

Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã

Occurrence of heat resistant fungi in apple juice

Autores | Authors

✉ Juliane Elisa WELKE

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciências e Tecnologia de
Alimentos
Av. Bento Gonçalves, 9500
CEP: 91540-000
Porto Alegre/RS – Brasil
e-mail: juliwelke@yahoo.com.br

Michele HOELTZ

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciências e Tecnologia de
Alimentos
e-mail: michelehoeltz@yahoo.com.br

Horacio Alberto DOTTORI

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Física
email: dottori.voy@terra.com.br

Isa Beatriz NOLL

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciências e Tecnologia de
Alimentos
e-mail: isabnoll@adufrgs.ufrgs.br

Resumo

Os ascósporos dos fungos termorresistentes podem sobreviver à pasteurização usualmente aplicada aos derivados de frutas e deteriorar tais produtos pela germinação e conseqüente crescimento sob condições de oxigênio reduzido. Além de causar a deterioração e perdas econômicas, alguns fungos termorresistentes podem produzir patulina, uma micotoxina que tem demonstrado ação carcinogênica, mutagênica e teratogênica em estudos com animais. Os objetivos deste trabalho foram verificar a ocorrência de fungos termorresistentes, determinar a capacidade dos fungos isolados de produzir patulina e verificar os níveis de patulina nos sucos de maçã concentrado. Em 25% das dezesseis amostras, foram isoladas colônias fúngicas pertencentes ao gênero *Byssoschlamys*. Três cepas foram identificadas como *B. fulva* e uma cepa como *B. nivea*, sendo que esta se mostrou produtora de patulina nas condições testadas. A concentração de patulina nos sucos de maçã analisados variou de 15 a 46 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os níveis de patulina encontrados em todas as amostras foram mais baixos que o limite de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ estabelecido pelo *Codex Alimentarius*. A pasteurização empregada durante a produção de suco de maçã não foi eficiente para eliminar os fungos termorresistentes, como as espécies de *Byssoschlamys*. A presença destes fungos pode implicar em deterioração e possível produção de patulina no suco durante seu armazenamento.

Palavras-chave: Fungos termorresistentes; Suco de maçã; Patulina.

Summary

Ascospores of heat resistant fungi can survive after pasteurization usually applied to fruits and fruit products and may spoil such products by germination and subsequent growth under reduced oxygen conditions. Besides causing the deterioration of products derived from fruit and economic losses, some fungi can produce patulin, a mycotoxin reported as carcinogenic, mutagenic and teratogenic to animals. The objectives of this study were to verify the occurrence of heat resistant fungi in apple juice concentrate, to determine their ability to produce patulin and check patulin levels in apple juices. Sixteen samples were analyzed and fungal colonies belonging to the *Byssoschlamys* genera were isolated in 25% of the samples. Three strains were identified as *B. fulva* and a strain as *B. nivea*, which was able to produce patulin under the tested conditions. Patulin levels in apple juice ranged from 15 to 46 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Patulin content in all juice samples was lower than the limit of 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ considered acceptable by the Codex Alimentarius Commission. Pasteurization was not effective to remove heat resistant fungi such as *Byssoschlamys* species. These fungi can lead to deterioration and possible patulin production in juice during storage.

Key words: Heat resistant fungi; Apple juice; Patulin.

Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã

WELKE, J. E. et al.

1 Introdução

Os fungos filamentosos são pouco resistentes ao calor, pois o processamento térmico destrói facilmente suas estruturas de crescimento e reprodução. Entretanto, algumas espécies produzem esporos resistentes, chamados ascósporos. Os esporos destes fungos podem permanecer em estado de dormência no solo, nas frutas e derivados (RAJASHEKHARA et al., 2000; TOURNAS e TRAXLER, 1994). O uso de altas temperaturas ativa os ascósporos dormentes, que germinam e crescem no produto final, ocasionando a sua deterioração durante o período de estocagem, o que conseqüentemente, pode resultar em perdas econômicas (VALIK e PIECKOVA, 2001).

Os alimentos mais susceptíveis à deterioração por fungos termorresistentes são as frutas e seus derivados, como sucos, polpas, concentrados e frutas enlatadas (KOTZEKIDOU, 1997). A principal fonte de contaminação das frutas é o solo, onde esses fungos estão presentes (PIECKOVA et al., 2007; PITT e HOCKING, 1997). As frutas tornam-se mais suscetíveis à invasão fúngica durante a maturação, pois o pH dos tecidos aumenta, a casca torna-se mais macia, carboidratos solúveis são formados e as barreiras de defesa se enfraquecem (STINSON et al., 1981).

Os fungos termorresistentes são capazes de resistir à temperatura de 75 °C por 30 min (SAMSON et al., 2004). A deterioração de produtos à base de frutas pode ser caracterizada pelo crescimento visível do fungo, produção de ácido e odor desagradável, desintegração da fruta e dissolução do amido e pectina no meio (PIECKOVA et al., 2007). Estes produtos deteriorados por fungos apresentam substancial alteração devido à produção de enzimas pectinolíticas, responsáveis pela ruptura da estrutura dos tecidos das frutas (UGWUANYI e OBETA, 1999).

As espécies identificadas como deteriorantes de produtos à base de frutas são: *Byssoschlamys nivea*, *B. fulva*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp. (VALIK e PIECKOVA, 2001; SURESH et al., 1996; TOURNAS, 1994). Micotoxinas como, por exemplo, patulina, ácido bissoclâmico, variotina, fumitremorginas, e verruculogena podem ser produzidas por certas espécies de fungos termorresistentes. Linhagens de *Byssoschlamys* e *Neosartorya* têm se tornado um problema industrial, devido à deterioração e à produção de micotoxinas (RICE et al., 1977; PATTERSON et al., 1981). *B. nivea* é conhecida como uma das espécies capaz de produzir patulina (PITT e HOCKING, 1997). *N. fischeri* é um potencial produtor de micotoxinas como as fumitremorginas (A, B, C) e a verruculogena (NIELSEN, 1991; SURESH et al., 1996; TOURNAS, 1994).

A patulina (4-hydroxy-4H-furo[3,2c]pyran,2[6H]-one) é uma micotoxina que tem demonstrado ação carcinogênica, mutagênica (LIU et al., 2003), teratogênica (CIEGLER et al., 1976) e imunossupressora em estudos com animais (SPEIJERS et al., 1988). Esta micotoxina é produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys* (RICE et al., 1977). A presença da patulina em alimentos também reflete em perdas econômicas, principalmente em indústrias que exportam seus produtos a países que controlam os níveis desta micotoxina (MELLO, 2004).

Maçãs representam um ótimo substrato para o desenvolvimento de fungos termorresistentes e a produção de micotoxinas como a patulina (SILHA e ASKAR, 1999). A contaminação de sucos de maçã com esta toxina geralmente resulta do uso de frutas com qualidade deficiente no processamento (WELKE et al., 2008).

O isolamento e a identificação dos fungos resistentes ao tratamento térmico em derivados de maçã tornam-se importantes para conhecer sua incidência e potencial toxigênico, uma vez que estes produtos representam grande valor comercial e a presença de micotoxinas pode causar impactos negativos na saúde do consumidor e no comércio internacional. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de fungos termorresistentes, determinar a capacidade dos fungos isolados de produzir patulina e verificar os níveis de patulina em sucos de maçã concentrados.

2 Material e métodos

2.1 Amostras

Dezesseis amostras de suco de maçã concentrado foram obtidas de uma indústria processadora de suco do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, durante os anos de 2006 e 2007, sendo que foram produzidas segundo as etapas e condições apresentadas na Figura 1.

2.2 Isolamento e identificação de fungos termorresistentes

A detecção de fungos termorresistentes foi feita segundo a metodologia proposta por Houbraken e Samson (2005) com algumas modificações. O suco concentrado (69 °Brix) foi diluído até 11 °Brix com água peptonada estéril. Duas porções de 50 mL de suco foram aquecidas a 75 °C por 30 min para eliminar microrganismos sensíveis ao calor, sendo, posteriormente, resfriadas em água com gelo. Este procedimento de choque térmico ativa os esporos que estão injuriados para que possam germinar. Igual volume de Agar Batata Dextrosado (BDA) em dupla concentração foi misturado ao suco e distribuiu-se o volume total obtido em placas Petri. As placas foram

Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã

WELKE, J. E. et al.

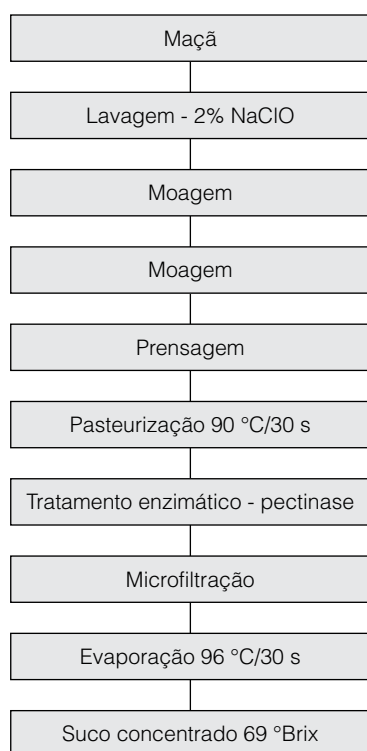


Figura 1. Fluxograma de produção de suco de maçã concentrado.

incubadas por 30 dias a 30 °C. A identificação das cepas isoladas foi feita de acordo com a chave de identificação proposta por Pitt e Hocking (1997), com base nas características microscópicas e macroscópicas das colônias desenvolvidas nos meios de cultura extrato de levedura de *Czapeck* (CYA), ágar extrato de malte (MEA) e ágar Glicerol Nitrato 25% (G25N). Os isolados inoculados nos três meios (CYA, MEA e G25N) foram incubados a 25 °C e aqueles em meio CYA foram incubados a 5, 25 e 37 °C.

2.3 Detecção do potencial toxigênico

O potencial toxigênico das cepas foi detectado através da extração com clorofórmio/metanol (2:1, v/v) das colônias desenvolvidas em ágar extrato de levedura e sacarose (YES). Os extratos, juntamente com o padrão de patulina, foram aplicados em placa de cromatografia em camada delgada (SIL G-25HR, Machery-Nagel, Alemanha) e a visualização foi feita sob luz UV. A detecção da patulina foi realizada pela comparação da fluorescência das amostras em relação ao padrão da micotoxina (LABUDA e TACINOVÁ, 2006).

2.4 Extração da patulina das amostras de suco de maçã

A extração da patulina foi feita de acordo com o método proposto por MacDonald et al. (2000) com algumas modificações. Dez mL de suco foram extraídos 3 vezes com 20 mL de acetato de etila. As fases orgânicas

foram combinadas e extraídas com 10 mL de solução de carbonato de sódio (1,5%, p/v) para remover compostos fenólicos. As amostras extraídas foram secas com sulfato de sódio e transferidas para uma coluna contendo sílica-gel. A toxina foi eluída da coluna com 10 mL de acetato de etila. O solvente foi evaporado e o extrato, dissolvido em volume conhecido de clorofórmio.

2.5 Quantificação da patulina

Alíquotas de 10, 20, 30 µL de extrato de amostra e solução padrão de patulina foram aplicadas em placas de vidro de cromatografia em camada delgada. As placas foram desenvolvidas no sistema de solventes tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:1, v/v/v). A identificação da patulina foi feita de acordo com Martins et al. (2002).

A quantificação foi feita através da aquisição da imagem fluorescente da patulina sob luz UV, através de uma câmera com detector de carga acoplada (DCA). A intensidade da fluorescência, que corresponde à determinada concentração da micotoxina, foi analisada através do *software* Imstat (*Image Statistics*) do pacote Iraf (*Image processing and Analysis in Java*, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3 Resultados e discussão

Colônias fúngicas pertencentes ao gênero *Byssochlamys* foram isoladas em 25% das amostras de suco de maçã analisadas, sendo *B. fulva* a espécie mais frequentemente isolada. Três cepas foram identificadas como *B. fulva* e uma cepa como *B. nivea*. Quanto ao potencial toxigênico, a cepa de *B. nivea* se mostrou produtora de patulina nas condições testadas. Este fato implica possível produção de patulina no suco durante seu armazenamento.

A cepa de *B. nivea* isolada do suco concentrado de maçã é considerada de grande importância comercial, pois este produto é usado como base para diversos outros, inclusive alimentos para crianças. Portanto, a presença de fungos toxigênicos pode trazer risco à saúde dos consumidores, em virtude dos inúmeros efeitos tóxicos que esta micotoxina tem apresentado em estudos com animais.

A origem da contaminação do suco de maçã com fungos termorresistentes são as frutas destinadas à produção destes sucos. Maçãs recolhidas do chão geralmente não apresentam o padrão exigido para o consumo na forma *in natura*, sendo destinadas para o processamento. Estas maçãs podem estar contaminadas com fungos originários do solo, que podem ser facilmente introduzidos no processamento do suco. Morales et al. (2007) constataram que a permanência de maçãs à temperatura ambiente até o momento do processamento

Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã

WELKE, J. E. et al.

é um ponto crítico de controle, pois, durante este período, o desenvolvimento de fungos deteriorantes e toxigênicos ocorre de maneira mais rápida do que quando as frutas são armazenadas sob refrigeração.

Poucos estudos sobre o isolamento de fungos termorresistentes em suco de maçã têm sido realizados. Em maçãs destinadas à produção de polpa, duas espécies de fungos termorresistentes foram isoladas: *N. fischeri* e *B. fulva* por Salomão et al. (2008). Em suco de maçã, foram isoladas *Talaromyces flavus* e *B. spectabilis* (BAGLIONI, 1998). *N. fischeri* foi isolada de polpa de tomate por Baglioni et al. (1999).

Os fungos do gênero *Byssochlamys* são os principais causadores da deterioração pós-tratamento térmico em produtos derivados de frutas (TOURNAS, 1994), sendo que seus ascósporos são capazes de resistir à temperatura de 87 °C por 30 min em sucos (PIECKOVÁ et al., 1994). Quando presentes, estes fungos se desenvolvem rapidamente nos alimentos à base de frutas, nos quais as condições de acidez e açúcar são ideais (VALIK e PIECKOVÁ, 2001).

Os ascósporos de *B. nivea* e *B. fulva* causam problemas consideráveis para a indústria de alimentos, porque ocorrem em produtos de grande importância econômica, como os sucos de frutas, geralmente conservados pela pasteurização (PITT e HOCKING, 1997). O suco de maçã é um excelente substrato para o crescimento de *B. nivea*, com produção de patulina em uma faixa de temperatura variando de 12-37 °C (ROLAND e BEUCHAT, 1984). Esta micotoxina vem sendo empregada como indicador da qualidade dos frutos e produtos de maçã (KADAKAL e NAS, 2003). *B. nivea*, além de produzir patulina, juntamente com outras espécies de

Byssochlamys, pode produzir dióxido de carbono quando cresce sob condições de baixo teor de oxigênio, provocando o estufamento das embalagens de sucos, bem como deteriorações visualmente percebidas em recipientes transparentes, ou ainda deterioração de frutas enlatadas ou engarrafadas (PITT e HOCKING, 1997).

As amostras de suco de maçã concentrado também foram analisadas quanto à presença de patulina. O método utilizado para quantificação desta toxina se mostrou eficiente. Nos sucos de maçã, isentos de patulina, foram adicionados 50, 100 e 200 µg.L⁻¹ de solução padrão de patulina e a recuperação foi de 93, 96 e 96%, respectivamente. O limite de detecção foi de 0,005 µg e o limite de quantificação 14 µg.L⁻¹. Os níveis de patulina dos sucos de maçã variaram de 15 a 46 µg.L⁻¹ e a concentração média desta micotoxina nas amostras analisadas foi de 21 ± 9,1 µg.L⁻¹ (Figura 2). A patulina foi encontrada em todas as amostras, sendo que os níveis detectados excederam o limite de 10 µg.L⁻¹, que é a concentração máxima permitida em produtos derivados de maçã destinados às crianças, segundo limite estabelecido pela Comissão das Comunidades Europeias (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2003). Entretanto, nenhuma amostra apresentou concentração de patulina acima de 50 µg.L⁻¹, limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para suco de maçã. No Brasil, ainda não existe legislação que estabeleça limite de patulina em alimentos.

As fases de produção do suco de maçã contribuem para a redução dos níveis de patulina. Após as etapas de pasteurização (90 °C/30 s), tratamento enzimático (utilização da pectinase), microfiltração e evaporação (96 °C/30 s), a redução da concentração de patulina foi

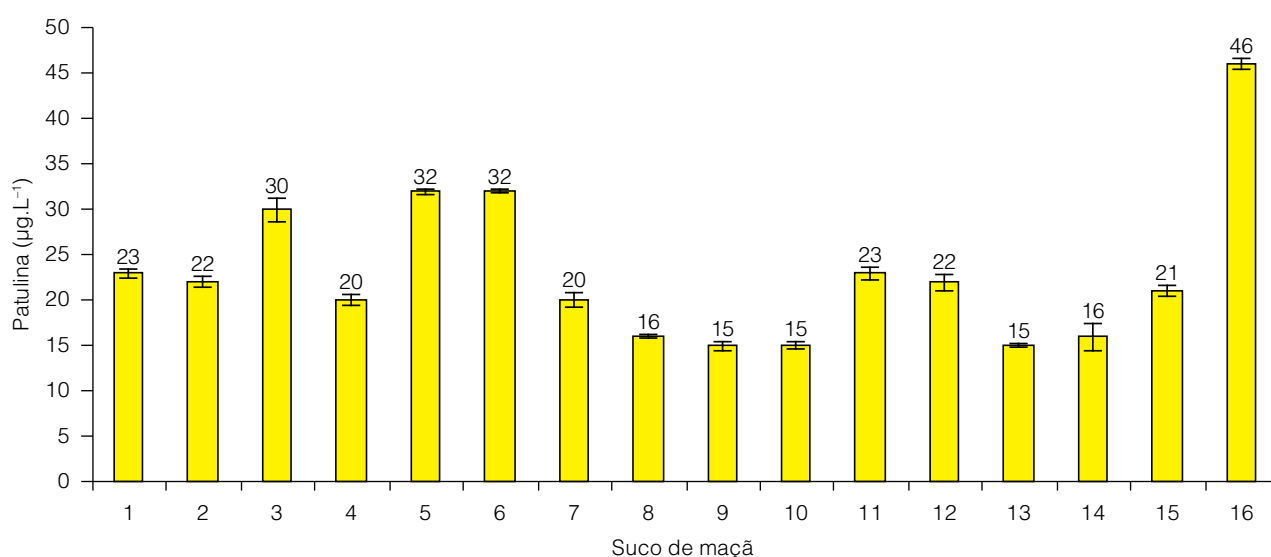


Figura 2. Níveis de patulina das amostras de suco de maçã obtidas de uma indústria processadora do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã

WELKE, J. E. et al.

de 37, 15, 33 e 31%, respectivamente. Ao considerar todo o processo de produção do suco de maçã, a redução da concentração de patulina foi de 75%. Embora o processamento do suco de maçã não elimine totalmente a toxina, seus níveis são consideravelmente reduzidos (WELKE et al., 2009). Entretanto, conforme observado na presente pesquisa, a patulina poderia ser produzida durante o armazenamento, pois os tratamentos térmicos aos quais o suco é submetido não eliminam o *B. nivea*.

Algumas medidas podem ser aplicadas para minimizar a contaminação das frutas com fungos termorresistentes. Durante a colheita, deve-se evitar o contato das frutas com o solo, onde os ascósporos estão presentes. Antes do processamento, as etapas de lavagem com sanitizantes à base de cloro e a separação das frutas com deterioração visível contribuem significativamente na redução do número de ascósporos no produto final (HASAN, 2000).

A pasteurização é o tratamento mais utilizado para reduzir a contaminação microbiana e, conseqüentemente, garantir a segurança dos alimentos. Este tratamento térmico é capaz de inativar a maioria dos microrganismos acidofílicos, mas é ineficiente para a inativação de fungos termorresistentes. A aplicação de tratamentos mais severos, através do aumento do tempo e da temperatura aplicados aos alimentos, é necessária para inativar os fungos resistentes ao calor. Entretanto, este tratamento resulta em alterações indesejáveis, o que inclui escurecimento e desenvolvimento de sabores e odores impróprios, além de perdas nutricionais. Estas alterações tornam a aplicação de tratamentos térmicos mais severos inviável em produtos à base de frutas (RAJASHEKHARA et al., 2000).

4 Conclusões

A pasteurização empregada durante a produção de suco de maçã não foi eficiente para eliminar fungos termorresistentes como os fungos do gênero *Byssoschlamys*. Esse fato implica em possível deterioração dos sucos durante o armazenamento, bem como na produção de patulina. A inativação de fungos termorresistentes é um processo complexo, em que é necessário aplicar processos térmicos severos ou uso da chamada tecnologia de barreiras através da combinação de processos de elevado custo. Considerando estes fatores, é importante controlar a contaminação das frutas através da aplicação de boas práticas agrícolas, principalmente durante a colheita, transporte e armazenamento das frutas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Projeto nº. 473128 2004/7, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Golden Sucos

Ltda. e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA/UFRGS.

Referências

- BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. Campinas, 1998. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.
- CIEGLER, A.; BECKWITH, A. C.; JACKSON, L. K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, n. 5, p. 664-667, 1976.
- HASAN, H. A. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 607-612, 2000.
- HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Standardization of methods for detecting heat resistant fungi. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, n. 571, p. 107-111, 2005.
- KADAKAL, C.; NAS, S. Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n. 9, p. 987-990, 2003.
- KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 2, p. 410-412, 1997.
- LABUDA, R.; TANCINOVÁ, D. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 13, n. 2, p. 193-200, 2006.
- LIU, B. H.; YU, F. Y.; WU, T. S.; LI, S. Y.; SU, M. C.; WANG, M. C. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 191, n. 3, p. 255-263, 2003.
- MACDONALD, S.; LONG, M.; GILBERT, J.; FELGUEIRAS, I.; BRERA, C.; JØRGENSEN, K.; MACHO, M. L.; MAJERUS, P.; MARTINS, M. L.; MEVISSSEN, L.; MICHELET, J. Y.; NUOTIO, K.; PITTET, A.; SZYMANSKI, L.; TUCKER, N.; VILADRICH, R.; VOOGT, J.; WENNEMAR, A. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 83, n. 6, p. 1387-1394, 2000.
- 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**, London, v. 19, n. 6, p. 568-574, 2002.
- MELLO, L. M. R. Produção e Mercado Brasileiro de maçã: comunicado técnico n. 50. Bento Gonçalves: EMBRAPA,

Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçãWELKE, J. E. *et al.*

2004. Disponível em: <<http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/comunicado/cot050.pdf>>. Acesso em: 07 Set. 2008.
- MORALES, H.; MARÍN, S.; CENTELLES, X.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical control point for patulin accumulation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 260-265, 2007.
- NIELSEN, P. V. Preservative and temperature effect on growth of three varieties of the heat-resistant mould, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 6, p. 1735-1740, 1991.
- PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D.; JESENSKÁ, Z. Heat resistant fungi isolated from soil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 297-299, 1994.
- PITT, J.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2 ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1997. 593 p.
- RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape fruit. **Journal of Food Microbiology**, Illinois, v. 17, n. 3, p. 269-275, 2000.
- RICE, S. L.; BEUCHAT, L. R.; WORTHINGTON, R. E. Patulin production by *Byssosclamyces* spp. in fruit juices. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 791-796, 1977.
- ROLAND, J. O.; BEUCHAT, L. R. Influence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssosclamyces nivea* in apple juice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 205-207, 1984.
- SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 116-121, jan.-mar. 2008.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. Introduction to Food- and Airborne Fungi. 7 ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004. 389 p.
- SILHA, H.; ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food. **Fruit processing**, Strabenhaus, v. 5, n. 3, p. 164-167, 1999.
- SPEIJERS, G. J. A.; FRANKEN, M. A. M.; Van LEEUWEN, F. X. R. Subacute toxicity study of patulin in the rat: effects on the kidney and the gastrointestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 23-30, 1988.
- 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**, Easton, v. 29, n. 4, p. 790-792, 1981.
- SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S.; JAYARAM, H. L. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 33, n. 1, p. 76-77, 1996.
- THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) No 1425/2003 of 11 August 2003. **Official Journal of the European Union**, Brussels, p. 13-14, 2003.
- TOURNAS, V.; TRAXLER, R. W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 9, p. 814-816, 1994.
- TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 20, n. 4, p. 243-263, 1994.
- UGWUANYI, J. O.; OBETA, J. A. N. Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 7, p. 1054-1059, 1999.
- VALIK, L.; PIECKOVA, E. Growth modeling of heat resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 11-17, 2001.
- WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A.; NOLL, I. B. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. **Food Control**, Guildford, n. 20, p. 48-52, 2009.