kPa de CO₂ e 1,0 kPa de O₂ e 0,8 kPa de CO₂, para maçãs 'Galaxy' e 'Fuji kiku', respectivamente. Para o controle do O₂ de forma dinâmica foram utilizados dois métodos:

3.7.2.1 Quociente Respiratório (ACD-QR)

ACD-QR 1,3: Os níveis de O₂ e CO₂ da câmara foram monitorados e corrigidos duas vezes por semana durante os meses de armazenamento. Para a determinação do QR, a pressão parcial de O₂ e CO₂ foi medida imediatamente depois que as câmaras foram hermeticamente fechadas e após 13 h de fechamento. O QR foi calculado como a razão entre o CO₂ produzido e o O₂ consumido dentro desse período (WEBER et al., 2015). A pressão parcial de O₂ foi controlada pela variação do QR. Dessa forma, se o valor de QR calculado aumentasse em relação ao valor pré-

estabelecido (QR 1,3), o nível de O₂ era aumentado em 0,01 kPa para reduzir a fermentação e ajustar o QR. Em casos de o QR ser menor que o desejado, a pressão parcial de O₂ era reduzida em 0,01 kPa para permitir o aumento da fermentação. A determinação da composição da atmosfera nas câmaras de armazenamento foi realizada com o auxílio de controlador de AC e ACD automático (Valis®, Lajeado, RS, Brasil) acoplado a analisadores de oxigênio e gás carbônico marca Siemens®. O ajuste da concentração de O₂ foi realizado pela injeção de ar natural no interior da câmara de armazenamento, enquanto que o excesso de CO₂, o qual foi mantido em 1,2 kPa, foi removido através da circulação da atmosfera da câmara com um absorvedor com hidróxido de cálcio.

3.7.2.2 Fluorescência de clorofila (ACD-FC)

Nessa técnica o limite mínimo de O₂ (LMO) tolerado pelos frutos foi monitorado pela fluorescência de clorofilas, de acordo com as instruções de Prange et al. (2007). O dispositivo foi utilizado para monitorar a fluorescência da clorofila a fim indicar o LMO durante os nove meses de armazenamento.

3.7.2.3 Aplicação do 1-MCP

Para a aplicação do 1-MCP nas maçãs 'Galaxy' utilizou-se o produto SmartFresh® na formulação pó (0,14% ingrediente ativo), na concentração de 625 ng L⁻¹. A concentração foi calculada em função do volume da câmara em que foi aplicado o produto e da concentração do mesmo. Para tanto, o produto foi solubilizado em 20 mL de água destilada, em um frasco de vidro fechado hermeticamente. Em seguida, foi transferido para uma placa de Petri, no interior das câmaras em que estavam os frutos, que foram imediatamente fechadas. A aplicação foi efetuada no início do armazenamento e os frutos ficaram expostos ao produto durante 24 horas, na temperatura de 2,0 °C.

Após 24 horas, o ar das câmaras foi circulado com ar externo a fim de retirar algum resíduo do produto, em seguida, a câmara foi aberta e os frutos retirados e acondicionados com os demais em outra câmara de AC, de acordo com cada condição de AC e ACD pré-estabelecida (BOTH et al., 2014).

Tabela 5 – Condições de armazenamento de maçãs ‘Galaxy’ sob temperatura de 2,0 °C ($\pm 0,1$ °C) e umidade relativa de 94% ($\pm 2\%$). Santa Maria, 2015.

Tratamento	Condições de armazenamento	Aplicação de 1-MCP
1	AC 1,2 + 2,0*	
2	ACD-FC (ΔO_2)** + 1,2	Não
3	ACD-QR 1,3 (ΔO_2) + 1,2	
4	AC 1,2 + 2,0	
5	ACD-FC (ΔO_2) + 1,2	Sim
6	ACD-QR 1,3 (ΔO_2) + 1,2	

AC: atmosfera controlada; ACD: atmosfera controlada dinâmica; FC: fluorescência de clorofila; QR: Quociente respiratório; *Pressão parcial de $O_2 + CO_2$ (kPa); **(ΔO_2): variação do oxigênio na condição de ACD.

Tabela 6 - Condições de ACD em maçãs ‘Fuji Kiku’ sob temperatura de 0,5 °C ($\pm 0,1$ °C) e Umidade Relativa de 94% ($\pm 2\%$). Santa Maria, 2015.

Tratamento	Condições de armazenamento
1	AC 1,0 + 0,8*
2	ACD-FC (ΔO_2)** + 0,8
3	ACD-QR 1,3 (ΔO_2) + 1,2

AC: atmosfera controlada; ACD: atmosfera controlada dinâmica; FC: fluorescência de clorofila; QR: Quociente respiratório; *Pressão parcial de $O_2 + CO_2$ (kPa); **(ΔO_2): variação do oxigênio na condição de ACD.

3.7.3 Análises de qualidade

Em ambos os experimentos, os frutos ficaram armazenados durante nove meses nas condições mencionadas acima. Após este período, os mesmos foram retirados das câmaras e expostos durante sete dias a 20 °C para simular o período de vida de prateleira, antes das análises de qualidade. Foram analisadas as seguintes variáveis:

a) Incidência de podridões: avaliada pela contagem dos frutos que apresentaram lesões com diâmetro superior a 5 mm, características de ataque de patógenos, sendo os resultados expressos em porcentagem de frutos com podridão.

b) Frutos sadios: contabilizado pelo total de frutos de cada repetição que não apresentavam nenhum dano interno ou externo (podridões, rachaduras, escaldadura, polpa farinácea) estando aptos para a comercialização e consumo, sendo expressos em porcentagem de frutos.

c) Análise de patulina: descrita a seguir no item 3.9.2.

3.8 DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM MAÇÃS E SUCOS DE MAÇÃ COLETADOS EM SUPERMERCADOS DE SANTA MARIA-RS

3.8.1 Amostragem para monitoramento em maçãs e sucos de maçã

Este estudo também objetivou determinar a micotoxina patulina em maçãs e sucos de maçã provenientes de supermercados de todas as regiões de Santa Maria - RS. Realizou-se um levantamento de todos os bairros em suas respectivas regiões. Os pontos das coletas estão dispostos no Apêndice B.

Todas as amostras foram coletadas conforme Regulamento da Comissão Europeia nº 401/2006, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial das concentrações de micotoxinas nos produtos alimentícios.

3.8.2 Amostras coletadas em supermercados

Amostras de maçãs e sucos de maçã foram coletadas no primeiro semestre de 2016 (meses de abril e maio) e no primeiro semestre de 2017 (mês de janeiro e fevereiro) na cidade de Santa Maria - RS. Foram coletadas nove amostras de cada produto em nove supermercados, totalizando 36 amostras de maçã e 36 amostras de suco.

O peso global de cada amostra, de acordo com a CE, deve ser de pelo menos um quilograma (1 kg) ou um litro (1 L). As amostras foram coletadas aleatoriamente na prateleira, representando as mercadorias que estavam à disposição do consumidor no dia da coleta. Não foi monitorada nenhuma marca comercial ou cultivar específica. As maçãs não apresentavam podridão aparente e os sucos estavam dentro do prazo de validade.

3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA PATULINA

O método analítico para determinação de patulina em frutas com alto teor de água/maçãs e sucos de maçã foi desenvolvido e validado no CEPARC conforme padrões nacionais e internacionais de qualidade. Este procedimento de validação garante que as informações geradas por um método analítico sejam confiáveis e interpretáveis sobre a amostra a que se refere. O CEPARC está em processo de

acreditação pelo INMETRO. Desta forma, as análises foram realizadas de acordo com a norma NBR ISO/IEC 17025, requisito geral para competência de laboratórios de ensaio e calibração.

3.9.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas no sistema UPLC-MS/MS foram as seguintes:

- Para o cromatógrafo a líquido:
 - Volume de injeção: 10 μL no modo *full loop*;
 - Eluente A: Água/formiato de amônio 2 g L⁻¹;
 - Eluente B: Acetonitrila;
 - Modo isocrático (água/formiato de amônio: acetonitrila) - 80:20 (v/v)
 - Vazão da fase móvel: 0,2 mL min⁻¹;
 - Temperatura do forno da coluna: 30 °C;
 - Tempo total de análise: 5 minutos.
- Para o espectrômetro de massas:
 - Ionização a pressão atmosférica por ESI no modo negativo;
 - Voltagem do capilar: 3,0 kV;
 - Temperatura do gás de dessolvatação: 400 °C;
 - Vazão do gás para dessolvatação (N₂): 500 L h⁻¹;
 - Vazão do gás no cone de amostragem (N₂): 150 L h⁻¹;
 - Vazão do gás de colisão (argônio): 0,15 mL min⁻¹;
 - Duas transições MRM (monitoramento de reações múltiplas) foram escolhidas, uma para quantificação do analito e outra para confirmação do mesmo. Essas informações estão descritas na tabela 7.

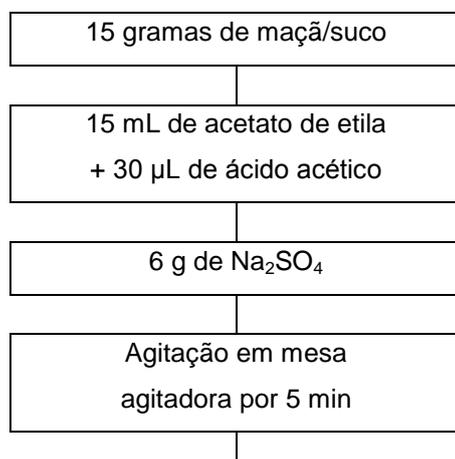
Tabela 7 - Parâmetros de análise do espectrômetro de massas para determinação da patulina.

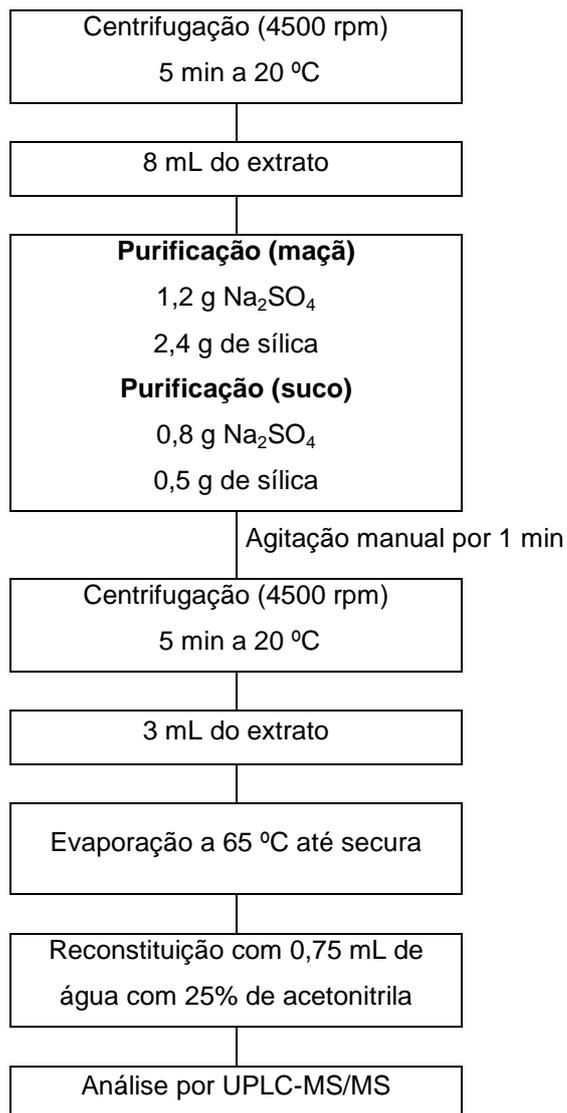
Íon precursor	Tempo de retenção (min)	Voltagem do cone (V)	Transição de Quantificação		Transição de Confirmação	
			Íon produto	Energia de colisão (V)	Íon produto	Energia de colisão (V)
153	1,6	35	109	9	125	9

3.9.2 Preparo da amostra e procedimento de extração

O procedimento de extração foi realizado a partir da homogeneização das amostras de maçã em multiprocessador e agitação das amostras de suco, onde foram pesadas 15 gramas em tubo de polipropileno com capacidade de 50 mL. Após a pesagem, adicionou-se 15 mL de acetato de etila, 30 µL de ácido acético e 6 g de Na₂SO₄. A mistura foi submetida à agitação em mesa agitadora e centrifugação em temperatura de 20 °C a 4500 rpm, ambas por 5 minutos. Após centrifugação, 8 mL do extrato foram transferidos para tubos contendo 1,2 g de Na₂SO₄ e 2,4 g de sílica para a etapa de purificação nas amostras de maçã e 0,8 g de Na₂SO₄ e 0,5 g de sílica para as amostras de suco de maçã. Posteriormente, esse extrato foi submetido à agitação manual por um minuto e novamente, a uma etapa de centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. Uma alíquota de 3 mL foi transferida para tubos de evaporação e levadas ao concentrador de amostras a uma temperatura de 65 °C. Ao final, o resíduo foi reconstituído em 0,75 mL de água com 25% de acetonitrila. A figura 5 mostra o fluxograma do procedimento de análise empregado.

Figura 5 - Representação do método individual empregado para extração e análise de patulina em maçã e suco de maçã.





3.9.2.1 Avaliação de amostras “branco”

Na ausência de matriz “branco” (amostra sem conter o analito) da matriz em estudo, amostras de maçã e suco foram adquiridas em supermercados e avaliadas para o uso como matriz “branco” para confecção das soluções analíticas em matriz. As amostras foram armazenadas em congelador com temperatura máxima controlada de -18°C.

3.9.3 Validação do método analítico

3.9.3.1 Curva analítica e linearidade

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções analíticas preparadas tanto em solvente orgânico quanto no extrato da matriz (extrato “branco” de maçã e suco).

Primeiramente, injetou-se o extrato “branco” dos reagentes (procedimento de extração realizado sem a matriz e sem o analito, para verificar a pureza dos reagentes) e extrato “branco” da matriz (extração da matriz sem a adição do analito, para verificar se a matriz não contém o analito em estudo). Em seguida, procedeu-se a injeção das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz, preparadas conforme item 3.6.2. As soluções foram injetadas em ordem crescente de concentração, onde a solução em solvente foi injetada e na sequência a solução em extrato de matriz de mesma concentração, evitando assim o fenômeno de *carry over* na coluna cromatográfica. Esta sequência de injeção foi repetida por sete vezes.

A partir dos dados obtidos realizaram-se os cálculos da média das áreas e dos valores de RSD% das injeções. Para obtenção das curvas analíticas ($y = ax + b$) a concentração do analito foi plotada no eixo das abscissas e a respectiva área obtida foi plotada no eixo das ordenadas. No caso em que a matriz “branco” continha o analito, a média das áreas do analito no extrato “branco” foi descontada do valor de área, em cada uma das soluções da curva analítica. A partir da plotagem desses dados obteve-se o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) das curvas analíticas, bem como a equação da reta para a patulina.

3.9.3.2 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado de duas maneiras. A primeira delas baseia-se na comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente orgânico e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz. O cálculo foi efetuado através da Equação 1. Através dessa equação foi possível determinar o efeito matriz em cada ponto (cada concentração) da curva analítica estudada.

$$Efeito\ Matriz\ (\%) = \frac{A1 - A2}{A2} \times 100$$

Equação 1

Onde:

A1 = média das áreas da solução em extrato da matriz em uma determinada concentração;

A2 = média das áreas da solução em solvente orgânico em uma determinada concentração.

A outra maneira de avaliação do efeito matriz foi realizada com base na comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico com aquelas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em extrato da matriz.

O cálculo para a avaliação do efeito matriz a partir das inclinações das curvas analíticas foi realizado de acordo com a Equação 2.

$$EfeitoMatriz(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{Sm}{Ss} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

Sm = inclinação da curva analítica preparada em extrato “branco” da matriz;

Ss = inclinação da curva analítica preparada em solvente orgânico.

Através dessas equações foi possível determinar se a matriz exerce efeito positivo (acréscimo na intensidade do sinal) ou negativo (supressão do sinal) sobre o resultado da análise. Conforme o documento SANTE, resultados com efeito matriz entre +20% e -20% não representam mudanças consideráveis nos sinais dos analitos e podem ser desconsiderados. Para valores de efeito matriz que excedem a faixa de $\pm 20\%$, o ideal é que a quantificação seja realizada empregando curva analítica preparada em extrato branco da matriz. Dessa maneira, a análise torna-se mais confiável, devido às semelhanças na composição entre o analito presente no extrato da amostra e na curva analítica em questão.

3.9.3.3 Limite de detecção e quantificação

Com base nos dados obtidos no estudo de linearidade das curvas analíticas do analito estudado, foi determinado a estimativa do limite de detecção do instrumento

(LOD_i) e do método (LOD_m), bem como do limite de quantificação do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m).

A partir das áreas e do valor de RSD% (7 réplicas) do analito, presente nas sete soluções analíticas estudadas, aplicou-se a Equação 3 e obteve-se a estimativa do LOD_i ($\mu\text{g L}^{-1}$)

$$LOD_i = 3 \times RSD \times C \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

RSD%: desvio padrão relativo das áreas das 7 injeções em determinada concentração;

C: concentração da solução analítica.

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator obtido para o método de extração – fator 0,25, obtém-se a estimativa do LOD_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

A partir da estimativa do LOD_i , aplicando-se a Equação 4, obtém-se o valor do LOQ_i (ng mL^{-1}).

$$LOQ_i = LOD_i \times 3,33 \quad \text{Equação 4}$$

Através da multiplicação do LOQ_i pelo fator do método de extração é possível obter a estimativa do valor do LOQ_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$). No entanto, considera-se como valor real do LOQ_m a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresenta recuperações entre 70 e 120%, com valores de RSD% menor ou igual a 20% (PIZZUTTI, 2006).

3.9.3.4 Ensaios de fortificação e recuperação

Para avaliar a exatidão do método desenvolvido, ensaios de fortificação e recuperação foram empregados. A amostra “branco” de maçã e suco de maçã foi contaminada com uma quantidade conhecida da solução analítica de 1 mg L^{-1} de

patulina, em concentrações diferentes (25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Para cada concentração de fortificação foram realizadas sete replicatas.

O cálculo para a quantidade de solução analítica adicionada para a fortificação em cada concentração está detalhado no apêndice C.

O critério de aceitação para os ensaios de fortificação é que os valores de recuperação estejam compreendidos na faixa de 70 a 120%, com valores de RSD% menor ou igual a 20% (SANTE, 2015).

3.10 DETERMINAÇÃO DO pH EM SUCOS

A determinação do pH dos sucos foi realizada com medidor de pH digital marca Bel Engineering, modelo W3B, após calibração com solução de pH 4,0 e solução de pH 7,0 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o experimento I (maçãs 'Galaxy'), a interpretação dos resultados foi considerada como um bifatorial, sendo um fator as condições de armazenamento e o outro, a presença ou não de 1-MCP. Já, para o experimento II (maçãs 'Fuji kiku'), foi considerado como unifatorial, comparando apenas as condições de armazenamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Assistat 7.5 beta. Quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

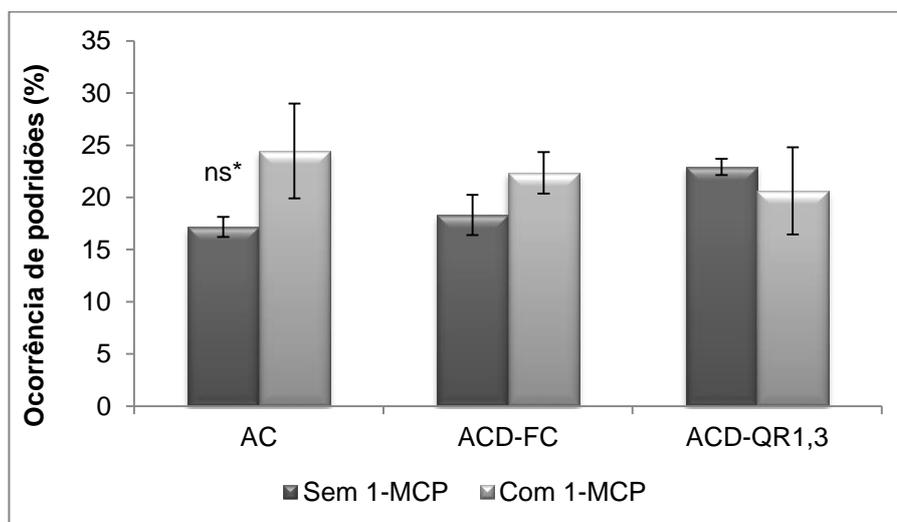
4.1 ESTUDO DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA

4.1.1 Ocorrência de podridão e frutos sadios em maçãs 'Galaxy'

A podridão é um dos principais atributos de qualidade de maçãs. Na avaliação da ocorrência de podridões, após nove meses de armazenamento somados a sete dias de exposição das maçãs a 20 °C (vida de prateleira), não foi observada diferença estatística entre os frutos armazenados nas diferentes condições de AC ou aplicação de 1-MCP (Figura 6). No entanto, a condição de AC padrão (1,0 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂) com aplicação de 1-MCP foi a que proporcionou a maior ocorrência de podridões, apresentando um valor médio de 24,5% de frutos com podridões, provavelmente devido à inibição de resposta de um metabólito benéfico, possivelmente relacionado ao mecanismo de defesa dos vegetais (KU et al., 1999).

A condição que ocasionou o menor índice de frutos com podridão foi a mesma citada anteriormente, porém, sem a aplicação do 1-MCP, a qual apresentou um valor médio de 17,2% de frutos com podridão (Figura 6).

Figura 6 - Ocorrência de podridões em maçã 'Galaxy' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC), com ou sem aplicação de 1-MCP, somados a sete dias de exposição a 20 °C.



*não significativo ($p < 0,05\%$); ACD: atmosfera controlada dinâmica FC: fluorescência de clorofila; QR: quociente respiratório.

Devido ao fato de o 1-MCP não apresentar toxicidade, ser ativo em concentrações muito baixas, ter seu resíduo desprezível e ser considerado não nocivo para seres humanos e para o meio ambiente, apresenta-se como uma ferramenta para manter a qualidade dos produtos hortícolas (LUO et al., 2007). Entretanto, a divergência quanto à atuação do 1-MCP nos índices de podridão em frutos é notável e pode ser explicada pelo uso de diferentes cultivares e diferentes condições experimentais.

Cabe ressaltar que além destes fatores, a concentração e o tempo de exposição ao produto, o estágio de maturação dos frutos, a temperatura de tratamento e o período entre a colheita e a aplicação do tratamento, também influenciam as respostas dos frutos ao tratamento com o 1-MCP (BLANKENSHIP e DOLE, 2003). O retardo do amadurecimento dos frutos tratados com 1-MCP pode resultar em redução do desenvolvimento de podridões, entretanto, há dados na literatura evidenciando desvantagens do seu uso, relacionadas a doenças pós-colheita.

O 1-MCP pode afetar certas rotas metabólicas responsáveis por mecanismos de defesa, e assim aumentar a incidência de doenças (BOWER et al., 2003), o que corrobora com os resultados apresentados neste estudo. Por outro lado, o 1-MCP pode retardar o desenvolvimento de doenças através da manutenção da qualidade do fruto, inibindo o amadurecimento (SINGH e PAL, 2008).

Frutos em avançado estágio de amadurecimento apresentam menor integridade na parede celular e tornam-se mais susceptíveis a ferimentos e ao ataque de fungos (KADER, 1992), fatos que podem estar relacionados ao aparecimento de podridões neste experimento. A combinação do armazenamento sob AC com a aplicação de 1-MCP pode proporcionar efeitos aditivos, especialmente após longos períodos de armazenagem (FAN et al., 1999; ARGENTA, 2000; WATKINS et al., 2000).

Segundo Brackmann et al. (2004), a aplicação de 1-MCP na dose de 625 nL L^{-1} , a mesma utilizada neste estudo, proporcionou efeitos benéficos na manutenção da qualidade de maçãs 'Gala', incluindo menor incidência de distúrbios fisiológicos e podridões, demonstrando portanto, o forte efeito desse antagonista ao etileno sobre o amadurecimento destes frutos. Já Corrent et al. (2005) comprovaram que a aplicação de 1-MCP em maçã 'Fuji' armazenada em AC não proporcionou benefícios em

relação a ocorrência de podridões, sendo eficiente apenas em armazenamento refrigerado.

Ainda neste contexto, doses de 0 a 4 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP foram testadas em frutos de goiabeira serrana armazenados sob refrigeração (4°C e 90% UR) durante três semanas. Os autores afirmaram que o aumento nas doses ocasionou incremento na ocorrência de podridões, demonstrando que o tratamento com 1-MCP possui efeitos inconsistentes na diminuição das podridões (VELHO, 2009). Este resultado vai de encontro aos resultados apresentados por Jiang et al. (2001), onde afirmaram que altas doses de 1-MCP aceleraram o desenvolvimento de doenças em morango, em função da inibição da síntese de Fenilalanina-amônia-liase (FAL) e de compostos fenólicos.

Resultados similares ao deste estudo foram obtidos por Blankenship e Dole, (2003), que afirmam que em algumas espécies tratadas com 1-MCP, foi observado um aumento na incidência de doenças pós-colheita. Em maçãs 'Venice' armazenadas sob AC (1,5 kPa de O_2 e 1,5 kPa de CO_2), o uso de 1-MCP não proporcionou vantagens na manutenção da qualidade dos frutos, aumentando a incidência de podridões (BETINELLI, 2016).

Observou-se maior ocorrência de injúria externa por alto CO_2 em frutos tratados com 1-MCP, comparada aos não tratados (DeELL et al., 2002; WATKINS et al., 2000). Além disso, também foram observadas manchas marrons na superfície de maçãs 'Granny Smith' tratadas com 1-MCP, que na sequência mudaram para manchas necróticas escuras com formato arredondado de 2 a 4 mm de diâmetro (ZANELLA et al., 2003). Entretanto estes autores sugerem que este efeito fitotóxico do 1-MCP possa estar relacionado com o clima extremamente quente e seco durante a fase vegetativa e colheita dos frutos daquela safra.

Both et al. (2014) encontraram um menor índice de podridão (13%) comparado ao valor encontrado deste estudo (25%) em maçãs 'Royal Gala', na mesma condição de AC, porém após sete meses de armazenamento.

No entanto, deve-se ressaltar que, com o passar do tempo, novos receptores são sintetizados, tornando o fruto novamente sensível ao etileno, recuperando o processo de amadurecimento (BRON et al., 2006), ou seja, o 1-MCP não tem efeito direto sobre fungos e, à medida que os frutos recuperam a habilidade de amadurecer, as podridões podem eventualmente se desenvolver, o que pode justificar os resultados deste estudo. AZZOLINI (2005) afirma que no avanço do processo de

amadurecimento do fruto, o mesmo torna-se mais susceptível ao ataque de patógenos, devido à diminuição da resistência da casca e da polpa.

Entretanto, resultados contraditórios foram apresentados por SISLER (1996); FAN (1999) e JACOMINO (2002), onde o 1-MCP teve sua eficiência demonstrada em alguns casos, como banana, maçã, tomate e melão. Uma vez que retarda o amadurecimento, o 1-MCP tem sido usado para o controle de inúmeros patógenos em pós-colheita na hipótese de que frutos com amadurecimento mais lento seriam mais resistentes a podridões.

Resultados obtidos por Terao et al. (2003) confirmam o benefício do 1-MCP em melões do tipo 'Orange', onde frutos tratados com 1-MCP, mantiveram baixo nível de severidade de podridão causada por *F. pallidoroseum*, mesmo quando foram armazenados em temperatura ambiente, enquanto frutos da testemunha apresentaram elevados níveis de severidade desde a primeira avaliação, aos 5 dias da colheita, evoluindo rapidamente para o descarte. Este estudo mostrou que o melhor controle de podridão foi obtido ao redor da dosagem de 350 nL L⁻¹ de 1-MCP.

Girardi et al. (2003), afirmaram que houve uma maior incidência de podridões em pêssegos (cultivar Chiripá) que não foram tratados com 1-MCP durante todo o período de armazenamento refrigerado. Quanto às frutas tratadas com 1-MCP, não foram observadas podridões até o trigésimo dia de armazenamento. No entanto, observou-se que os menores índices de podridões foram nas frutas tratadas com 1-MCP e, nestes, o menor foi com a aplicação de 1800 nL L⁻¹ de 1-MCP. Concluindo, portanto, que a aplicação do 1-MCP reduz a ocorrência de podridões e a produção de etileno após 30 dias de armazenamento, onde as doses de 900 e 1800 nL L⁻¹ de 1-MCP tiveram efeito semelhante sobre a conservação e qualidade dos pêssegos.

Os resultados referentes ao índice de podridão encontrados neste trabalho vão de encontro à afirmação de WATKINS (2010) que concluiu que mesmo em AC ocorrem perdas durante um armazenamento prolongado, especialmente com a ocorrência de distúrbios fisiológicos e podridões.

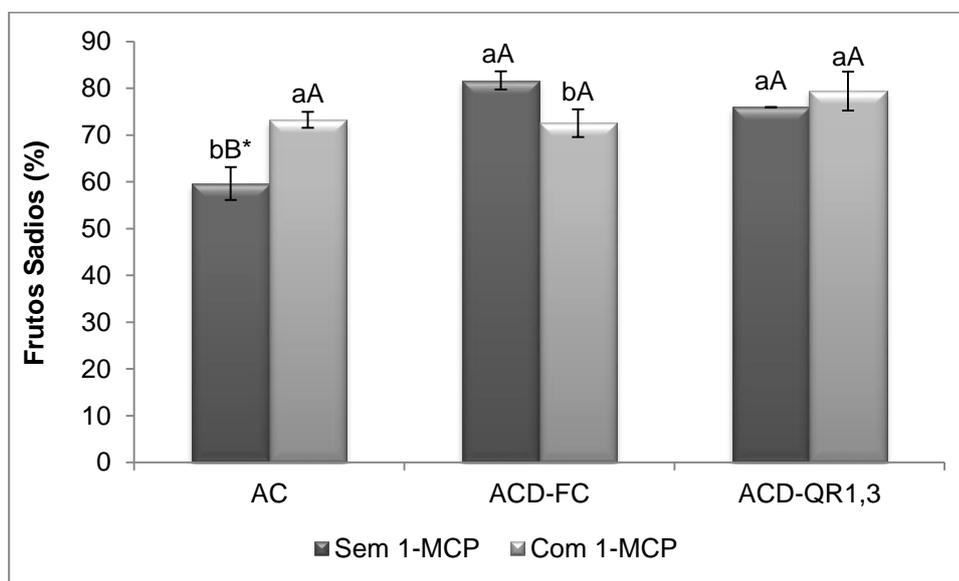
Fica evidente, a partir destes resultados, que tanto a aplicação de 1-MCP, quanto as condições de ACD pelo método de fluorescência de clorofila e quociente respiratório não foram suficientes para impedir a ocorrência de podridões nos frutos.

Na avaliação de frutos sadios, houve diferença significativa entre o 1-MCP e as diferentes condições de armazenamento (Figura 7). Em relação à aplicação do 1-MCP, na condição AC padrão a presença de 1-MCP aumentou a presença de frutos

sadios. Já, na condição ACD com o método de fluorescência de clorofila com 1-MCP, obteve-se comportamento inverso, pois a presença de 1-MCP reduziu a porcentagem de frutos sadios. Na condição ACD com quociente respiratório (QR 1,3), não houve diferença significativa entre a presença ou não de 1-MCP.

Em relação às condições de armazenamento sem 1-MCP, a menor porcentagem de frutos sadios foi obtida na condição de AC padrão sem aplicação de 1-MCP, cujo valor foi de 59,6%, mostrando que não é um valor alto, onde esse percentual poderia ser visto como inviável comercialmente. No entanto, para este estudo, todas as frutas com qualquer tipo de distúrbio fisiológico interior, independente da sua dimensão, foram consideradas não sadias. Para as empresas comerciais, a qualidade interna não é um fator que exclui maçãs do mercado (WEBER et al, 2015). Entretanto as outras duas condições não diferiram entre si. Quando aplicado o 1-MCP, as três condições de armazenamento não diferiram entre si.

Figura 7 - Porcentagens de frutos sadios de maçã 'Galaxy' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC), com ou sem aplicação de 1-MCP, somados a sete dias de exposição a 20 °C.



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$). Letras minúsculas comparam condições de presença e ausência de 1-MCP dentro de cada condição de armazenamento; Letras maiúsculas comparam condições de armazenamento dentro de cada nível do fator 1-MCP; ACD: atmosfera controlada dinâmica; FC: fluorescência de clorofila; QR: Quociente respiratório.

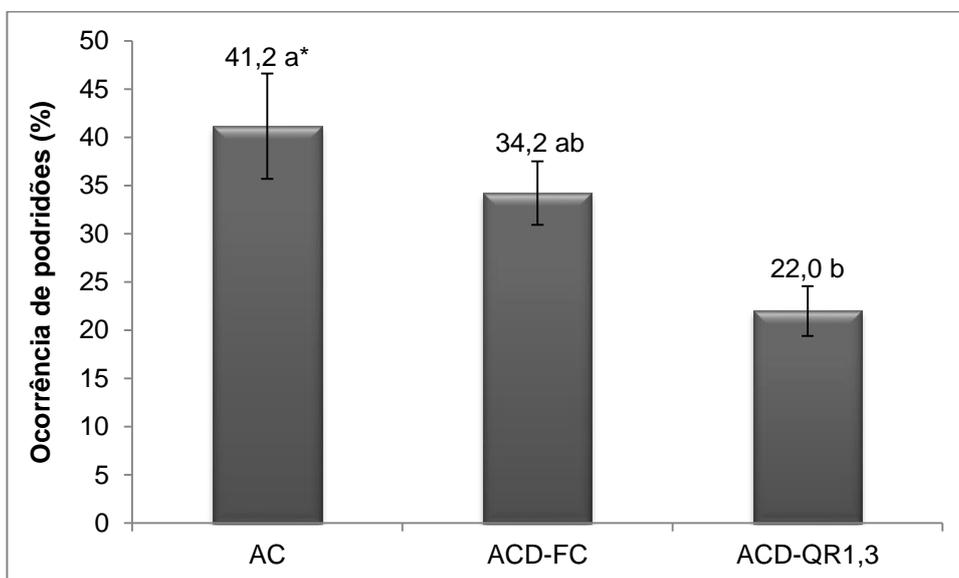
A maior porcentagem de frutos sadios foi verificada na condição de ACD pelo método de fluorescência de clorofila sem aplicação do 1-MCP, apresentando como valor médio de 81,7% de frutos sadios. Este resultado discorda com dados apresentados por Both (2012), pois concluiu que a porcentagem de frutos sadios no armazenamento em ACD-FC foi inferior a outras condições de AC estudadas. Entretanto, vai de encontro a outros dados da literatura que relatam maior preservação da qualidade dos frutos em ACD por este método (PRANGE et al., 2005; WATKINS, 2008; GASSER et al., 2010).

4.1.2 Ocorrência de podridão e frutos sadios em maçãs 'Fuji Kiku'

Após nove meses de armazenamento somados a sete dias de exposição dos frutos 'Fuji Kiku' a 20 °C (vida de prateleira), houve diferença significativa entre as diferentes condições de armazenamento na ocorrência de podridões (Figura 8). A condição de ACD com método de quociente respiratório foi a que proporcionou a menor ocorrência de podridões, apresentando um valor médio de 22% de frutos com podridões, diferindo estatisticamente das outras duas condições (AC padrão e ACD-FC). Este resultado vai de encontro a afirmação de WEBER et al. (2015) e BRACKMANN et al. (2015), que concluíram que a condição de ACD com monitoramento através do quociente respiratório mantém a maior qualidade de frutos de 'Royal Gala' e 'Galaxy', comparando com a AC e a ACD-FC.

A condição que ocasionou o maior índice de frutos podres foi a condição AC padrão, a qual apresentou um valor médio de 41,2% de frutos podres. Possivelmente essa condição permitiu o rápido amadurecimento propiciando a degradação das membranas celulares e contribuindo para a infecção de fungos e desenvolvimento de podridões.

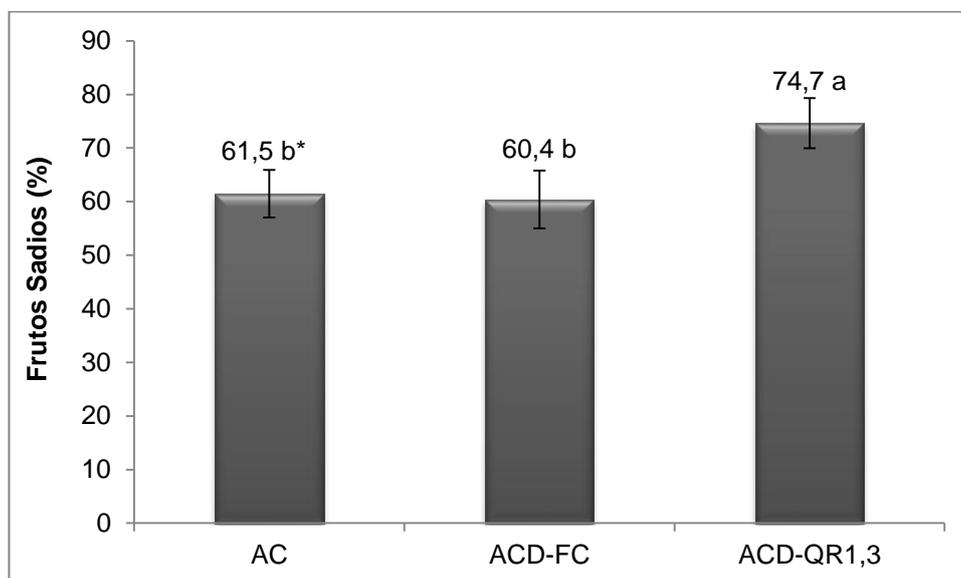
Figura 8 – Ocorrência de podridões em maçã 'Fuji Kiku' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada, somados a sete dias de exposição a 20 °C.



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Em relação à porcentagem de frutos sadios, também houve diferença significativa entre as condições de armazenamento (Figura 9). A maior porcentagem de frutos sadios foi verificada na condição ACD-QR 1,3, apresentando um valor médio de 74,7% de frutos sadios, diferindo estatisticamente das outras duas condições. Esta técnica levou vantagem neste experimento, pois o estresse na ACD pôde ser detectado em momento mais precoce, comparado, por exemplo, com a AC padrão. Ou seja, a ACD permitiu determinar indiretamente nos frutos quando as condições de O_2 da AC chegam a níveis críticos que poderiam causar danos às células e tecidos dos frutos.

Figura 9 – Porcentagem de frutos sadios em maçã 'Fuji Kiku' após nove meses de armazenamento em atmosfera controlada, somados a sete dias de exposição a 20 °C.



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Sabe-se que a refrigeração é o processo mais indicado para prolongar a vida pós-colheita das frutas, bem como, para suprimir o desenvolvimento de podridões. O armazenamento a baixas temperaturas proporciona um retardo no amadurecimento, na perda da firmeza e mantém a acidez mais elevada e, portanto, retarda o início de ocorrência de doenças fúngicas (ROMBALDI et al., 2001). Entretanto, quando os frutos são retirados das salas de armazenamento, eles podem ser armazenados em temperatura ambiente antes do processamento. Esta é uma prática comum em indústrias de processamento.

Porém, é bem conhecido que, embora a deterioração de frutos evolua lentamente em armazenamento a frio, o rápido desenvolvimento de fungos ocorre quando a fruta é transferida para um ambiente quente, pois a baixa temperatura de armazenamento detém a podridão temporariamente, mas quando as frutas são expostas a temperaturas mais altas aumenta o processo metabólico dos patógenos e das frutas, levando-as ao amadurecimento e diminuindo a resistência a podridões (FALLIK et al., 2001). Portanto, a presença de podridões nos frutos em todas as condições estudadas em ambos os experimentos, deve-se em grande parte, pela exposição desses frutos à condição de vida de prateleira (20 °C por 7 dias).

Outra situação que pode ter influenciado os índices de podridão apresentados neste estudo é o fato que os esporos do fungo *P. expansum* disseminam a doença,

podendo sobreviver e contaminar o ambiente onde os frutos estão armazenados. Devido à sua estrutura, a maçã permite a internalização de micro-organismos através das aberturas do cálix e do pedúnculo (BARTS, 2005).

Segundo Prusky e Lichter (2008), patógenos causadores de doenças em pós-colheita, penetram por ferimentos, por aberturas naturais ou diretamente pela cutícula intacta, e podem permanecer quiescentes, como micro-organismos biotróficos, durante o desenvolvimento da fruta, transformando-se em necrotróficos, causadores de podridões, durante o amadurecimento e senescência. Isso ocorre em função de modificações bioquímicas, como a perda de mecanismos naturais que protegem as frutas imaturas contra o ataque de fungos como: a composição nutricional imprópria ao desenvolvimento do patógeno, a presença de compostos antifúngicos pré-formados ou induzidos, o ambiente inadequado para ativação de fatores de patogenicidade.

Ainda neste contexto, outro fator que deixa as maçãs mais suscetíveis à incidência de podridões e distúrbios fisiológicos, é a colheita ser realizada em tempo incorreto, ou seja, tardiamente (FAN et al., 2011). Estudos com maçãs 'Gala', 'Fuji' e 'Braeburn' mostram o aumento do desenvolvimento de podridões pela colheita tardia (STEFFENS et al., 2005).

Desta forma, se faz necessário o estudo e desenvolvimento de tecnologias de armazenamento que diminuam as perdas pós-colheita devido a todos esses fatores apresentados.

4.2 DETERMINAÇÃO DE PATULINA

4.2.1 Validação do método analítico

A validação do método analítico demonstrou ser linear na faixa de concentração estudada (50 – 700 $\mu\text{g L}^{-1}$). O valor médio do efeito matriz foi de -42% para patulina em maçãs e -22% em sucos. O LOQ foi estabelecido como sendo 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em relação à precisão e exatidão, os valores de recuperação variaram entre 75,5 a 84,1% para maçãs e 102,3 a 107,5% para sucos, com desvio padrão relativo (RSD) de 3,7 a 7% (maçãs) e 6,5 a 14,9% (sucos) para todos os níveis estudados. Todos os resultados do método analítico demonstraram serem satisfatórios para os parâmetros estudados para determinação da micotoxina patulina em maçã e suco de maçã

segundo critérios estabelecidos pela comissão europeia (Comissão europeia, 2006b). Os mesmos estão descritos nos anexos A ao H.

4.2.2 Ocorrência de patulina

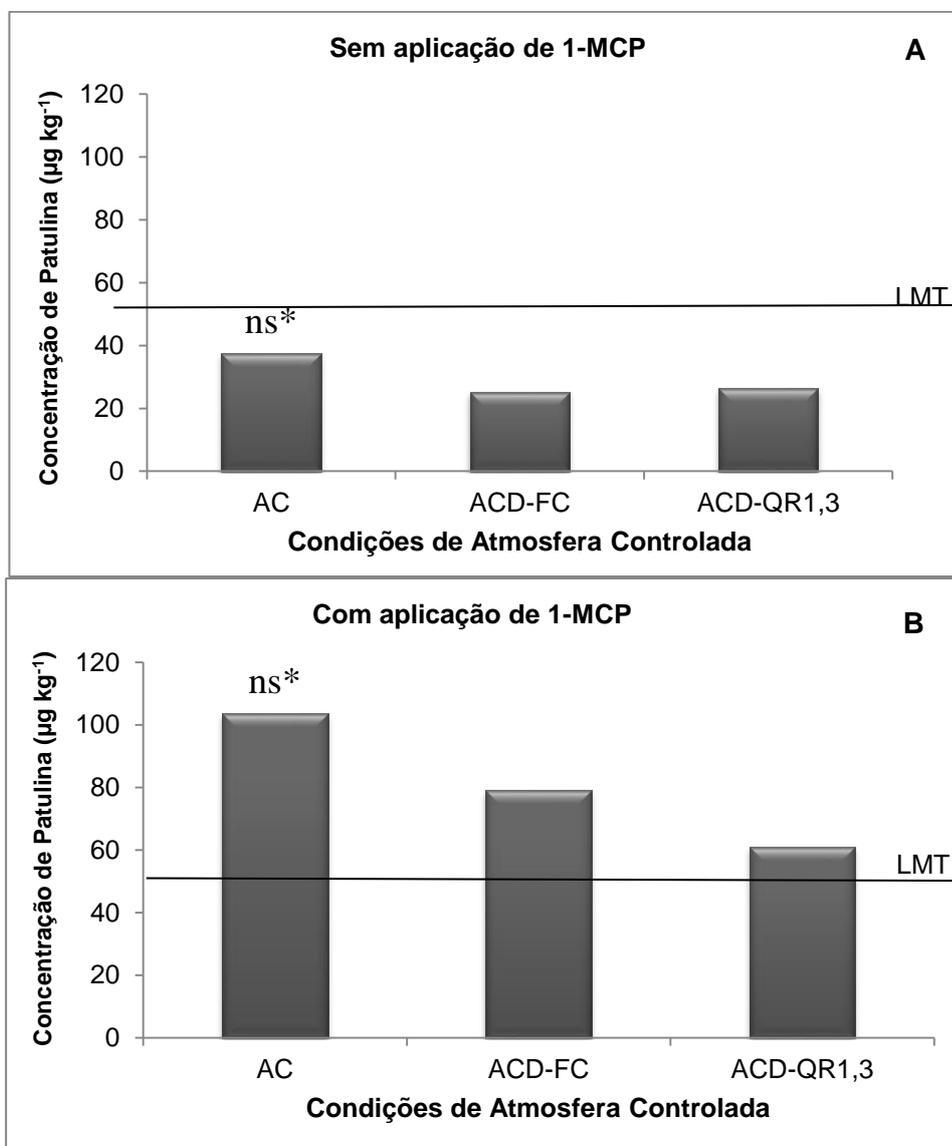
Na avaliação da ocorrência de patulina, observou-se que nenhuma das técnicas de armazenamento estudadas foi capaz de evitar a presença desta micotoxina, tanto na maçã 'Galaxy' quanto na 'Fuji kiku'.

Todas as maçãs com índice de podridão apresentaram a micotoxina patulina após nove meses de armazenamento em ACD, somados a sete dias de exposição a 20 °C. Isso vai de encontro com relatos de alguns autores que afirmam que o armazenamento à temperatura ambiente após o armazenamento a frio leva a um rápido desenvolvimento de patulina no tecido deteriorado (FALLIK et al., 2001).

As condições de armazenamento de maçãs 'Galaxy' sem a aplicação do 1-MCP mostraram-se mais eficazes em reduzir as concentrações da micotoxina, pois os frutos apresentaram patulina em concentrações inferiores ao LMT de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Constataram-se valores de contaminação de 37,5; 25,3 e 26,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em média, para a condição de AC, ACD-FC e ACD-QR 1,3, respectivamente (Figura 10a). Os resultados não apresentaram diferença estatística entre si.

Entretanto, os dados encontrados nas condições de armazenamento com a aplicação do 1-MCP, mostraram que a aplicação do 1-MCP aumentou consideravelmente a produção de patulina. Todos os valores de contaminação encontrados foram acima do LMT. Os valores médios foram de 103,3; 79,1 e 61,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as condições de AC, ACD-FC e ACD-QR 1,3, respectivamente (Figura 10b). Nesta condição, os resultados também não diferiram estatisticamente entre si.

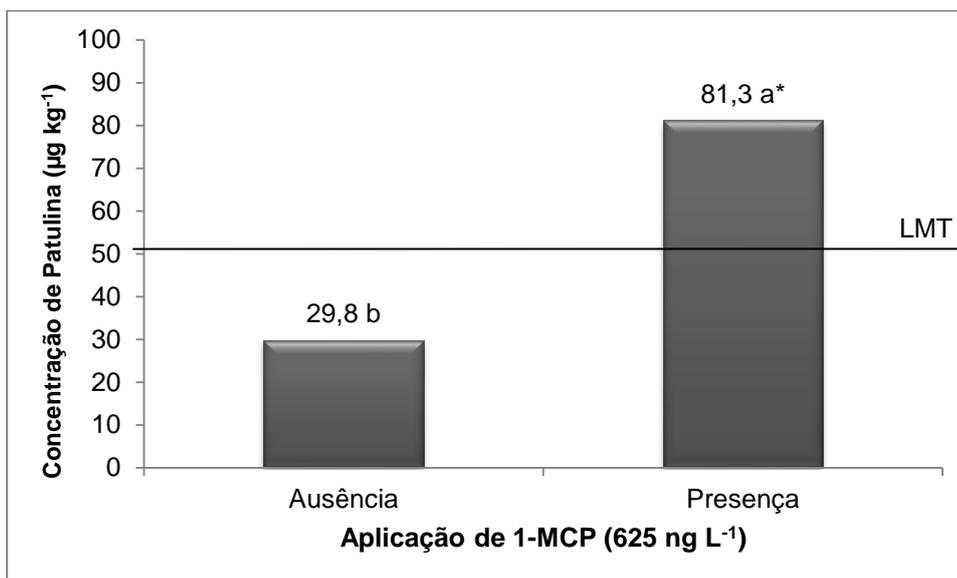
Figura 10 - Concentração de patulina em maçãs 'Galaxy' após nove meses nas condições de armazenamento em AC (a) sem e (b) com aplicação de 1-MCP, em 2,0 °C, somados a sete dias de exposição a 20 °C.



*não significativo ($p < 0,05\%$); AC: atmosfera controlada; ACD: atmosfera controlada dinâmica; FC: fluorescência de clorofila; QR: quociente respiratório.

Comparando, portanto, as condições de ausência e presença do 1-MCP no armazenamento, a condição de ausência deste composto apresentou uma média de $29,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ de patulina. Já a condição com a presença do 1-MCP, um valor médio de $81,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi encontrado, apresentando diferença estatística em relação à outra condição (Figura 11).

Figura 11 - Concentração de patulina em maçãs 'Galaxy' após nove meses nas condições de armazenamento em atmosfera controlada com e sem aplicação de 1-MCP, em 2,0 °C, mais sete dias de exposição a 20 °C.

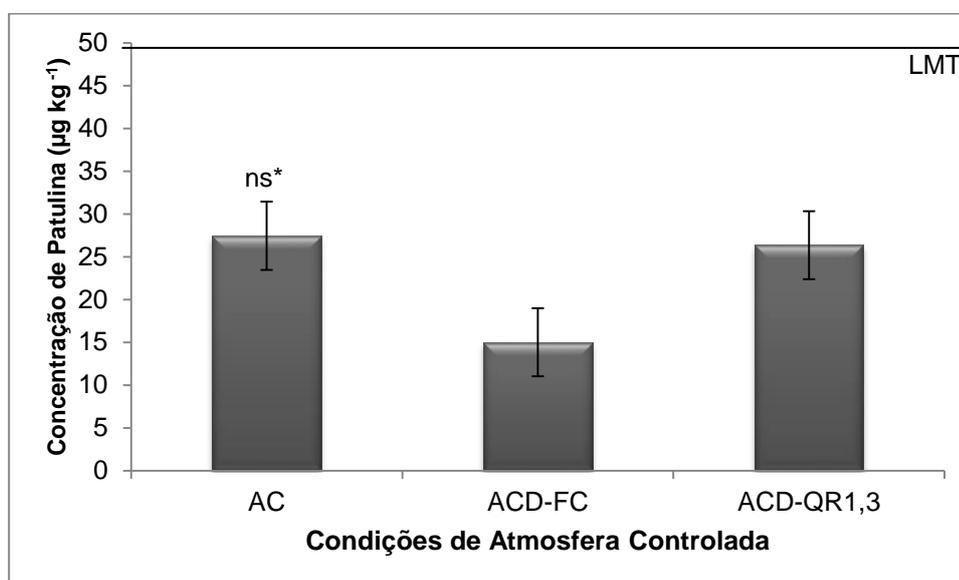


*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

São recentes os trabalhos publicados relacionando a influência da AC na produção de patulina. Além disso, até o momento, não há dados na literatura relacionando essas novas estratégias de armazenamento envolvendo quociente respiratório e fluorescência de clorofila com a presença desta micotoxina em maçãs, tampouco relacionando a presença ou não do 1-MCP. Entretanto, fica evidente que a partir desses resultados, a aplicação do 1-MCP pode ter proporcionado uma maior condição de estresse ao fungo, e em consequência disso, uma maior produção de metabólitos secundários, neste caso a micotoxina patulina.

Em relação às condições de armazenamento empregadas com a maçã 'Fuji Kiku', os valores encontrados na contaminação de patulina foram abaixo do LMT. Os valores médios foram 27,3; <LOQ e 26,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as condições de AC, ACD-FC e ACD-QR 1,3, respectivamente (Figura 12). Os valores não apresentaram diferença estatística entre si. Mesmo assim, ressalta-se que a técnica utilizando monitoramento com fluorescência de clorofila proporcionou a menor concentração de patulina nos frutos.

Figura 12 - Concentração de patulina em maçãs 'Fuji Kiku' após nove meses nas condições de armazenamento em AC a 0,5 °C, somados a sete dias de exposição a 20 °C.



*não significativo ($p < 0,05\%$); AC: atmosfera controlada; ACD: atmosfera controlada dinâmica; FC: fluorescência de clorofila; QR: quociente respiratório.

Neste estudo, não foi detectada a presença de patulina nas maçãs sadias, tanto 'Galaxy' quanto 'Fuji Kiku'. Isto mostra que maçãs com podridão contaminadas com patulina, armazenadas nas mesmas câmeras de armazenagem, não contaminaram as maçãs sadias de um mesmo tratamento. Ou seja, todas as diferentes formas de armazenamento a atmosfera controlada foram eficientes em prevenir a contaminação de patulina em maçãs sadias.

Baert et al. (2007) estudaram a influência das condições de armazenagem no crescimento e na produção de patulina por diferentes cepas de *P. expansum* em um meio de cultura e em maçãs. O crescimento foi fortemente influenciado pela temperatura, enquanto que a atmosfera utilizada (20,3 e 1% de O₂; <1% CO₂) não teve efeito. O crescimento ótimo de patulina foi observado a 25 °C para cada cepa testada. A produção de patulina foi estimulada quando houve diminuição da temperatura (de 20 °C para 10 ou 4 °C), enquanto uma redução ainda maior da temperatura para 1 °C causou uma redução na produção de patulina. Uma diminuição clara da produção de patulina foi observada quando o nível de O₂ foi reduzida de 3 para 1%.

Morales et al. (2007a) estudaram o efeito das condições tanto em LO como U-LO no crescimento *P. Expansum* e produção de patulina em maçãs sob condições

de armazenamento a frio. Curiosamente, após 2 meses de armazenamento em AC, as lesões em maçãs armazenadas em condições ULO foram maiores do que aqueles em condições LO. Estes resultados confirmam que as altas concentrações de CO₂ são mais eficientes do que baixas concentrações de O₂ na prevenção do crescimento do fungo e produção de patulina.

Baert et al. (2008) constataram uma clara redução de patulina quando a concentração de O₂ passou de 3% para 1%, independente da cepa testada. Os autores concluíram que a temperatura e a pressão parcial de O₂ deve ser tão baixa quanto possível, a fim de suprimir a produção de patulina. Assim, acredita-se que nestas condições de estresse (temperaturas baixas, níveis baixos de O₂ e altos níveis de CO₂) ambos os metabólitos primário e secundário de *P. expansum* são diminuídos.

Morales et al. (2007b) relataram que maçãs armazenadas a frio durante 60 dias em condições de AC apresentavam lesões cujo diâmetro variava de 2 a 4 cm, mas não foi detectada patulina. De acordo com outros estudos (Morales et al., 2007a e Morales et al., 2008), a acumulação de patulina após 60 dias de armazenamento a frio convencional variou de 44 a 468 ng por maçã.

Relata-se que a produção de patulina a 20 °C em maçãs 'Gold' começou dois dias após a inoculação de *P. expansum*. Dada a rápida acumulação de patulina observada à temperatura ambiente, outros testes devem ser realizados para estabelecer o período mínimo de tempo que permita a produção de patulina (CAST, 2003).

Segundo estudos de Morales et al. (2007c), não foi encontrada diferença na produção de patulina em relação a fatores como: condições de AC, tempo no armazenamento, fungicida e maturação. Os autores concluíram que o fator mais importante é o tempo de exposição dos frutos em temperatura ambiente.

Correlacionado o índice de podridão e a concentração de patulina nas maçãs, percebeu-se que em ambos os experimentos, houve uma tendência de aumento na concentração de patulina à medida que aumenta a ocorrência de podridões (Figura 13 e 14). Porém, em função do baixo coeficiente de correlação, sugere-se que, mesmo em amostras com poucos frutos podres pode-se verificar altas concentrações desta micotoxina e, o contrário desta situação também pode-se fazer verdadeiro.

Figura 13 - Correlação entre o índice de podridão (%) e a concentração de patulina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em maçãs 'Galaxy'.

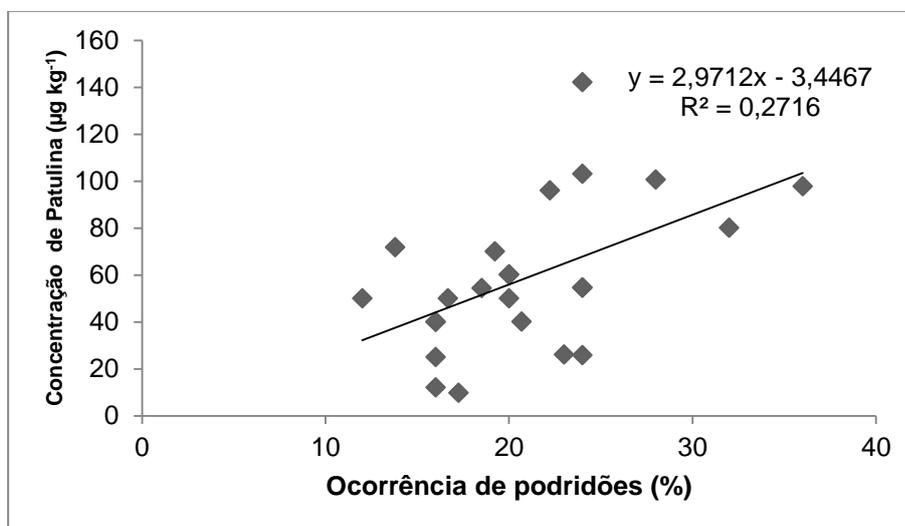
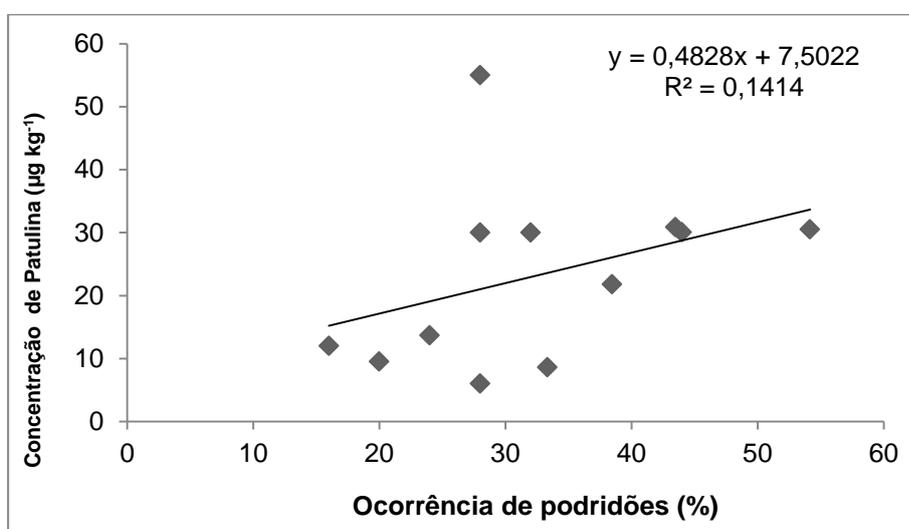


Figura 14 - Correlação entre o índice de podridão (%) e a concentração de patulina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em maçãs 'Fuji kiku'.



Em um estudo realizado por Celli (2006), a mesma constatou que maçãs 'Fuji' apresentaram uma tendência na forma de curva hiperbólica quando correlacionadas a patulina com a podridão do fruto, onde a concentração de patulina inicial apresentou-se baixa, aumentando a medida que aumenta a podridão, atingindo um máximo de $993,7 \mu\text{g}$ de patulina. Essa toxina diminuiu após um peso de $24,2 \text{ g}$ de tecido deteriorado, juntamente com o aparecimento de leveduras, sendo decrescente até o peso de podridão analisado de $86,7 \text{ g}$.

Neste mesmo estudo, o autor afirmou que maçãs 'Gala' apresentaram maior contaminação que maçãs 'Fuji', atingindo $120,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de patulina. Isso sugere uma maior vulnerabilidade de maçãs 'Gala' à infecção fúngica. Assim, houve uma tendência crescente da concentração de patulina quando houve aumento na podridão apresentada pelo fruto. Em um estudo realizado por Ross et al. (1998) também foi encontrado maior incidência de patulina nessa cultivar, com concentrações máximas de $6,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ de patulina produzidas com maçãs inoculadas com *P. variable*.

O interesse em expandir as exportações brasileiras de frutas é crescente e a qualidade no armazenamento tem sido essencial para garantir a qualidade dos alimentos. Frutas, em especial as maçãs, são consideradas alimentos com rápida e fácil deterioração, principalmente devido à quantidade de água livre. Esse fato explica o aparecimento de fungos que refletem na sua deterioração e conseqüentemente a presença de patulina. Portanto, para evitar a presença desta micotoxina é necessário investir em práticas de controle para doenças fúngicas, neste caso, a podridão pós-colheita.

Li e Xiao (2008) afirmaram que o armazenamento em atmosfera controlada é uma das principais estratégias para reduzir a contaminação por patulina e aumentar a vida útil de maçãs. Os dados encontrados neste trabalho estão de acordo com o exposto acima, onde os valores mantiveram-se inferiores ao limite estabelecido pela legislação, exceto os frutos com presença de 1-MCP. Este é um ponto importante que merece futuras investigações. Alguns compostos podem estar envolvidos com aumento no estresse dos fungos. A situação de estresse demonstrou induzir uma produção de metabólitos secundários e, portanto, sugere-se que o 1-MCP pode ter causado este efeito.

Através do consumo de maçãs e de seus produtos industrializados, como o suco, existe a possibilidade de um grande número de pessoas, principalmente crianças, estarem expostas à patulina. Portanto, este assunto torna-se um problema de saúde pública. A sua presença em alimentos também é um problema que preocupa as indústrias alimentícias, pois pode repercutir em perdas econômicas, principalmente para aquelas que exportam seus produtos a países que controlam os níveis desta micotoxina nos alimentos consumidos por sua população.

Considerando que estes são os primeiros resultados obtidos a partir da parceria entre o Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita e o CEPARC para relacionar o emprego de diferentes técnicas de armazenamento em ACD e uso de 1-MCP na

determinação de podridão e contaminação de patulina, pode-se dizer que estes resultados são preliminares e que há necessidade de novos estudos para viabilizar o uso destas técnicas na prevenção da formação de micotoxinas, principalmente com relação ao emprego do 1-MCP. Devido à alta perecibilidade desta fruta, o controle do amadurecimento é fundamental para o aumento da vida útil após a colheita, visando ao mercado interno e a exportação.

4.3 DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM MAÇÃS E SUCOS DE MAÇÃ COLETADOS EM SUPERMERCADOS DE SANTA MARIA-RS

Ao analisar 36 amostras de maçãs coletadas na cidade de Santa Maria – RS, os resultados evidenciaram a alta contaminação desta micotoxina, onde todas as amostras que apresentaram contaminação encontraram-se muito acima do LMT estabelecido pela legislação (Tabela 8). A legislação brasileira prevê o LMT de patulina em suco e polpa de maçã como $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Concentrações desta toxina de $<\text{LOQ}$ a $757,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram encontradas nas amostras. No mês de abril de 2016, apenas uma amostra de maçã estava contaminada com patulina ($757,4 \mu\text{g kg}^{-1}$). No mês de maio, todas as amostras coletadas estavam contaminadas com a toxina, com concentração variando entre $214,42$ a $490,2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Já no mês de janeiro de 2017, todas as amostras de maçãs apresentaram contaminação, porém com concentrações abaixo do LOQ do método ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$) e no mês de fevereiro todas as amostras também apresentaram concentrações abaixo do LOQ do método, exceto uma amostra que apresentou $60 \mu\text{g kg}^{-1}$. Este fato pode estar relacionado que as maçãs disponíveis nas prateleiras nos meses de janeiro e fevereiro, seriam maçãs da nova safra. Contudo, aproximadamente 31% ($n=11$) das amostras, apresentaram contaminação superior ao LMT estabelecido pela RDC 07/2011. Resultados encontrados por Beretta et al. (2000) também evidenciaram patulina em 80,7% dos 26 frutos analisados, sendo estes orgânicos e não orgânicos.

Tabela 8 – Concentrações de patulina em amostras de maçã sem podridão aparente coletadas em supermercados na cidade de Santa Maria - RS, nos anos de 2016 e 2017.

Amostra	abril/16	maio/16	janeiro/17	fevereiro/17
Patulina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
1	<LOQ	320,1	<LOQ	<LOQ
2	757,4	426,1	<LOQ	<LOQ
3	<LOQ	399,5	<LOQ	<LOQ
4	<LOQ	423,9	<LOQ	<LOQ
5	<LOQ	490,2	<LOQ	60,1
6	<LOQ	339,2	<LOQ	<LOQ
7	<LOQ	301,4	<LOQ	<LOQ
8	<LOQ	276,7	<LOQ	<LOQ
9	<LOQ	214,4	<LOQ	<LOQ

LOQ: limite de quantificação ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Pesquisas apontam que maçãs orgânicas apresentam maiores níveis de patulina que maçãs convencionais, sendo que essa maior contaminação se deve ao não tratamento com fungicidas, o que provavelmente resultou em maior incidência de fungos toxigênicos e, conseqüentemente, de patulina nesses frutos (PIEMONTESE et al., 2005).

Na Itália, Beretta et al. (2000) avaliaram os níveis de patulina em maçãs e produtos derivados e observaram que em sucos de maçã e produtos *baby foods* a concentração da micotoxina foi quase sempre abaixo dos limites estabelecidos, enquanto em algumas amostras de suco com polpa as concentrações excederam os níveis aceitáveis.

Considerando que quando a matéria prima disponível para produção de sucos é a desqualificada para consumo *in natura*, incluindo frutos que apresentam partes deterioradas, que em sua maioria estão infectados por fungos potencialmente toxigênicos, existe a possibilidade de detectar patulina em sucos comerciais. Esta micotoxina teratogênica e termoestável permanece nos produtos processados estabilizados microbiologicamente com tratamento térmico (SYLOS E RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Tendo em vista que a presença de patulina em sucos de maçã reflete a utilização de matéria prima desqualificada procedeu-se uma investigação em produtos comercializados na cidade de Santa Maria - RS.

A julgar por 36 amostras analisadas de suco de maçã, a qualidade dos mesmos mostrou-se insatisfatória, pois foram encontrados concentrações dessa toxina muito acima do LMT (Tabela 9), embora a amostragem tenha sido casualizada e pequena, apenas em um município, os resultados obtidos sugerem que a patulina é um problema em sucos de maçã comercializados nesta cidade, mostrando que a matéria-prima usada para o processamento não é, aparentemente, de boa qualidade.

Tabela 9 – Concentrações de patulina em amostras de suco de maçã coletadas em supermercados na cidade de Santa Maria - RS, nos anos de 2016 e 2017.

Amostra	abril/16	maio/16	janeiro/17	fevereiro/17
Patulina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
1	124,3	343,6	129,8	1161,1
2	222,4	485,1	88,7	411,6
3	67,9	161,6	<LOQ	493,6
4	144,6	149,3	<LOQ	526,6
5	328,5	223,3	<LOQ	<LOQ
6	486,1	563,3	<LOQ	312,4
7	124,7	69,5	29,8	288,7
8	138,9	110,5	337,9	1297,9
9	204,7	457,5	249,0	<LOQ

LOQ: limite de quantificação ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$)

No mês de abril de 2016, concentrações variando de 67,9 a 486,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram encontradas. Já no mês de maio, as amostras apresentaram contaminação na faixa entre 69,5 a 563,3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Concentrações entre <LOQ e 337,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram encontradas nas amostras de sucos no mês de janeiro de 2017 e em fevereiro, concentrações variando entre <LOQ a 1297,9 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Considerando os resultados encontrados neste estudo, 81% (n=29) das amostras de suco de maçã não estavam em conformidade com a legislação brasileira e 19% (n=7) estavam abaixo do LMT. Uma vez que a presença de patulina está relacionada com a qualidade dos frutos, esse problema pode ser mais pronunciado em anos que a safra é baixa ou pela má qualidade dos frutos decorrentes do clima. Para não diminuir a produção e evitar a falta de produtos no mercado, as indústrias utilizam frutos com grau de deterioração muito pronunciada, passível de estarem contaminados com esta micotoxina.

Por outro lado, Sylos e Rodrigues (1999) avaliaram a presença de patulina em 30 amostras de sucos de maçã comercializadas em 1998 e não encontraram concentrações detectáveis em 29 amostras analisadas. Apenas uma continha patulina, mas não excedia os limites estabelecidos pela OMS e FDA ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). Resultados semelhantes foram obtidos por Celli (2006) onde analisou 38 amostras de sucos e não foi encontrado níveis detectáveis de patulina em nenhuma amostra.

A determinação de patulina em produtos processados foi relatada também em outros países. Uma pesquisa realizada com 42 amostras comerciais de suco de maçã e 23 de suco concentrado de maçã no Irã em 2002, patulina foi detectada em 33 e 56%, respectivamente, com níveis superiores a $50 \mu\text{g L}^{-1}$, cujo valor máximo foi de $285,3 \mu\text{g L}^{-1}$ (CHIERAGHALI et al., 2005). Anon (1999) detectou patulina com níveis superiores a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em 2,5% de amostras de sucos em Londres. Na Turquia, Gokmen e Acar (1998) encontraram 215 amostras de suco de maçã concentrado contaminados com patulina em valores variado de 7 a $376 \mu\text{g L}^{-1}$ de 100 amostras de suco de maçã analisadas na Espanha, 82 estavam contaminadas com a toxina, sendo que sete apresentaram níveis acima de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Embora se tratem de relatos antigos que refletem safras mais antigas, pode ser observada que os riscos e perigos da ingestão da patulina pelo consumo de suco de maçã estão presentes até mesmos em países que se caracterizam por contemplar bons programas de controle de qualidade na área de alimentos.

Em contraponto a pesquisa realizada por Boonzaaijer et al. (2005) onde foi avaliada a presença de patulina em 63 produtos comerciais derivados de maçã comercializados na Holanda e não encontraram níveis quantificáveis da toxina na maioria das amostras, porém a amostra de suco orgânico de maçã apresentou a toxina.

Em relação aos valores de pH encontrados no suco, do conjunto de resultados obtidos, verificou-se que existe uma tendência para variações de pH, na ordem de 3 a 4,3, entre as amostras de suco analisadas (Tabela 10). As diferenças obtidas podem estar relacionadas ao processamento do suco e da maturação dos frutos utilizados na produção do mesmo.

Em geral, baixos valores de pH associado a altos teores de açúcar favorecem o armazenamento do suco em temperatura ambiente, pois diminuem o desenvolvimento de micro-organismos. Entretanto, os fungos capazes de tolerar baixos valores de pH, são os principais micro-organismos deteriorantes de frutas e de seus produtos

derivados, como o suco (STINSON et al., 1981). Autores afirmam que a patulina apresenta estabilidade na faixa de pH entre 3,5 e 5,5, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, onde a patulina foi encontrada em 83% das amostras de sucos analisadas.

Quando as maçãs sãs e podres são processadas juntas, esta micotoxina pode ser transferida para o suco ou concentrado, através de solubilização em água. Devido à essência ácida do meio, a patulina não pode ser degradada pelo processamento térmico (SYDENHAM et al., 1997).

Pelo fato de maçãs e seus subprodutos serem base da alimentação infantil, o monitoramento da patulina é de extrema importância para a saúde pública, visando à obtenção de produtos de qualidade, visto que os processamentos convencionais não são capazes de degradar esta classe de contaminantes.

Tabela 10 - Valores de pH dos sucos de maçã.

Amostra	Valores de pH			
	abr/16	mai/16	jan/17	fev/17
1	4,0	3,4	3,9	4,0
2	3,8	3,8	3,9	4,0
3	4,2	3,0	4,3	4,3
4	3,5	3,0	4,1	4,0
5	3,2	3,7	4,1	4,0
6	3,7	3,9	3,9	4,0
7	4,0	4,0	4,3	4,1
8	3,1	3,0	4,1	4,1
9	4,0	3,6	3,2	4,1

5 CONCLUSÕES

Condições estudadas de AC e ACD não foram eficientes para impedir a produção de patulina, tanto nas maçãs 'Galaxy' quanto nas 'Fuji Kiku' com podridão, nas condições estudadas somadas a exposição de 7 dias a 20 °C. Os frutos sadios não foram contaminados com patulina presente nos frutos com podridão armazenados na mesma câmara. Para maçãs 'Galaxy', a aplicação do 1-MCP aumentou a porcentagem de frutos com podridão e a concentração de patulina. Portanto, a aplicação de 1-MCP em maçãs desta cultivar não é vantajosa. O efeito do 1-MCP, com relação à incidência de doenças na pós-colheita, até o momento mostrou-se inconsistente, com resultados específicos para cada espécie e diferentes condições experimentais, sugerindo novos estudos para melhor entendimento.

Nas maçãs 'Fuji Kiku' não houve diferença significativa entre AC e ACD-FC e ACD-QR 1,3 na concentração de patulina, embora todos os frutos desta cultivar tenham apresentado contaminação de patulina mesmo que com valores inferiores ao LMT de 50 µg kg⁻¹, nas diferentes condições estudadas. As técnicas de ACD (fluorescência de clorofila e quociente respiratório) testadas no presente trabalho, de uma maneira geral, apresentaram resultados similares e superiores a AC sobre a preservação de atributos de qualidade dos frutos (podridão, frutos sadios e patulina), sugerindo que estas técnicas necessitam ser melhor investigadas em relação a estes parâmetros.

O monitoramento de amostras de maçã e suco de maçã coletadas nos supermercados evidenciou a presença da micotoxina patulina em ambas as matrizes, com concentrações muito acima do limite estabelecido pela legislação brasileira com variações entre os meses de coleta.

Uma avaliação completa da ocorrência de patulina em determinado produto somente pode ser estabelecida após a realização de levantamentos em diferentes anos/safras de produção. Por isto, os dados obtidos neste estudo servem como indicativo. No entanto, há necessidade de que haja a continuidade do monitoramento, assim como se faz necessário que os experimentos em AC sejam realizados em distintos anos agrícolas devido às diversidades climáticas entre os anos.

REFERÊNCIAS

- ALBANO, F.M.; RODRIGUEZ, M.T.R. Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais – Guia Prático. 1ª ed. Porto Alegre: **Rede Metrológica do Rio Grande do Sul**, 2009.
- ANON. Survey of apple juice for patulin. **MAFF Food Surv. Inf. Sheet**, n.173, London: HMSO, 1999.
- ANVISA. RDC nº 7, 18/02/11. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 2011.
- ARAFAT, W.; MUSA, M.N. Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**. v.87, n.2, p.177-186, 1995.
- ARGENTA, L.C.; BRACKAMNN, A.; MONDARDO. M. Qualidade pós-colheita de maçãs armazenadas sob diferentes temperaturas e concentrações de CO₂ e O₂. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 6, p. 121-126, 2000.
- ARGENTA, L. C.; DENARDI, F. Perdas físico-químicas mensais de maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’ durante a armazenagem em atmosfera controlada e frio convencional. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.16, n.3, p.111-118, 1994.
- ASTOVIZ, M.B.; SUAREZ, M.M.S. Micotoxinas y cáncer. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**. v. 24, n.1, jan./mar, 2005.
- AZZOLINI, M. Ripening of “Pedro Sato” guava: study on its climacteric or non-climacteric nature. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 17, n. 3, p. 299-306, 2005.
- BAERT, K.; DE MEULANAER, B.; KAMALA, A.; KASASE, C.; DEVLIEGHIERE, F. Occurrence of patulin in organic, conventional and handcrafted apple juices marketed in Belgium. **Journal of Food Protection**. v.69, p.1371–1378, 2006.
- BAERT K.; DEVLIEGHIERE F.; FLYPS, H.; OOSTERLINCK, M.; AHMED, M.M.; RAJKOVIĆ A.; VERLINDEN, B.; NICOLAĀ, B.; DEBEVERE, J.; DE MEULENAER, B. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 1, n.3, p.170-81, 2007.
- BAERT, K.; DEVLIEGHIERE, F.; BO, L.; DEBEVERE, J.; DE MEULENAER, B. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. **Food Microbiology**. v.25, p.212–217, 2008.
- BARALDI, E.M.; Mari, E.; Chierici, M.; Pondrelli, P.; Bertolini, G.; Pratella, C. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. **Plant Pathology**. v. 52, p. 362-370, 2003.

- BANDO, E.; GONÇALES, L.N.; TAMURA, N.K.; JUNIOR, M.M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Revista Brasileira de Patologia Médica**. v.43, n. 3, p. 175-180, 2007.
- BARRETT, D.M., L. SOMOGYI, AND H. RAMASWAMY. **Processing Fruits, Second Edition: Science and Technology**. CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.
- BETINELLI, K.S. Manejo Pós-colheita de Maçãs 'Venice'. **Dissertação de mestrado**. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2016.
- BENEFÍCIOS DA MAÇÃ. Jornal cidade. Disponível em: <http://www.diabetenet.com.br/conteudocompleto.asp?idconteudo=41250>. Acesso em: 12 abr. 2016.
- 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.
- 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.
- BLANKENSHIP, S.M.; DOLE, J.M. 1-Methylcyclopene: a review. **Postharvest Biology and Technology**. v.28, p.1-25, 2003.
- BONDY, G.S.; PETSTKA, J.J. Immunomodulation by fungal toxins. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**. v.3, n.2, p.109-143, 2000.
- BOTH, V.; BRACKMANN, A.; WEBER, A.; Anese, R.O.; THEWES, F.R. Estresse inicial por baixo oxigênio seguido do armazenamento em atmosfera controlada de maçãs 'Royal Gala'. **Revista Ciência Agrônômica**. v. 45, p. 1-10, 2014.
- BOTH, V. Estresse inicial e condicionamento ao baixo oxigênio no armazenamento em atmosfera controlada de maçãs 'Royal Gala'. **Dissertação de mestrado**. UFSM, Santa Maria-RS, 2012.
- BOONZAAIJER, G.; BODELDIJK, I.; VAN OSENBRUGGEN, W. A. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. **Food Control**. v. 16, n. 7, p. 587-591, 2005.
- BOWER, J. H.; BIASI, W. V. AND MITCHAM, E. J. Effect of ethylene and 1-MCP on the quality and storage life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**. v.28, p. 417-423, 2003.
- BRACKMANN, A. Produção de etileno, CO₂ e aroma de cultivares de maçã. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.14, n.1, p.103-108, 1992.
- BRACKMANN, A.; SESTARI, I.; STEFFENS, C.A.; GIEHL, R.F.H. Qualidade da maçã cv. Gala tratada com 1-metilciclopropeno. **Ciência Rural**. v. 34, n.5, p. 1415-1420, 2004.

- BRACKMANN, A.; WEBER, E.P.; PAVANELLO, V.; AMBOS, I.; SESTARI. Armazenamento em atmosfera Controlada de Maçãs mutantes de Gala. **Revista Brasileira de Armazenamento**. v. 34, p. 136-143, 2009.
- BRACKMANN, A.; BENEDETTI, M.; STEFFENS, C. A.; MELLO, A. M. de. Efeito da temperatura e condições de atmosfera controlada na armazenagem de maçãs 'Fuji' com incidência de pingo de mel. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 8, n. 1, p. 37-42, 2002.
- BRACKMANN, A.; WEBER, J. A.V.; PINTO, D. A.; NEUWALD, C. A.; STEFFENS. Manutenção da Qualidade pós-Colheita de Maçãs 'Royal Gala' e solução 'Galaxy' armazenamento Controlada em atmosfera. **Ciência Rural**. v. 38, p. 2478-2484, 2008.
- BRACKMANN, A.; WEBER, A.; BOTH, V. CO₂ Partial Pressure for Respiratory Quotient and Harvest Watch Dynamic Controlled Atmosphere for 'Galaxy' Apples Storage. **Acta Horticulturae**. v. 1079, p. 435-440, 2015.
- BRON, I.U.; JACOMINO, A.P.; PINHEIRO, A.L. Influence of ripening stage on physical and chemical attributes of 'Golden' papaya fruit treated with 1-methylcyclopropene. **Bragantia**. v. 65, p. 553-558, 2006.
- CALDAS, G.M.M.; OLIVEIRA, R.C.; TESSMANN, D.J.; JUNIOR, M.M. Ocorrência de patulina em uva fina (*Vitis vinifera* L. cv. "Rubi") com sinais de podridão ácida. **Ciência Rural**. v.38, n.1, p14-18, 2008.
- CARRILLO, L. Micotoxinas. **Microbiología Agrícola**. Salta - Argentina: Universidade Nacional de Salta, p. 1–7, 2003.
- CAST. **Council for Agricultural Science and Technology** - Task force report. Mycotoxins : Risks in Plant , Animal, and Human Systems Council for Agricultural Science and Technology, p. 217, 2003.
- CELLI, M.G. Patulina em maçãs e em produtos derivados. Aspectos sanitários e controle empregando *Saccharomyces cerevisiae*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2006.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM I. C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**. v. 31, p. 623-636, 2008.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Qualidade pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. **Lavras: ESAL/FAEPE**. p. 783, 2005.
- CHERAGHALI, A. M.; MOHAMMADI, H. R.; AMIRAHMADI, M.; YAZDANPANA, 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. 7, p.165-167, 2005.

- CÓRDOVA, K.R.V. Desidratação osmótica e secagem convectiva de maçã Fuji comercial e industrial. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba – PR, 2006.
- COUSIN, M.A.; ZEIDLER, C.S.; NELSON, E.E. Chemical detection of mold in processed foods. **Journal of Food Science**. v. 49 , p. 439-445, 1984.
- CURRENT, A.R. Efeito do 1-metilciclopropeno em maçãs ‘Fuji’ armazenadas em atmosfera refrigerada e atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.11, n.1, p.91-94, 2005.
- DeELL, J.R.; MURR, D.P.; PORTEOUS, M.D.; RUPASINGHE, H.P.V. Influence of temperature and duration of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on apple quality. **Postharvest Biology and Technology**. v.24, n.3, p.349-353, 2002.
- DELONG, J.M.; PRANGE, R.K.; HARRISON, P.A. Chlorophyll fluorescence-based low O₂ ca storage of organic ‘cortland’ and ‘delicious’ apples. **Acta Horticulturae**. n.737, p. 31-37, 2007.
- DIAS, J. V. Determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate para fins de acreditação. **Dissertação de Mestrado**. UFSM, Santa Maria, 2014.
- DOORES S. The microbiology of apples and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 19, p.133–149, 1983.
- DRUSCH S.; RAGAB W. Mycotoxins in fruits, fruit juices and dried fruits. **Journal Food Protection**. v.66, p.290-299, 2003.
- EMBRAPA. Maçã: O produtor pergunta, a Embrapa responde. Embrapa Uva e Vinho, Brasília, DF, 2013.
- EMBRAPA. Análise de Contaminante em Suco de Maçã: Quantificação de Patulina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV-DAD). **Comunicado Técnico**. n. 202, Rio de Janeiro, 2014.
- EUROPEAN COMMUNITY. **European community coments for the codex committee on food additves and contaminants**. Arusha, Tanzania, Mar. 2003.
- EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 1st ed. 1998.
- FALLIK, E.; ALKALI-TUVIA, S.; HOREV, B.; COPEL, A.; RODOV, V.; AHARONI, Y.; ULRICH, D.; SCHULZ H. Characterization of "Galia" melon aroma by GC and mass spectrometric sensor measurements after prolonged storage. **Postharvest biology and technology**. v. 22, n. 1, p. 351-357, 2001.
- FAN, X.; BLANKENSHIP, S.M.; MATTHEIS, J.P. 1- Methylcyclopropene inhibits apple ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.124, n.6, p.690-695. 1999.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acessado em: 10 abril de 2016.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Comprehensive analytical chemistry: Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues. **Elsevier**. p. 279-282, 2005.

GASSER, F.; EPPLER, T.; NAUNHEIM, W.; GABIOUD, S.; HOEHN, E. Control of the oxygen level during dynamic CA storage of apples by monitoring respiration as well as chlorophyll fluorescence. **Acta Horticultrae**. v.796, p.69-76, 2008.

GASSER, F.; EPPLER, T.; NAUNHEIM, W.; GABIOUD, S.; NISING, A.B. Dynamic CA storage of apples: monitoring of the critical oxygen concentration and adjustment of optimum conditions during oxygen reduction. **Acta Horticulturae**. v. 796, n.69-76, 2010.

GILBERT J.; POHLAND A.E. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Ames (IA): **Council for Agricultural Science Technology**. 2003.

GIRARDI, C. L.; BENDER, R. J. Produção integrada de maçãs no Brasil – colheita e pós-colheita, **Embrapa uva e vinho**. 2003.

GIRARDI, C. L.; MARTINS, C. R.; PARUSSOLO, A.; TOMASI, R. J.; CORRENT, A.; ROMBALDI, C. V. Efeito da aplicação de 1-metilciclopropeno na conservação da qualidade de pêssegos (*Prunus persica* L.), cultivar Chiripá. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 9, n. 2, p.157-161, 2003.

GIRARDI, C.L; NACHTIGALL, G.R; PARUSSOLO, A. Fatores pré-colheita que interferem na qualidade da fruta. In: GIRARDI, C.L, et al. Maçã: Pós-colheita. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, v. 32, p.10, 2004.

GIUNTINI, E.B.; LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Potencial de fibra alimentar em países ibero-americanos: alimentos, produtos e resíduos. **ALAN**. v. 53. n.1., p.14-20, 2003.

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.

GÖNÇALEZ, E.; PINTO, M.M.; FELICIO J.D. Análise de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1-2, p. 15-19, jan./dez., 2001.

GONZÁLEZ, R.R.; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G. **Liquid chromatography for the determination of mycotoxins in food**. 1a. ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., p. 74, 2010.

GROOTWASSINK, J.W.D.; GAUCHER, G.M. Biosynthesis of secondary metabolism enzymes in homogeneous cultures of *Penicillium urticae*. **Journal of Bacteriology**. v. 141, p. 443-455, 1980.

- HASAN, H.A. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.16, n.7, p.607-612, 2000.
- HERMANN, G.; PINTO, F. T.; KITAZAMA, S. E.; NOLL, I. B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 1, p. 7-10, 2006.
- HIEMSTRA, M.; DE KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1154, p. 3-25, 2007.
- HUNSCHE, M.; BRACKMANN, A.; ERNANI, P.R. Efeito da adubação potássica na qualidade pós-colheita de maçãs 'Fuji'. **Revista Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 38, n. 4, p. 489-496, 2003.
- HUSSEIN, S.H.; BRASELL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**. v.167, n.2, p.101-134, 2001.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. p. 553, 1985.
- IMAIDA, K. Quantitative analysis of initiating and promoting activities of five mycotoxins in liver carcinogenesis in rats. **Cancer Letters**. v.16, p.137-143, 1982.
- INMETRO. Orientação sobre a validação de métodos analíticos, **DOQ-CGCRE-008**. Revisão 4, 2011.
- JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A.; BRACKMANN, A.; CASTRO, P.R.C. Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropeno. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, n.2, p.303-308, 2002.
- 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.
- JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**. v. 11, p. 40-41, 2002.
- JESTOI, M. Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beavericin, enniatins and moniliformin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.48 n.1, p.21-29, 2008.
- JIANG, Y.; JOYCE, D.C.; TERRY, L. A. 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. **Postharvest Biology and Technology**. v. 23, n.3, p.227-232, 2001.

KADER, A.A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. Second edition, Univ. Calif., Div. of Agr. and Nat. Resources, Publ. 3311, p. 296, 1992.

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, 2002.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V.; MASSAGUER, P.R. The development of an analytical method for two mycotoxins, patulin and verruculogen, and survey of their presence in commercial tomato pulp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p.269-273, 2002.

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.

KOE, W. J.; SAMSON, R. A.; VAN EGMOND, H. P.; GILBERT, J.; SABINO, M. **Mycotoxins and phicotoxins in perspective at the turn of the millennium**. Wageningen, The Netherlands: W. J. De Koe, p. 309-320, 2001.

KRALJ CIGIĆ, I.; PROSEN, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p. 62–115, 2009.

KU, V.V.V., WILLS, R.B.H., BEN-YEHOSHUA, S. 1-methylcyclopropene can differentially affect the postharvest life of strawberries exposed to ethylene. **HortScience**. v. 34, p. 119-120, 1999.

LAI, C.L. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.8, n.2, p.85-96, 2000.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica**. v.1, n.2, p. 35-61, 2009.

LARGADA, M.J.; GARCÍA, G.L.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.41, n.5, p. 1486-1496, 2006.

LARSEN, T.O. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. **Food Additives and Contaminants**. v.15, n.6, p.671–675, 1998.

LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G.S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**. v.12, n.2, p.73- 76, 2001.

LIMA, L.C. Armazenamento de maçãs cv. 'Royal Gala' sob refrigeração e atmosfera controlada. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1999.

Li, H.X.; Xiao, C.L. Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State. **Postharvest Biology and Technology**. v.47, p.239–245, 2008.

LOPES, P.R.S.; NETO, J.R.; MALLMANN, C.A.; LAZZARI, R.; PEDRON, F.A.; VEIVERBERG, C.A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.40, n.10, 2005.

LOVETT, J.; PEELER, J.T.A Research Note: Effect of pH on the Thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. **Journal of Food Science**. v.38, p.1094-1095, 1973.

LUO, Z.S.; XIAOLING, X.; ZHENZHEN, C.; BIFANG, Y. I. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on lignification of postharvest bamboo shoot. **Food Chemistry**. v.105, n.2, p.521-527, 2007.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: Detection and control**. 1a ed. Cambridge - England: Woodhead Publishing Limited, p.488, 2004.

MAHFOUD, R. 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.209-218, 2002.

MARÍN, S.; MORALES, H.; HASAN, H. A. H.; 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, 2006.

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.

MATHOOKO, F.M. Regulation of respiratory metabolism in fruits and vegetables by carbon dioxide. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 247–264, 1996.

MEHERIUK, M. CA storage conditions for apples, pears and nashi. In: CA'93, International Controlled Atmosphere Research Conference, 6., 1993, New York. **Proceedings...** Davis: University of California, v.2, p.832, 1993.

MELLO, L.M.R. Produção e mercado brasileiro de maçã. **Comunicado Técnico Nº. 50**, Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves. p. 1-4, 2004.

MORALES, H.; MARÍN, S.; OBEA, L.; PATINO, B.; DOMENECH, M.; RAMOS, A. J. Ecophysiological characterization of *Penicillium expansum* population in Lleida (Spain). **International Journal of Food Microbiology**. 122, 243–252, 2008.

MORALES, H.; MARÍN, S.; CENTELLES, X.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical point for patulin accumulation. **International Journal of Food Microbiology**. v.116, p.260–265, 2007a.

MORALES, H.; MARÍN, S.; ROVIRA, A.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. **Letters in Applied Microbiology**. v.44, p.30–35, 2007b.

MORALES, H.; SANCHIS, V.; ROVIRA, A.; RAMOS, A. J.; MARIN, S. Patulin accumulation in apples during post-harvest: Effect of controlled atmosphere and fungicide treatments. **Food Control**. v.11, p.1443–1448, 2007c.

MORALES, H.; BARROS, G.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Effects of apple and pear varieties and pH on patulin accumulation by *Penicillium expansum*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.88, p.2738–2743, 2008.

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. 4, p. 8-21. 2005.

MORTIMER, D.N. A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin. **Food Additives and Contaminants**, v.2, p.165-170, 1985.

MOSS, M.O. Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. **Applied Microbiology**. v. 104, n. 5, p. 1239-1243, 2008.

MOURA, S.C.S.R.; BERBARI, S.A.; GERMER, S.P.M.; ALMEIDA, M.E.M.; FEFIM, D.A. Determinação da vida-de-prateleira de maçã-passa por testes acelerados. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v.27, n.1, p.141-148, 2007.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5 .ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006.

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

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.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Prevalência de ocratoxina em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**. v.12, n.2, 2006.

NOGUEIRA, A.; TEIXEIRA, S. H.; DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G. Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 2, p. 259-264, 2007.

NORTHOLT, M.D.; BULLERMAN, L.B. Prevention of mold growth and toxic production through control of environmental conditions. **Journal of Food Protection**. v. 45, p.519-526, 1982.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (EC). **Commission Regulation 1425/2003 amending Commission Regulation 466/2001 setting maximum levels of certain contaminants in foodstuffs**. v. 203, p.1-3, 2001.

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.

- PASTER, N.; HUPPERT, D.; BARKAY-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, p. 51–58, 1995.
- PÁDUA, R.A.F.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Aspectos toxicológicos e ocorrência de patulina em suco de maçã. **Semina Ciências Agrárias**. v. 26, n. 4, p. 535-542, 2005.
- 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, p. 437-442, 2005.
- PIÑEIRO, M. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. 1a. ed. Roma: **FAO**, p. 136, 2003.
- PITTET, A. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. **Mitt Lebensm. Hyg**, v. 96, p. 424–444, 2005.
- PIZZUTTI, I. R. Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de métodos de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS. **Tese de Doutorado**. UFSM, Santa Maria, 2006.
- PRANGE, R.K.; DELONG, J.M.; DANIELS-LAKE, B..J.; HARRISON, P.A. Innovation in controlled atmosphere technology. **Stewart Postharvest Review**. v.1, n.1-11, 2005.
- PRANGE, R. K.; DELONG, J. M.; HARRISON, P.; MCLEAN, S.; SCRUTTON, J.; CULLEN, J. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. **U.S. Patent**, n.WO/2002/006795, 2007.
- PRADO, E.C. Empresas produtoras de sucos de frutas investem em produção de matéria- prima para crescer. **Exportar & Gerência**. n. 15, p. 18-21, 2000.
- PRUSKY, D.; LICHTER, A. Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 121, p.281-289. 2008.
- RAI, M. e VARMA, A. Mycotoxins in food, feed and bioweapons. 1a. ed. Heidelberg, Germany: Springer, 2010.
- RAFFO, A.M.; KELDERER, F.; ZANELLA, G.; PAOLETTI. Impact of innovative controlled atmosphere storage technologies and postharvest treatments on volatile compounds production in Cv. Pinova Apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 915–923, 2009.
- RAZZAZI, E. F.; KLEINEISEN, S.; LUF, W. Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry

with atmospheric pressure chemical ionisation. **Journal of Chromatography A**. v. 896, p. 321-334, 2000.

REICHERT, B. Agrotóxicos em doces de frutas em pasta: determinação de resíduos por μ LC-QTRAP-MS/MS e estudo de estabilidade. **Tese de Doutorado**. UFSM, Santa Maria, 2015.

RICHARD, J.; PAYSE, G.; DESJARDINS, A. E.; MARAGAS, C.; NORRED, W.; PESTKA, J. J.; PHILLIPS, T. D.; VAN EGMOND, H. P.; VARDON, P. J.; WHITAKER, T. B.; WOOD, G. Mycotoxins, risk in plant, animal and human systems. **Council for Agricultural Science and Technology**. v. 139, p. 101-103, 2003.

RIGHI, L. W. Método multirresíduo para determinação de micotoxinas em vinho por UPLC-MS/MS. **Dissertação de Mestrado**, UFSM, Santa Maria, 2013.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Braz. J. Microbiol.** v.33, p.1-11, 2002.

ROSS, G. U.; TANIWAKI, M. H.; SABINO, M.; VIZONI, T.; HIROOKA, E. Y. Produção de patulina em maçã (*Malus domestica* Borkhausen), cultivares gala e Fuji, inoculadas com *Penicillium* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n. 1, p. 82-87, 1998.

ROMBALDI, C.V.; SILVA, J.A.; MACHADO, L.B.; PARUSSOLO, A.; KASTER, L.C.; GIRARDI, C.L.; DANIELI, R. Harvesting stage and cold storage influences on the quality of Chiripá peaches (*Prunus persica* L). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 19-25, 2001.

RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research and Technology**, v.212, p.274-278, 2001.

SAEGER, S. Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed. 1^a ed. Cambridge, UK, p. 415, 2011.

SANTE, **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document No. SANTE/11945/2015.

SCHUMACHER, D.M. 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.110-121, 2005.

SCHUMACHER, D.M. DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. **Toxicology Letters**, v.166, n.3, p.268-275, 2006.

SCUSSEL, V. M. Patulina. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, p. 47-48, 1998.

SFORZA, S.; DALL'ASTA, C.; MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**. v. 25, p. 54–76, 2006.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, p. 760, 1998.

SINGH, S.P.; PAL, R.K. Response of climacteric-type guava (*Psidium guajava* L.) to postharvest treatment with 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology**. v.47 , n.3, p. 307-314, 2008.

SISLER, E. C.; SEREK, M.; DUPILLE, E. Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropene and 3,3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonists in plants. **Plant Growth Regulation**. v.18, p.169-174. 1996.

SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S methyl, baking soda, or ethanol application. **Postharvest Biology and Technology**, v.33, p.141-151, 2004.

SPEIJERS, G.J. Subacute toxicity study of patulin in the rat: Effects on the kidney and the gastro-intestinal tract. **Food Chemistry and Toxicology**, v.25, p.23-30, 1988.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R. Preparación de la muestra: un paso para el análisis por GC-MS. **Scientia Chromatographica**. v. 2, n. 4, p. 25-48, 2010.

STEINMETZ, K.A.; POTTER, J.D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. **Journal of the American Dietetic Association**. p.1027-1039, 1996.

STINSON, E. E.; OSMAN, S. F.; HEISLER, E. G.; SICILIANO, J.; BILLS, D. B. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 29, n. 4, p. 790-792, 1981.

SYDENHAM, E.W.; VISMER, H.F.; MARASAS, W.F.O.; BROWN, N.L.; SCHLECHTER, M.; RHEEDER, J.P. Influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. **Food Additives and Contaminants**. v.14, 429–434, 1997.

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

TERAO D.; OLIVEIRA, S.M.A.; VIANNA, F.M.P.; ALVES, R.E.; ROSSETTI, A.G.; GONDIM, D.M.F. Efeito de 1-Metilciclopropeno (1-MCP) combinado à refrigeração no controle de podridão pós-colheita em frutos de melão. **Proceedings of the InterAmerican Society for Tropical Horticulture**. v.47, p.53-57. 2003.

THE WORLD APPLE REPORT. Apple Industry Key Facts. 2008. Disponível em: <<http://www.ebelrose.com/AppleIndustryKeyFacts08.htm>> Acesso em: 22 abr. 2016.

TANIWAKI, M.H.; DA SILVA, N. Fungos em alimentos: Ocorrência e detecção. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos. p. 63-64. 2001.

TODA FRUTA. História: cultura brasileira de maçã. 2003a. Disponível em: <todafruta.com.br>. Acesso em: 22 abr. 2016.

TODA FRUTA. Produção da Maçã. 2003b. Disponível em: <todafruta.com.br>. Acesso em: 22 abr. 2016.

TODA FRUTA. Cultivares. 2003c. Disponível em: <todafruta.com.br> . Acesso em: 22 abr. 2016.

TU, K.; NICOLAI, B.; DE BAERDEMAEKER, J. Effects of relative humidity on apple quality under simulated shelf temperature storage. **Scientia Horticulturae**. v. 85, n.3, p. 217-229, 2000.

TURNER, N.W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica chimica acta**. v. 632, p. 168–80, 2009.

UNITED KINGDOM. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. **Food Safety Directorate Information**. (Bulletin Number, 34), 1993.

VECCHIA, A.D.; FORTES, R.C. Contaminação fúngica em granola comercial. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.27, n.2, 2007.

VERO, S. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biology and Technology**. v.26, n.1, p.91-98, 2002.

VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G.; GARCÍA, M.A.E.; GONZÁLES, R.R. LC–MS Determination of Sterols in Olive Oil. **Chromatographia**. v. 65, n.11, p. 695-699, 2007.

ZANELLA, A.; CAZZANELLI, P.; PANARESE, A.; ZENI, F. Fruit fluorescence response to low oxygen stress: modern storage technologies compared to 1-MCP treatment of apple. **Acta Horticulturae**. v. 682, p.1535-1542, 2005.

WAPA - The world apple and pear association. Disponível em: <http://www.wapaassociation.org/asp/index.asp>. Acesso em: 09 de dez. de 2016.

WICHMANN, G. The effect of gliotoxin and patulin on human T cell function. **Indoor and Built Environment**. v.12, n.4, p.255-258, 2003.

WATKINS, C.B.; NOCK, J.F.; WHITAKER, B.D. Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. **Postharvest Biology and Technology**. v.19, n.1, p.17-32, 2000.

WATKINS, C.B. Storage disorders of controlled atmosphere-stored Empire apples. **New York Fruit Quarterly**, v. 18, n. 3, p.19-22, 2010.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTONI, H. A.; NOLL, I. B. Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 78-83, 2009.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C. Brazilian apple production — a few years later. **Fruit Processing**. v. 10, n. 12, p. 472-475, 2000.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C.; DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Patulina: incidência e controle em derivados de maçã. **Fruit Processing**. v. 12, n. 1, p. 19-28, Jan., 2002.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; ANESE, R.O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E.P. 'Royal Gala' apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 46, p.1597-1602, 2011.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; THEWES, F.R.; BOTH, V.; ANESE, R.O.; SCHORR, M.R.W. Relative humidity and its interaction with the storage temperature of 'Gala' apples and mutants. **Ciência Rural**. v.42, p.2159-2165, 2012.

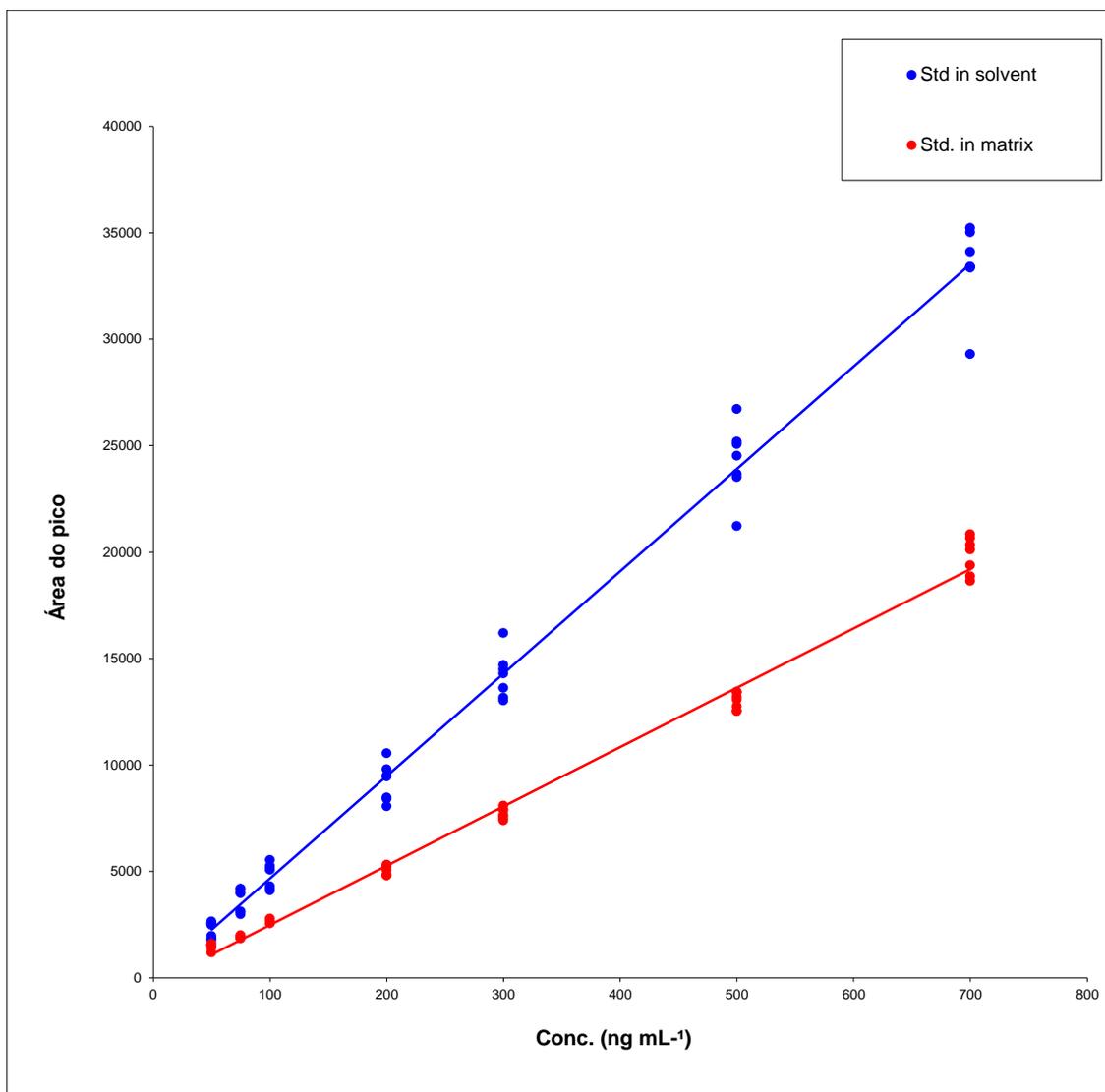
WEBER, A.; BRACKMANN, A.; BOTH, V.; PAVANELLO, E.P.; ANESE, R.O.; THEWES, F.R. Respiratory quotient: innovative method for monitoring 'Royal Gala' apple storage in a dynamic controlled atmosphere. **Scientia Agricola**. v.72, n.28-33, 2015.

WILSON, D. M.; NUOVO, G. J. Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*. **Applied Microbiology**. v. 26, n. 1, p. 124-125, 1973.

ANEXO A - Dados de linearidade para patulina em maçã, a partir de soluções preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz.

Soluções em extrato da matriz			Soluções em solvente orgânico		
Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	r ²	Equação da curva	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	r ²	Equação da curva
50 - 700	0,992	y=27,843 x-294,85	50 - 700	0,989	y=48,075 x - 123,49

ANEXO B - Comparação das curvas analíticas em solvente orgânico e extrato da matriz maçã.



ANEXO C - Efeito matriz para patulina em maçã em cada nível de concentração estudado nas curvas analíticas.

Concentração (ng mL⁻¹)	Efeito Matriz (%)
50	-35
75	-46
100	-45
200	-45
300	-46
500	-47
700	-41
Média	-43

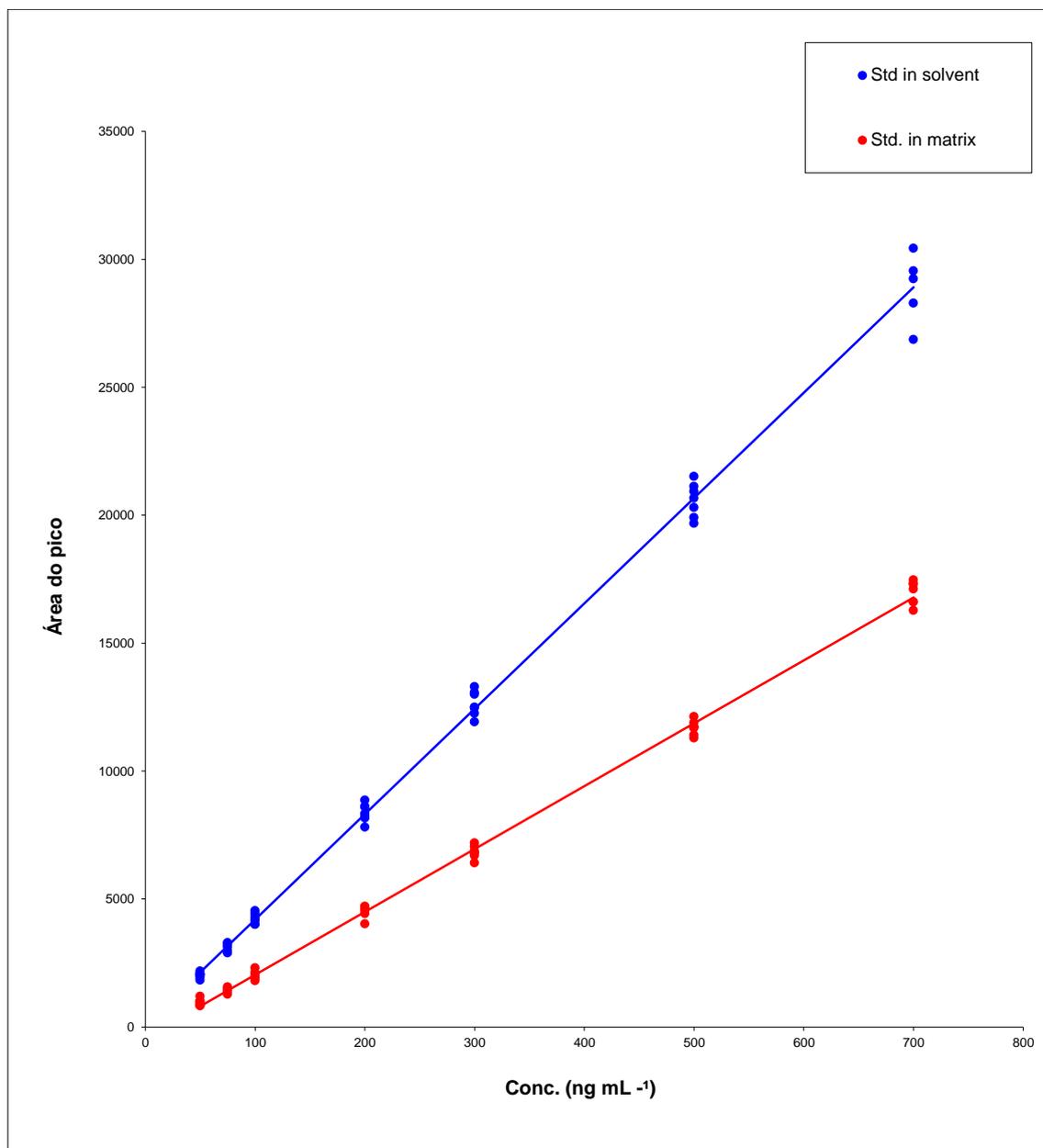
ANEXO D - Taxas de recuperação e desvio padrão relativo (RSD) para patulina em maçã relativo aos três níveis de fortificação.

Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
25		50		100	
Rec. (%)	RSD(%)	Rec. (%)	RSD(%)	Rec. (%)	RSD(%)
75,5	4,9	77,2	7,0	84,1	3,7

ANEXO E - Dados de linearidade para patulina em suco de maçã, a partir de soluções preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz.

Soluções em extrato da matriz			Soluções em solvente orgânico		
Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	r ²	Equação da curva	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	r ²	Equação da curva
50 - 700	0,997	y=24,571 x – 414,21	50 - 700	0,996	y= 41,182 x + 84,248

ANEXO F - Comparação das curvas analíticas em solvente orgânico e extrato da matriz de suco de maçã.



ANEXO G - Efeito matriz para patulina em suco de maçã em cada nível de concentração estudado nas curvas analíticas.

Concentração (ng mL⁻¹)	Efeito Matriz (%)
50	-53
75	-54
100	-52
200	-46
300	-46
500	-43
700	-41
Média	-48

ANEXO H - Taxas de recuperação e desvio padrão relativo (RSD) para patulina em suco de maçã relativo aos três níveis de fortificação.

Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
25		50		100	
Rec. (%)	RSD(%)	Rec. (%)	RSD(%)	Rec. (%)	RSD(%)
102,3	7,0	103,5	6,5	107,5	14,9

APÊNDICE A - Preparo das soluções analíticas de patulina utilizadas para confecção da curva analítica.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Volume da solução intermediária 10 mg L ⁻¹ (µL)	Volume final balão com água:acetonitrila (mL)
50	25	5
75	37,5	5
100	50	5
200	100	5
300	150	5
500	250	5
700	350	5

APENDICE B - Locais de coleta das amostras de maçãs e sucos nos supermercados das diferentes regiões de Santa Maria-RS.

CÓDIGO	REGIÃO	BAIRROS	MERCADOS
1	OESTE	Agro-industrial, Nova Santa Marta, Juscelino Kubistechek, T. Neves, Pinheiro Machado, São João, Renascença, Boi Morto.	A
2	CENTRO OESTE	Passo d'Areia, Noal, Patronato, Duque de Caxias, Uglione.	B
3	NORTE	Caturrita, Chácara das Flores, Salgado Filho, Divina Providência, Carolina.	C
4	NORDESTE	Campestre do Menino Deus, Itararé, Pres. João Goulart, Km3, N ^a Senhora das Dores, Menino Jesus.	D
5	LESTE	Camobi	E
6	CENTRO LESTE	Pé-de-Plátano, São José, Cerrito, Diácomo João Luiz Pozzobon.	F
7	SUL	Tomazetti, Dom Antônio Reis, Lorenzi, Urlândia.	G
8	CENTRO URBANO	Centro, Rosário, Bom Fim, Fátima, N ^a Senhora Medianeira, Nonoai, N ^a Senhora de Lourdes.	H
9	CENTRO URBANO	Centro, Rosário, Bom Fim, Fátima, N ^a Senhora Medianeira, Nonoai, N ^a Senhora de Lourdes.	I

APÊNDICE C - Ensaio de fortificação e recuperação.

Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução mistura (mg L^{-1})	Volume adicionado da solução mistura (μL)	Massa absoluta de patulina adicionado à amostra (μg)	Quantidade de amostra (g)	Volume de solvente de extração (mL)	Concentração de patulina antes da injeção (ng mL^{-1})	Fator do método*
25	10	37,5	0,375	15	15	100	0,25
50	10	75	0,75	15	15	200	0,25
100	10	150	1,50	15	15	400	0,25

*Fator do método = Concentração da fortificação/concentração do analito antes da injeção.