

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

GRAZIELLE GEBRIM SANTOS

**QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE
MICOTOXINAS DE *Alternaria alternata* EM DERIVADOS DE TOMATE**

Brasília
2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

GRAZIELLE GEBRIM SANTOS

**QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE
MICOTOXINAS DE *Alternaria alternata* EM DERIVADOS DE TOMATE**

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau do título de Doutor em Nutrição Humana.

Orientador: Dr. Celso Luiz Moretti

Co-orientadora: Dra. Leonora Mansur Mattos

Brasília
2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

GRAZIELLE GEBRIM SANTOS

**QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE
MICOTOXINAS DE *Alternaria alternata* EM DERIVADOS DE TOMATE**

Tese DEFENDIDA e APROVADA em 14 de março de
2014, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:

Dr. Leonardo Silva Boiteux
Embrapa Hortaliças

Dra. Leonora Mansur Mattos
Embrapa Hortaliças

Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca Boiteux
Embrapa Hortaliças

Profa. Dra. Wilma Maria Coelho de Araújo
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Rita de Cássia Coelho de Almeida Akutsu
Universidade de Brasília – Suplente

Dr. Celso Luiz Moretti (Orientador)
Universidade de Brasília
Embrapa

Dedico
A meus pais, Magda e Alaôr.
Ao meu marido, Daniel.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Celso Luiz Moretti pela orientação e oportunidade oferecida na Embrapa Hortaliças (Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças - CNPH).

À Dra. Leonora Mansur Mattos, co-orientadora e autora do projeto, pelo apoio, atenção, amizade e orientação.

À amiga Fernanda Ribeiro Rosa pelo apoio durante todo o primeiro ano do doutorado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA): Adriana Barbosa, Cristina Soethe, Déborah Valério, Eliane Molica, Jenniffer Vieira, Lidiane Muniz, Nathalie Ferreira e Ricardo Macêdo pelo apoio, troca de experiência, risos e lamentações compartilhadas.

Aos funcionários do LCTA: João, Ricardo e Deusânio, muito obrigada pela ajuda! E a D. Antônia, pelo carinho.

Aos funcionários do CNPH, em especial a Claudia Mirtes, pela amizade, carinho e estadia!

Ao meu marido, Daniel, pelo apoio, paciência e por todo o incentivo e afeto, sem o qual mais essa etapa não seria possível.

À minha família, como um todo, por ter abraçado mais esse sonhos junto comigo.

À professora Dra. Rita de Cássia Coelho de Almeida Akutsu da UnB e aos pesquisadores do CNPH, Dr. Leonardo Silva Boiteux e Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca Boiteux, por aceitarem prontamente o convite para composição da banca.

Às minhas “chefas” Karina Aragão e Janaina Sarmiento, do Centro Universitário de Brasília-UniCEUB (minha segunda casa nos últimos dois anos), pela redução da carga horária e apoio a realização do doutorado.

À Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa do UniCEUB pelo apoio do Programa de Iniciação Científica. As alunas do curso de Biomedicina, Lígia Kobelus e Camila Santos, e a profa. Fabíola Fernandes, pela auxílio na realização das análises de *Salmonella*.

Ao Dr. Jadir Borges, por disponibilizar o Laboratório de Nematologia do CNPH para realização das extrações.

Ao funcionário José Getúlio Silva, do Laboratório de Genômica II, pelo enorme auxílio na extração e nas análises de micotoxinas. E a Dra. Maria Esther por permitir o uso do Laboratório.

A professora Dra. Mara Reis Silva, da Universidade Federal de Goiás, maior incentivadora dessa longa jornada. Agradeço pelos constantes “puxões de orelha” cobrando a conclusão do doutorado. E também a professora Dra. Maria Margareth Veloso Naves por todo incentivo.

Ao Dr. Edson Herculano pelo auxílio na revisão do texto.

Ao professor Diego Palmiro R. Ascheri da Universidade Estadual de Goiás (UEG) por viabilizar o uso do viscosímetro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana.

A todos que contribuíram de alguma forma, obrigada!

A Deus que tornou tudo possível.

“Apesar de todas as inovações o homem continua sendo o que come, e a diferença alimentar em uma colmeia, faz da larva uma rainha.” (Lieselotte Ornellas)

RESUMO

O tomate industrial destina-se à produção de derivados, como extratos, polpas, molhos e conservas de tomate sem pele. A indústria de processamento de tomates no Brasil apresentou um grande crescimento a partir da década de 1970. O Brasil figura entre os dez maiores produtores de tomate industrial do mundo. A cultura do tomate é afetada por um grande número de doenças causadas por fungos e bactérias. Entre os fungos produtores de toxinas que acometem os tomates industriais destacam-se os do gênero *Alternaria*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade físico-química, microbiológica e a ocorrência de micotoxinas de *Alternaria alternata* em derivados de tomate e em tomates frescos. Derivados de tomate de três marcas (codificadas como A, B, C) e três tipos (extrato, polpa, catchup) foram adquiridos no comércio local do Distrito Federal. Frutos de tomate foram obtidos em uma indústria de processamento do Estado de Goiás e levados para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças para realizar o levantamento da ocorrência de fungos. Os derivados de tomate foram avaliados quanto às características físicas e químicas: teor de água, sólidos totais, sólidos solúveis, pH e acidez titulável. Avaliou-se também a ocorrência de matéria estranha, sujidades, larvas e parasitos, bem como a qualidade da matéria-prima por meio da contagem de fungos filamentosos (Howard) e a adequação, quanto aos parâmetros microbiológicos, à legislação vigente. Os tomates com ocorrência natural de *A. alternata* e os derivados de tomate foram avaliados quanto à ocorrência das micotoxinas alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME) por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Quanto aos parâmetros físico-químicos, a polpa da marca A apresentou teores de sólidos solúveis inferiores a 6% (mínimo estabelecido pela legislação brasileira). Houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre todas as marcas de catchup e polpa de tomate avaliadas em relação a teor de água, sólidos totais, sólidos solúveis, pH e acidez titulável. Amostras de catchup da marca C apresentaram os menores teores de sólidos totais ($24,28 \pm 0,48$ g/100g) e sólidos solúveis ($27,32 \pm 0,12$ °Brix), enquanto a marca A apresentou os maiores (sólidos totais: $30,96 \pm 0,30$ g/100g e sólidos solúveis: $32,47 \pm 0,10$ °Brix). Em relação ao extrato de tomate, não foram observadas diferenças significativas quanto ao teor de água, sólidos totais e acidez titulável. Todos os extratos apresentaram teor de sólidos totais inferior ao mínimo (18%) estabelecido pela legislação vigente. Dos produtos avaliados apenas a marca B de extrato de tomate apresentou ausência de sujidades, larvas e parasitos. Nas demais amostras foram encontrados fragmentos de inseto, pelos de rato e ácaros. Pelos de ratos foram encontrados em amostras de polpa de tomate e extrato de tomate, já fragmentos de insetos foram identificados em todos os produtos de todas as marcas, exceto no extrato da marca B. Apenas o catchup da marca C e a polpa da marca A apresentaram ácaros. A legislação brasileira estabelece, para produtos de tomate, a ausência de sujidades, parasitos e larvas e a ausência de pelos de roedores com base na RDC nº 175 de 2003. Em relação à contagem de filamentos micelianos pelo método Howard todos os produtos avaliados se mostraram adequados, porém o extrato de tomate da marca B apresentou contagem de $12,88 \pm 2,04\%$, o que pode indicar a presença de 1,2% de matéria-prima deteriorada (tomates com mofo). Quanto as análises microbiológicas, todas as amostras avaliadas apresentaram ausência de *Salmonella* sp. por 25 g, contagem de coliformes a 45 °C inferior a 3 NMP/g e estafilococos coagulase positiva inferior a 10 UFC/g. Nas amostras de polpa e extrato de tomate de todas as marcas não foram identificados níveis detectáveis das micotoxinas. Nas amostras de catchup da marca A foram encontrados teores de AOH variando de 1,22 a 8,45 µg/g e em amostras de tomates naturalmente contaminadas com *A. alternata* os teores de AOH variaram de 15,98 a 18,18 µg/g. A micotoxina AME foi identificada apenas em uma amostra de

catchup em sachê da marca C. Concluiu-se que a maioria dos concentrados de tomate está em desacordo com a legislação vigente quanto ao teor de sólidos totais, sólidos solúveis e apresentam fragmentos de inseto e pelos de ratos. Porém, estão livres dos principais microrganismos patogênicos. Micotoxinas de *A. alternata* foram identificadas apenas no produto catchup e em duas amostras de frutos tomate naturalmente contaminados com esse fungo.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, extrato, polpa, catchup, fungo, alternariol, alternariol monometil éter.

ABSTRACT

Processing tomatoes are intended for the production of tomato derivatives such as pulps, sauces and canned peeled tomatoes. The tomato processing industry had a great increase from the 1970s in Brazil. The country is among the ten largest processing tomato producers of in the world. Many diseases caused by fungi and bacteria are reported affecting this crop. Species of the genus *Alternaria* are among the most important toxin-producing fungi attacking processing tomatoes. The objective of the present work was to evaluate the physicochemical and microbiological quality as well as the occurrence of toxins produced by *Alternaria alternata* in tomato products and in fresh tomato fruits. Tomato products from three distinct brands (codified as A, B, and C) and three processing tomato items (extract, pulp, and ketchup) were obtained in the Federal District of Brasilia local market. Fruits were obtained from a processing industry in the State of Goiás and taken to the Plant Pathology Laboratory at Embrapa Vegetable Crops to confirm the presence of fungal infection. Tomato products were evaluated for the following physical and chemical characteristics: water content, total solids, soluble solids, pH, and titratable acidity. Strange materials, dirtiness, larvae and parasites were also evaluated, as well as the raw material quality by counting filamentous fungi (Howard). The adequacy for microbiological parameters, according to legislation was also assessed. Tomato fruits with natural occurrence of *A. alternata* and tomato derivatives were evaluated via High Performance Liquid Chromatography for the occurrence of two toxins: alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME). The pulp of brand "A" presented soluble solids content lower than 6% (the minimum established by the Brazilian legislation). Significant differences ($p < 0,001$) were detected among all ketchup and pulp samples evaluated for water content, total solids, soluble solids, pH and titratable acidity. Ketchup samples of the brand "C" had the lowest contents of total solids (24.28 ± 0.48 g/100g) and soluble solids (27.32 ± 0.12 °Brix), whereas the brand "A" displayed the highest values for total solids (30.96 ± 0.30 g/100g) and soluble solids (32.47 ± 0.10 °Brix). No significant differences were observed in relation to water content, total solids and titratable acidity in all evaluated tomato extracts. However, all tomato extracts had total solids content lower than the minimum (18%) established by the current legislation. From all products analyzed, brand "B" was the only extract that did not present dirtiness, larvae, and parasites. In the other samples, fragments of insects, rodent's hair, and mites were found. Rodent hairs were found in samples of pulp and in extract samples, but insect fragments were identified in all products of all brands, except in brand B extract. Mites were detected only in the brand "C" Ketchup and in the brand "A" pulp. The Brazilian legislation establishes the absence of dirt, parasites and larvae and the absence of rodent hairs in tomatoes products, according to the RDC#175 (from 2003). Regarding the counting of mycelium filaments by the Howard method, all products evaluated are adequate; however the B brand extract presented counting of $12,88 \pm 2,04\%$, which may indicate the presence of up to 1.2% of deteriorated raw material (moldy tomatoes). *Salmonella* (25 g samples) coliforms (counting at 45°C lower than 3 NMP/g) and positive coagulase staphylococcus (lower than 10 UFC/g) were not found in all evaluated processing items. Detectable levels of mycotoxins were not identified in the

samples of pulp and extract of all brands. Contents of AOH in the samples of brand “A” ketchup ranged from 1.22 to 8.45 µg/g. In tomato fruit samples naturally contaminated with *A. alternata* the AOH contents ranged from 15.98 to 18.8 µg/g. AME toxin was identified only in one ketchup (sachet) sample of the brand “C”. Based on our results, the majority of the tomato concentrates were not in accordance with the current Brazilian legislation regarding their total solids content and soluble solids as well as in relation to the presence of insect fragments and rodent hairs. *Alternaria alternaria* toxins were identified only in ketchup and in two samples of tomato fruits naturally contaminated by this fungus.

Key-words: *Solanum lycopersicum*, extract, pulp, ketchup, fungi, alternariol, alternariol monomethyl ether.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	O TOMATEIRO.....	16
2.2	O TOMATE PARA A INDÚSTRIA.....	18
2.3	A PRODUÇÃO DE TOMATE NO BRASIL E NO MUNDO.....	20
2.3.1	Composição do tomate e derivados.....	23
2.4	DERIVADOS INDUSTRIAIS.....	24
2.4.1	Concentrado de tomate.....	25
2.4.2	Extrato de tomate.....	25
2.4.3	Molho de tomate.....	25
2.4.4	Catchup.....	26
2.4.5	Polpa de tomate.....	26
2.5	QUALIDADE.....	26
2.5.1	Doenças comuns no cultivo do tomate industrial.....	27
2.5.2	Fungos.....	27
2.5.2.1	<i>Fungos micotoxinogênicos.....</i>	30
2.5.2.2	<i>Alternaria.....</i>	30
2.5.2.2.1	<i>Micotoxinas produzidas por Alternaria.....</i>	33
2.5.3	Micotoxinas em derivados de tomate.....	34
2.6	EFEITOS TÓXICOS DA INGESTÃO CRÔNICA DE MICOTOXINAS.....	35
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	MATERIAL.....	39
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4.3	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE DERIVADOS DE TOMATE.....	40
4.3.1	Extrato seco e teor de água.....	40
4.3.2	Acidez titulável.....	40

4.3.3	Sólidos solúveis totais.....	40
4.4	ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	41
4.4.1	Análise de matérias estranhas.....	41
4.4.2	Contagem de Fungos pelo Método Howard.....	42
4.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	43
4.5.1	Preparo das amostras e diluições.....	44
4.5.2	Determinação de Coliformes a 45 °C.....	44
4.5.3	Determinação <i>Salmonella</i> sp.....	44
4.5.4	Estafilococos coagulase positiva.....	44
4.6	ANÁLISES DE MICOTOXINAS.....	45
4.6.1	Padrões.....	45
4.6.1.1	<u>Preparo das soluções padrões.....</u>	45
4.6.1.2	<u>Preparo das soluções de trabalho.....</u>	45
4.6.2	Curva padrão.....	46
4.6.3	Aquisição das amostras de produtos de tomate.....	47
4.6.4	Determinação de AME e AOH.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1	QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE DERIVADOS DE TOMATE	54
5.2	ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	57
5.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	62
5.4	OCORRÊNCIA DE AME E AOH EM TOMATES FRESCOS CONTAMINADOS E CONCENTRADOS DE TOMATES.....	63
6	CONCLUSÕES.....	78
7	SUGESTÕES.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

Hortaliça refere-se “ao grupo de plantas que apresentam as seguintes características: consistência tenra, herbácea; ciclo biológico curto; exigência de tratos culturais intensivos, cultivo em áreas menores, em relação às grandes culturas; e utilização na alimentação humana sem exigir prévio preparo industrial” (FILGUEIRA, 2008). A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) define hortaliças como sendo “plantas anuais, bianuais ou perenes cultivadas em hortas, em campo aberto ou sob cultivo protegido e que são utilizadas quase exclusivamente como alimento”. São incluídas nesse grupo, plantas classificadas como cereais ou da família das leguminosas (grãos e/ou vagens), cujos produtos são colhidos em estado verde (tenros ou imaturos); também se inclui nesse grupo os melões e melancias por seu comportamento hortícola no cultivo e por serem cultivos temporais como as demais hortaliças. Algumas hortaliças são utilizadas unicamente como tempero ou condimento devido ao seu aroma e sabor (FAO, 2011).

A ingestão de três porções de hortaliças é recomendada como parte de uma alimentação saudável para a população brasileira (BRASIL, 2005a). Dados de pesquisas recentes mostram uma redução no consumo de hortaliças em todas as classes sociais, sendo tal redução maior nas famílias de baixa renda (IBGE, 2010). O que pode ser justificado devido ao aumento do consumo de produtos industrializados (SANTOS et al., 2010).

No Brasil as hortaliças mais consumidas *in natura* incluem o tomate, seguido da alface e da cenoura (IBGE, 2010; VIEBIG et al., 2009). O tomate é uma hortaliça originária da região Andina, que inclui partes do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru. Embora os ancestrais do tomate sejam originários dessa região, os primeiros relatos de domesticação fazem referência ao México (COSTA; HEUVELINK, 2005). Atualmente o tomateiro é cultivado em todo o mundo para consumo *in natura*, na forma de hortas caseiras e também em grandes lavouras para atender a demanda da indústria de processamento (FILGUEIRA, 2008).

O tomate pode ser consumido de forma direta, como uma hortaliça fresca ou pode ter sua polpa transformada em massa ou outros derivados para consumo posterior. Os cultivos de tomate são destinados ao abastecimento industrial ou ao consumo *in natura*, em função de suas características de produção, beneficiamento, processamento e comercialização, compreendendo duas cadeias produtivas que diferem conforme as variedades utilizadas, formas de cultivo e consumo final. Nas últimas décadas houve um aumento no consumo de derivados de tomate em função do aumento da população urbana (CAMARGO et al., 2006).

O tomate industrial destina-se à produção de derivados, como extratos, polpas, molhos e conservas de tomate sem pele. Cerca de 70% é destinada à produção de extrato; 18% a conservas e o restante a sucos e desidratados (WILKINSON, 2000; SATO, 2005). Dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 demonstram que o consumo no Brasil de massa de tomate é de 0,665 kg/per capita ao ano e de molho de tomate de 0,634 kg/per capita ao ano (IBGE, 2010). As regiões Sul e Sudeste ultrapassam a média nacional, com um consumo de molho de tomate de 1,060 kg/per capita ao ano na região Sudeste e 0,971 kg/per capita ao ano de massa de tomate na região Sul (CPT, 2010). Embora os derivados de tomate constituam uma fonte de elevada biodisponibilidade de licopeno, os produtos industrializados apresentam elevadas concentrações de sódio, com um teor médio de 907 mg/100 g em cacthup, o que exige moderação em seu consumo (MORITZ; TRAMONTE, 2006).

A indústria de processamento de tomates no Brasil teve grande crescimento a partir da década de 1970. Atualmente, o Brasil figura entre os dez maiores produtores de tomate industrial do mundo, dos quais os Estados Unidos encontra-se em primeiro. O aumento da produção industrial foi estimulado em função da crescente demanda nacional por tomate e seus derivados, que tem se tornado viável em função da concentração da produção em áreas de cerrado, principalmente nos estados de Goiás e Minas Gerais (CPT, 2010).

A indústria de processamento de tomates exige frutos completamente maduros, com coloração vermelho-intensa, sem o pedúnculo e outras impurezas, livres de sintomas de pragas e doenças, danos mecânicos e fisiológicos, como padrão de qualidade; contudo várias doenças acometem o tomateiro, comprometendo sua produtividade e padrão de qualidade (CPT, 2010). A cultura do tomate é afetada por um grande número de doenças causadas por fungos e bactérias, que podem levar à perda total da produção, caso medidas integradas de controle e manejo não sejam adotadas corretamente. Os fungos produzem esporos ou fragmentos de hifas que são espalhados pelo vento ou por respingos da água da chuva e/ou irrigação. Na ausência de plantas hospedeiras, estruturas como clamidósporos, escleródios e oósporos permitem a disseminação e sobrevivência das espécies de fungos, garantindo que esses patógenos sobrevivam de uma estação para a outra, associados a plantas (vivas ou mortas), ao solo (em restos de cultura em decomposição), a sementes ou a insetos. Os principais fungos que atacam o tomate industrial incluem espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Oidium*, *Mucor* e *Rhizopus* (LOPES; ÁVILA, 2005).

Além das doenças transmitidas por fungos, contaminações químicas e físicas também constituem problemas de qualidade. A contaminação física está associada ao processo de colheita mecanizada, em que objetos estranhos são encontrados no produto, como pedaços de vidro, metais, etc. Dentre os contaminantes químicos figuram principalmente os agrotóxicos e os metabólitos produzidos por fungos; as chamadas micotoxinas (MELO; VILELA, 2005).

Os perigos microbiológicos são, de forma geral, controlados nos diversos processos agroindustriais, embora a ocorrência de fungos no período de colheita e pós-colheita seja uma realidade. As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos fitopatogênicos com elevada toxicidade, que provocam a deterioração de alimentos. Entre os fungos produtores de toxinas que acometem os tomates industriais podem ser nomeados os seguintes gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* (SONGSERMSAKULA; RAZZAZI-FAZELIB, 2008). Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* estão associados à contaminação de tomates industriais durante o armazenamento, enquanto os gêneros *Fusarium* e *Alternaria* podem produzir micotoxinas antes ou logo após a colheita (KABAK; DOBSON; VAR, 2006).

Os danos provocados por fungos produtores de micotoxinas se estendem além do prejuízo direto aos frutos, podendo comprometer seriamente a qualidade dos produtos processados (MORETTI; CALBO; HENZ, 2000). A presença de micotoxinas em alimentos e rações pode levar a perdas econômicas consideráveis associadas à mortalidade de animais e redução do rendimento da produção (leite e carnes), além dos riscos à saúde humana (MARIUTTI, 2003).

Nesse contexto, estudar as características de qualidade dos concentrados de tomate e a presença de micotoxinas de *Alternaria alternata* em tomates frescos e processados é de grande importância. Este conhecimento pode auxiliar no estudo e revisão da legislação vigente, na melhoria das Boas Práticas de Fabricação no campo e na fabricação de produtos de melhor qualidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O TOMATEIRO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família *Solanaceae* e seu fruto apresenta dois ou mais lóculos com pequenas sementes reniformes (ANDREUCETTI, 2005). Acredita-se que o tomateiro tenha sua origem nas regiões montanhosas dos Andes e foi levado pelos incas até o sul do México, nas regiões habitadas por povos astecas. Do México o tomate teria sido levado a Europa, para Sevilha, na Espanha em meados do século XVI e de lá para a Itália em 1554, onde uma variedade amarela conhecida como pomo d'oro (maçã de ouro) deu origem ao conhecido molho pomodoro. Na França foi usado como planta ornamental por muito tempo, chamado “*pomme d'amour*” (maçã do amor). O tomate foi introduzido no Brasil pelos imigrantes europeus e o aumento do consumo ocorreu somente após a primeira Guerra Mundial, por volta de 1930 (ALVARENGA, 2004).

O tomateiro é uma planta herbácea arbustiva com ramificações laterais. Suas raízes são pivotantes e o caule flexível, incapaz de suportar o peso da planta na posição vertical, exigindo que seu cultivo seja conduzido de forma tutorada, com modificações em função do hábito de crescimento e destino da produção (FILGUEIRA, 2008). Assim, o tomateiro pode ser cultivado sob duas formas: tutorado quando o destino é o consumo direto (tomate de mesa) e não tutorado quando destinado ao processamento (tomate industrial). As plantas de crescimento indeterminado ou semi-determinado são tutoradas para evitar seu contato com o solo, minimizando assim os problemas relacionados às doenças que atacam folhas e frutos. Nesse tipo de cultivo utilizam-se como apoio estacas de madeira ou bambu que direcionam o crescimento da planta. Com este tipo de cultivo o período de produção fica limitado de 50 a 60 dias. Este sistema é utilizado para cultivares cujos frutos são destinados ao consumo *in natura* (também chamados de tomates para mesa). No sistema de cultivo não tutorado utilizam-se cultivares de crescimento determinado e a produção é destinada à industrialização. As plantas das cultivares, cujos frutos são destinados à industrialização, param de crescer durante a frutificação e com o peso da haste se apóiam no solo, sendo este cultivo chamado de rasteiro (MAKISHIMA; MELO, 2004).

Em relação às condições climáticas, embora o tomateiro seja uma planta com grande capacidade de adaptação às condições climáticas, seu melhor desenvolvimento ocorre em

condições de clima subtropical de altitude ou temperado, fresco e seco, com temperaturas entre 16 °C e 29 °C, com tolerância de 10 °C a 34 °C. No entanto, com temperaturas inferiores a 12 °C o tomateiro tem seu crescimento reduzido e temperaturas superiores a 28 °C promovem a redução da síntese de licopeno, com conseqüente alteração da coloração. Além das condições climáticas, aspectos como a precipitação pluvial, umidade relativa e granizo também podem afetar negativamente tanto a planta como os frutos, ocasionando perdas no rendimento e na qualidade. Em função dos danos ocasionados pela umidade e pela chuva, o tomate industrial deve ser plantado em épocas do ano ou em locais onde tais fatores sejam mínimos. Assim, na Região Centro-Oeste a época mais adequada ao plantio se estende da segunda quinzena de fevereiro até o mês de junho (FILGUEIRA, 2003; GIORDANO; SILVA, 2000).

O tomate é um fruto macio que possui uma cutícula quase impermeável a gases e a água. Por ser um fruto sensível, cuidados em relação ao empilhamento, quedas e outros impactos devem ser considerados na pós-colheita, reduzindo a manipulação e garantindo uma melhor qualidade. O fruto do tomate pode ser consumido cru ou cozido. Da polpa são fabricados o extrato, a polpa, o catchup, molhos para massas, bem como sucos e geleias (FERNANDES; CARDOSO; MARTINELLI, 2010).

Sua estrutura é composta por: epicarpo (pele), mesocarpo, endocarpo, feixe fibrovascular, septo, lóculo, tecido placentário e sementes; os lóculos estão no interior dos frutos e as sementes imersas no tecido placentário. Nas indústrias a pele e as sementes são consideradas subprodutos e removidas durante o processamento e destinadas à alimentação animal (Figura 1). Os frutos podem ter dois ou mais lóculos, dependendo da cultivar (FERRARI, 2008; KNOBLICH; ANDERSON; LATSHAW, 2005).

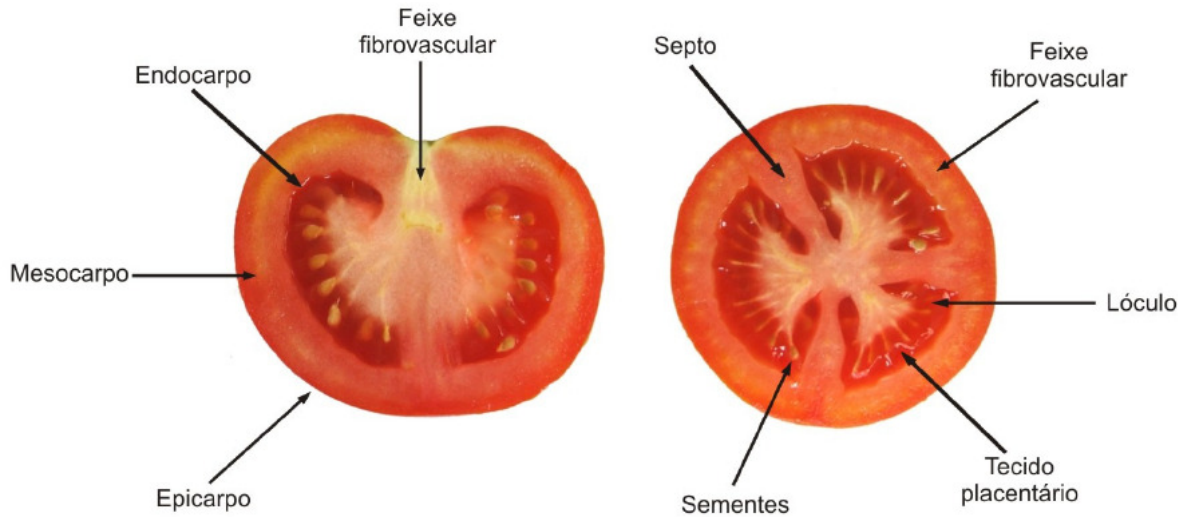


Figura 1. Constituintes de um tomate trilobulado. Fonte: Ferrari (2008).

2.2 O TOMATE PARA A INDÚSTRIA

De acordo com a Portaria nº 278, de 30 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988) o tomate industrial considerado “fruto bom” é “o fruto sadio, com coloração avermelhada, uniforme, sem pedúnculo, fisiologicamente desenvolvido, limpo, com textura de polpa firme, livre de danos mecânicos, fisiológicos, pragas e doenças”. A classificação do tomate na indústria é realizada por meio de uma sonda que coleta uma amostra diretamente dos caminhões. A partir da amostra são avaliados os parâmetros de qualidade do tomate que determinam os descontos e premiações pagos ao produtor e a finalidade do tomate na fábrica (SOARES; RANGEL, 2012).

Os frutos destinados ao processamento industrial são classificados de acordo com sua qualidade, avaliando-se a presença de defeitos (Tabela 1). Na Tabela 2 estão apresentados os dados em relação às exigências, tolerâncias, prêmios ou descontos relativos aos tipos de tomate destinados ao processamento industrial.

Tabela 1. Defeitos do tomate destinado ao processamento industrial

Defeitos graves	Descrição
Verde	Tomate imaturo que apresente mais do 50% de sua superfície verde.
Bichado ou brocado	Tomate com presença de larvas ou seus efeitos (furados).
Mofado	Tomate apodrecido, devido à ação de fungos.
Rachado	Tomate com rachadura profunda (lóculo visível), não cicatrizada, expondo os tecidos internos, com perda de líquido.
Desintegrado	Tomate ou fragmentos em decomposição, devido à excessiva compressão ou ação do agentes microbiológicos.
Pequeno	Tomate com diâmetro horizontal maior ou igual a 15 mm.
Com fundo preto	Tomate com podridão apical.
Defeitos gerais	Descrição
Queimado	Tomate com escaldadura provocada pela ação do sol.
Descolorido	Tomate com a coloração amarela (fisiológico), que jamais atinge o ponto ideal de maturação.
Com rachadura superficial	Tomate com fenda na película ou atingindo a polpa, mas sem perda de líquido.
Lesionados	Tomate com ferimentos ou depressões devidos à ação de granizo ou outras causas mecânicas, porém sem contaminação microbiológica.
Murcho	Tomate sem turgência, enrugado e flácido.
Com coração preto	Tomate com necrose na polpa ou na placenta.
Com pedúnculo	Tomate com o pedúnculo aderido.

Fonte: BRASIL (1988).

Tabela 2. Exigências, tolerâncias, prêmios ou descontos relativos aos tipos de tomate destinados ao processamento industrial

Tipo	Exigência mínima de frutos bons (%)	Tolerância máxima de defeitos graves (%)	Prêmio ou desconto sobre o peso (%)
Especial	50	0 a 10	+ 10
Standard	40	10,1 a 20,0	0
Utilizável I	40	20,1 a 25,0	- 5
Utilizável II	40	25,1 a 30,0	- 10
Utilizável III	40	30,1 a 35,0	- 20
Utilizável IV	40	35,1 a 40,0	- 30

Fonte: BRASIL (1988).

2.3 A PRODUÇÃO DE TOMATE NO BRASIL E NO MUNDO

O tomate é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas, tanto como produto fresco como seus processados, ocupa a 12^o posição entre as *commodities* mais produzidas no mundo segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2008). No ano de 2008 sua produção alcançou 136,2 milhões de toneladas. Segundo o *World Processing Tomato Council* (WPTC, 2009) cerca de 36,7 milhões de toneladas corresponderam ao tomate industrial. No ano de 2012 a produção mundial de tomate industrial ultrapassou 33 milhões de toneladas, das quais Estados Unidos, China e Itália representam os países de maior volume de produção (WPTC, 2013). A participação do Brasil na produção mundial em 2013 foi pouco mais de 3,8%, ocupando a 7^o posição (Tabela 3).

Tabela 3. Produção mundial de tomate industrial (em milhões de toneladas)

Colocação	País	Produção (em milhões de toneladas)
1º	Estados Unidos da América	11.928
2º	Itália	4.500
3º	China	3.230
4º	Espanha	1.935
5º	Turquia	1.750
6º	Irã	1.750
7º	Brasil	1.294
8º	Portugal	1.190
9º	Tunísia	830
10º	Chile	668

Fonte: WPTC (2013).

A produção do chamado tomate rasteiro no Brasil (tomate industrial), iniciou-se no final do século XIX, no Município de Pesqueira, em Pernambuco, ampliando-se para o sudeste em função da instalação de indústrias de processamento na década de 1950 em São Paulo. A expansão da cultura para o Centro-Oeste ocorreu a partir de 1990, favorecida pelas condições climáticas favoráveis da região (SILVA; GIORDANO, 2000).

O tomate industrial vem ganhando grande destaque na produção mundial, com uma marcante expansão nos últimos anos, devido à industrialização em larga escala, ao aumento da demanda de alimentos prontos para consumo, às refeições fora do domicílio, ao crescimento das redes de *fast food* e a busca por menor tempo para o preparo dos alimentos em casa, resultado da maior inserção da mulher no mercado de trabalho, dentre outros fatores (CAMARGO et al., 2006).

Em 2010 a safra foi de 1,8 milhões de toneladas, das quais o Estado de Goiás concentrou 86% da produção nacional, seguido dos Estados de São Paulo (12,7%) e Minas Gerais (1,3%) (VILELA et al., 2012). Na Figura 2 é apresentada a participação dos principais municípios produtores no Estado de Goiás.

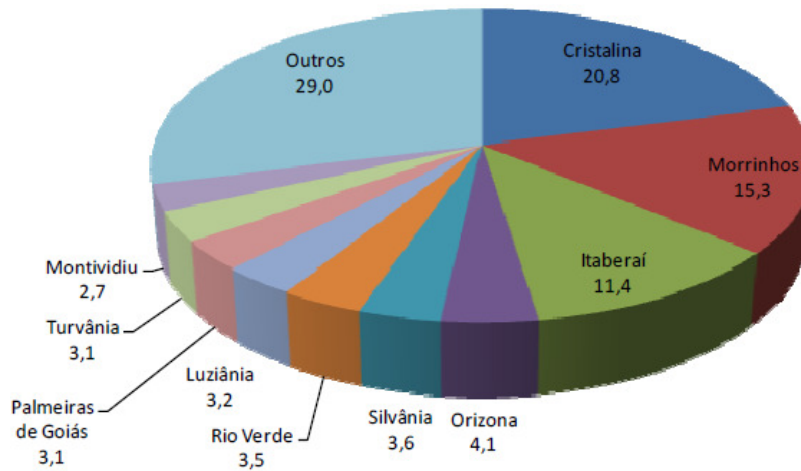


Figura 2. Participação dos principais municípios produtores de tomates do Estado de Goiás (GOIÁS, 2010)

A expansão e a concentração de indústrias processadoras de tomate no Estado de Goiás foram resultado do crescimento da produção e da produtividade, associados às condições favoráveis do Cerrado, à alta tecnologia e logística das lavouras e a políticas de incentivos fiscais praticadas pelo governo estadual. Em 2011 havia no Brasil 23 indústrias de processamento de concentrados de tomate, das quais 11 indústrias em operação no Estado de Goiás. Na Tabela 4 estão apresentadas as principais empresas, bem como sua localização segundo dados da Secretária de Indústria e Comércio do Estado de Goiás (VILELA et al., 2012; GOIÁS, 2010).

A produção anual de pasta de tomate (30° Brix) é de 247 mil toneladas, das quais são produzidos os principais concentrados (VILELA et al., 2012). Dados do IBGE permitem observar uma redução do consumo de tomate *in natura* e massa de tomate acompanhada do aumento da aquisição de molhos de tomate entre os anos de 2002 e 2008 (IBGE, 2010).

Tabela 4. Empresas de processamento de tomate instaladas em Goiás

EMPRESAS	MUNICÍPIO	PRINCIPAIS MARCAS
Cargill Foods Brazil	Goiânia	Pomodoro, Tarantela, Pomarola, Elefante
Goialli Alimentos S/A	Goianésia	Goialli
Goiás Verde Alimentos	Luziania	Goiás Verde, Bonare e Tomadoro
Bunge Brasil - Alimentos	Rio Verde	Primor
Ângelo Auricchio e Cia Ltda	Morrinhos	Olé
CISAL – Industria Sul Americana de Alimentos Ltda	Morrinhos	Minha Quinta
Dez Indústria e Comércio de Conservas Alimentícias Ltda	Morrinhos	Predilecta, Dez ⁺
HEINZ/Coniexpress	Nerópolis	Quero e HEINZ
ABC Indústria de Alimentos	Turvânia	Natu, Da Gente
LF de Castro	Vianápolis	Bonamassa e Bonadelli
Fugini alimentos Ltda	Cristalina	Fugini

Fonte: Adaptada de Vilela et al. (2012).

2.3.1 Composição do tomate e derivados

O tomate apresenta um elevado teor de água (95,1%), sendo um vegetal de baixa densidade energética. Os derivados industriais do tomate apresentam diferentes composições, resultantes de variações do teor de água, adição de ingredientes e técnicas de processamento. Na Tabela 5 é apresentado o valor nutritivo, a composição do tomate e seus principais derivados de acordo com os dados da Tabela Brasileira de Composição de alimentos - TACO (NEPA/UNICAMP, 2011).

Tabela 5. Valor nutritivo do tomate *in natura* e seus derivados em 100 g

Composição	Tomate <i>in natura</i> , com sementes	Extrato	Molho industrializado	Purê
Energia (kcal)	15	61	38	28
Teor de água (g)	95,1	79,7	88,1	90,8
Proteínas (g)	1,1	2,4	1,4	1,4
Lipídios (g)	0,2	0,2	0,9	-
Carboidratos (g)	3,1	15,0	7,7	6,9
Fibra alimentar (g)	1,2	2,8	3,1	1,0
Cinzas (g)	0,5	2,8	1,9	1,0

Fonte: TACO (NEPA/UNICAMP, 2011).

2.4 DERIVADOS INDUSTRIAIS

Os derivados industriais, também conhecidos como atomatados, com maior demanda de mercado são o extrato, a polpa, o molho e o catchup (DANTAS, 2008). No Brasil, os dois principais derivados do tomate são o extrato concentrado e os molhos prontos, ambos obtidos a partir do tomate triturado. Tais produtos se diferenciam quanto ao teor de sólidos solúveis (°Brix), sabor, acidez, cor, espessura do pericarpo e quanto à facilidade de remoção da pele (MELO; VILELA, 2005). Nos anos de 2007 a 2010 ocorreu um aumento das vendas de catchup em 42%, molhos de tomate em 34% e extrato de tomate em 1,5% e uma redução de 21% nas vendas de polpa de tomate (SOARES; RANGEL, 2012).

O processamento industrial compreende, de forma resumida, as seguintes etapas: recebimento, lavagem, seleção, trituração, tratamento térmico, despulpamento e refinamento, evaporação, pasteurização, envasamento (galões ou latas) e resfriamento. Os derivados são elaborados a partir da polpa concentrada armazenada em latas ou tambores (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2011). Estima-se que em 2005 cerca de 250 mil toneladas de atomatados tenham sido comercializadas no Brasil, constituindo o 12º produto mais vendido entre todos os comercializados na rede de supermercados varejistas de acordo com a Associação Brasileira da Indústria Alimentícia (GAMEIRO et al., 2007).

2.4.1 Concentrado de tomate

Atualmente, no Brasil, os derivados de tomate não dispõem de uma legislação específica. A Resolução RDC nº 272 (BRASIL, 2005b) define concentrado de tomate como o produto obtido da polpa de frutos do tomateiro, devendo conter, no mínimo 6% de sólidos solúveis totais naturais de tomate, podendo ser adicionado de sal e, ou açúcar.

2.4.2 Extrato de tomate

É o produto elaborado a partir da polpa adicionada de açúcar (1%) e sal (5%). Na sua fabricação são utilizados tomates firmes, em ponto de maturação adequado e livres de materiais estranhos. O extrato pode ser concentrado conforme especificação da Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 1978), que embora tenha sido revogada pela RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005b), continua a ser utilizada como padrão. O extrato de tomate pode ser classificado de acordo com a sua concentração em:

- Purê: substância seca, menos cloreto de sódio, mínimo 9% p/p;
- Extrato simples concentrado: substância seca, menos cloreto de sódio, mínimo 18% p/p;
- Extrato duplo concentrado: substância seca, menos cloreto de sódio, mínimo 25% p/p;
- Extrato de tomate triplo concentrado: substância seca, menos cloreto de sódio, mínimo 35% p/p.

2.4.3 Molho de tomate

A legislação brasileira define molhos de uma forma geral como “os produtos em forma líquida, pastosa, emulsão ou suspensão à base de especiaria(s) e ou tempero(s) e ou outro(s) ingrediente(s), fermentados ou não, utilizados para preparar e ou agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas” (BRASIL, 2005b). O molho é um dos derivados de tomate de maior praticidade, pois já vem pronto para uso, apresentando temperos e sabores variados, podendo apresentar em sua composição condimentos como manjeriço, salsa e cebola, ervas finas, azeitonas, entre outras (CUNHA, 2006).

2.4.4 Catchup

O catchup é um molho utilizado como acompanhamento para sanduíches e pratos prontos, à base de tomate, temperado com sal, açúcar, vinagre e outros condimentos e especiarias (CUNHA, 2006). De acordo com a legislação brasileira define-se por catchup “o produto elaborado a partir da polpa de frutos maduros do tomateiro, podendo ser adicionado de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto” (BRASIL, 2005c). Segundo a mesma resolução, ambas as designações ketchup e catchup podem ser utilizadas para denominar o produto. Para a produção do catchup é utilizado em média 70% de polpa de tomate.

2.4.5 Polpa de tomate

O produto comercial polpa de tomate é também conhecida como purê, sendo produzida a partir de tomates sem sementes e sem pele. Em função de sua versatilidade é utilizada em preparos culinários que levam outros ingredientes e também como base para molhos e refogados, permitindo que o consumidor acrescente outros ingredientes e especiarias de sua preferência (CUNHA, 2006). A polpa pode ser estocada em várias concentrações (de 18 até 33 °Brix), porém a mais comum é 22-26 °Brix. O valor de sólidos solúveis depende da decisão de cada indústria, pois é função da linha de produtos da mesma (FRANÇA, 2007).

2.5 QUALIDADE

Doenças, pragas e estresses abióticos são as principais causas do baixo rendimento e depreciação da qualidade da matéria-prima em cultivos de tomate. O uso de agroquímicos para o controle de pragas e doenças pode proporcionar contaminações que podem representar riscos à saúde humana bem como prejuízos ao ecossistema. A qualidade da matéria-prima é fundamental na determinação da qualidade do produto final. A utilização de matérias-primas de baixa qualidade no processamento industrial pode proporcionar uma redução na relação matéria-prima/massa processada, observado como resultado final a presença de fungos na polpa concentrada, extratos e outros derivados (MELO; VILELA, 2005).

2.5.1 Doenças comuns no cultivo do tomate industrial

Mais de duzentas doenças acometem o tomateiro e podem ser de diversas origens, sendo os principais agentes etiológicos as bactérias, fungos, vírus e nematoides. As doenças chamadas de “não transmissíveis” são caracterizadas por distúrbios fisiológicos resultantes da exposição da cultura a condições não favoráveis, como excesso ou escassez de nutrientes, falta de luminosidade, agrotóxicos entre outros fatores (SILVA; GIORDANO, 2000).

As doenças podem causar grande redução na produtividade e na qualidade do produto final. A identificação precoce e a prevenção dependem do conhecimento da etiologia, da sintomatologia e dos métodos gerais de controle. Neste aspecto, as vistorias frequentes da lavoura são consideradas medidas úteis para identificar anomalias como crescimento deficiente, murcha, manchas, mofos etc (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2011).

2.5.2 Fungos

Os frutos do tomateiro estão sujeitos a contaminações por microrganismos, principalmente quando sofrem injúrias e danos em seus tecidos. No campo, durante e após a colheita, no processamento, transporte e armazenagem pode ocorrer contaminação por fungos. Os fungos são as principais causas de perdas em lavouras de tomate, sendo que nos Estados Unidos da América (EUA) os mais encontrados são: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, e *Stemphylium* (MARIUTTI; SOARES, 2009). No Brasil, os principais fungos incluem *Alternaria*, *Phytophthora*, *Septoria*, *Stemphylium* e *Fusarium* (REIS; LOPES, 2012). Contaminações microbiológicas podem causar consideráveis perdas econômicas ao produtor e à indústria, além do risco potencial à saúde humana e animal, uma vez que pode estar associada com a produção de micotoxinas, que são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos (FREITAS-SILVA et al., 2005).

O tomate é alvo de ataques por um grande número de fungos tanto durante o cultivo quanto na fase pós-colheita (LOPES; REIS; BOITEUX, 2005). Os principais gêneros que ocorrem em frutos de tomate e seus derivados são *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Rhizopus* e *Stemphylium* (HENZ; LOPES, 2005), sendo vários desses conhecidos produtores

de micotoxinas. O tempo transcorrido entre a colheita e o processamento do tomate é geralmente curto, porém suficiente para o desenvolvimento de patógenos pós-colheita. Os danos mecânicos tais como cortes e ferimentos, aliados ao transporte a granel em caminhões e o amassamento dos frutos podem ser listados como os principais fatores relacionados às perdas pós-colheita. Além disso, as elevadas temperaturas em Goiás durante o período da colheita favorecem a rápida proliferação de fungos. Outro fator importante é o grau de maturação, pois frutos destinados ao processamento devem estar bem maduros, fator relacionado à redução da resistência mecânica. Nessas situações, além da presença eventual dos patógenos originários do campo, pode também ocorrer uma rápida proliferação de fungos oportunistas como *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Algumas espécies de *Penicillium* e *Alternaria*, além do prejuízo direto causado aos frutos, podem comprometer seriamente os produtos processados devido à produção de toxinas (MORETTI; CALBO; HENZ, 2000; HENZ; LOPES, 2005).

A infecção de tomates por *Alternaria* é favorecida pela umidade durante os períodos chuvosos e temperaturas inferiores a 15 °C (CARRILLO, 2003). A contaminação por *Alternaria alternata* está relacionada à injúria ou à fragilidade do tecido vegetal. A presença de água e danos ocasionados pela chuva, orvalho, excesso de irrigação permitem a germinação de esporos na superfície do fruto. O fungo consegue penetrar através da pele do tomate por meio de rachaduras de crescimento, injúrias provocadas por insetos e, durante a colheita, pela cicatriz do cálice. Em pesquisa com 28 amostras infectadas com bolor negro na Argentina, *A. alternata* foi o fungo mais frequente, sendo que todas as linhagens de *Alternaria* identificadas foram capazes de produzir as micotoxinas alternariol monometil éter (AME), alternariol (AOH) e ácido tenuazônico (TeA) à temperatura de 25 °C (POSE et al., 2004). Medidas de controle do crescimento e da produção de micotoxinas por *A. alternata*, após a colheita, incluem a manutenção da temperatura abaixo de 7 °C e armazenamento não superior a 10 dias. Embora o consumo direto de tomates contaminados por *A. alternata* seja improvável, seu uso para processamento é uma realidade (BARKAI-GOLAN, 2008).

A contaminação por *A. alternata* e outros fungos pode ser controlada tomando-se algumas medidas de controle como: colher e transportar cuidadosamente os frutos; evitar ao máximo os danos mecânicos que servem de porta de entrada a estes patógenos; eliminar os frutos com lesões no processo de seleção; lavar os frutos com água limpa adicionando cloro ou outro produto sanificante e processá-los o mais rápido possível (KORSTEN; WEHNER,

2003). Recomenda-se para a redução da velocidade de proliferação desses microrganismos o armazenamento dos frutos em câmara fria, respeitando a faixa de temperatura de 10 °C a 12°C. Essa medida muitas vezes é muito complicada e até mesmo inviável, levando em consideração o enorme volume de tomate a ser processado pela indústria (MORETTI; CALBO; HENZ, 2000).

Durante o armazenamento, os fatores mais importantes que levam ao desenvolvimento de doenças são a temperatura, a umidade ambiente e a composição de gases. Destas três, provavelmente a temperatura tenha maior impacto por afetar a evaporação e a fisiologia do hospedeiro e do patógeno. Para muitas hortaliças, o armazenamento a baixas temperaturas é o caminho mais efetivo e prático para retardar o desenvolvimento fúngico. Entretanto, tomates sem qualquer dano podem também tornar-se susceptíveis a infecções quando armazenados a baixa temperatura, em particular se o fruto estiver contaminado com espécies de *Fusarium* (KORSTEN; WEHNER, 2003).

Até 1970, não havia relato de nenhuma doença em seres humanos associada à ingestão de produtos preparados com tomates infectados. Entretanto, alguns autores sugeriram que o crescimento microbiológico nesses produtos poderia ocorrer após o envase, podendo criar condições ótimas de pH que permitiriam o crescimento e produção de toxina pelo *Clostridium botulinum*. Posteriormente, nos Estados Unidos, alguns pesquisadores detectaram níveis considerados elevados de contaminação por fungos termorresistentes em tomate fresco não lavado, alcançando 12 esporos/kg. Em contra partida, em amostras com controle de pH (pH = 4,3), foi observada uma contaminação de 1 esporo/kg, significando um baixo nível de contaminação (SPOTTI; QUINTARALLA; MUTTI, 1992).

Embora as frutas e seus produtos processados sejam os mais suscetíveis a fungos termorresistentes, existem relatos de que hortaliças e suas conservas também podem sofrer deterioração por estes micro-organismos (KAWASHIMA; SOARES; MASSAGUER, 2002). No Brasil, a partir da década de 1990 observou-se a contaminação eventual por fungos nos principais derivados de tomate, embora estivessem envasados assepticamente em embalagens cartonadas. Como as circunstâncias e condições foram diversas, a identificação do problema não pôde ser esclarecida. Desta forma, este fato não deve ser confundido com o aparecimento de colônias de fungos durante o armazenamento do produto em refrigerador doméstico, visto que outras condições devem ser avaliadas e mais pesquisas são necessárias para a adequada identificação do problema (BAGLIONI, 1998).

2.5.2.1 Fungos micotoxinogênicos

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que possuem efeitos tóxicos, carcinogênicos e teratogênicos, tanto em animais quanto em humanos via consumo de alimentos contaminados. Entre as micotoxinas de maior importância à saúde pública e à economia agrícola destacam-se a aflatoxina, a ocratoxina, os tricotecenos e as fumonisinas (CAVALIERE et al., 2007; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Vários fatores determinam a produção de micotoxinas, não estando necessariamente associadas ao crescimento do fungo. Entre as espécies, o potencial micotoxinogênico depende, basicamente, da linhagem do fungo, porém a composição físico-química da matriz e os fatores ambientais também são de grande importância (DRUSCH; RAGAB, 2003).

Quanto às características químicas, as micotoxinas são normalmente lipofílicas, exceto as fumonisinas B, tendendo a se acumular na fração lipídica de plantas e animais. Em geral, a classificação das micotoxinas é baseada na espécie do fungo, estrutura e/ou modo de ação, sendo que uma única espécie de fungo pode produzir mais de uma micotoxina e que diferentes espécies de fungos podem produzir a mesma micotoxina (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Segundo a última estimativa da FAO, realizada em 2001, cerca de 25% das colheitas de alimentos no mundo estão contaminadas por micotoxinas (CIRILLO et al., 2003).

Durante o processamento, a pasteurização pode ativar esporos dormentes com posterior germinação e crescimento dos fungos termorresistentes, ocasionando a deterioração do produto final. Nos alimentos processados, a destruição de micotoxinas por processos convencionais é muito difícil porque essas substâncias são muito resistentes. Tradicionalmente, o controle da contaminação por micotoxinas em alimentos tem sido feito pelo controle da atividade de água, pH e qualidade da matéria-prima. Novas frentes de controle estão emergindo, inclusive a inclusão de controles para micotoxinas em planos de análise de perigos e pontos críticos de controle em produtos processados (MURPHY et al., 2006).

2.5.2.2 *Alternaria*

É um gênero dictiospórico da família *Demateaceae*, ordem *Hyphomycetes*, tendo como espécie a *Alternaria alternata*, caracterizada pela produção de conídios grandes,

pluricelulares com septos transversais e longitudinais (FREITAS-SILVA et al., 2005). O gênero *Alternaria* é amplamente distribuído no mundo. É proveniente do solo e, em sua maioria são patógenos que danificam plantas no campo e/ou ocasionam danos no período pós-colheita, considerado o principal patógeno de tomates frescos. Espécies de *Alternaria* estão presentes na matéria orgânica morta. Os seus esporos são dispersos pelo ar e são considerados como sendo os mais importantes fatores aero-alergênicos. Espécies de *Alternaria* causam inúmeras doenças em diversas culturas, além de apresentar alta capacidade produtora de micotoxinas, que contaminam tanto os alimentos *in natura* quanto seus derivados. São conhecidas 71 micotoxinas e fitotoxinas produzidas por esse gênero. O fungo se adapta a baixas temperaturas, estando associado à perda de hortaliças e frutas armazenadas sob refrigeração. Em função de ampla ocorrência e grande diversidade, o gênero *Alternaria* é considerado um perigo comparável a de outros fungos largamente estudados como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os esporos de *Alternaria* sobrevivem facilmente por até um ano e os conídios nas superfícies são viáveis por muitos anos (FREITAS-SILVA et al., 2005; POSE et al., 2004; STINSON et al., 1980).

A espécie *A. alternata* caracteriza-se apresentar conídios com septos transversais e longitudinais, conhecidos como dictiosporas e que nascem por brotação apical de um conídio ou do esporo anterior. As colônias são escuras de tamanho uniforme, com 56 a 63 mm de diâmetro, quando mantidas a 27 °C por uma semana. Seu micélio aéreo é cinza-esverdeado com a parte posterior preta. (Figuras 3 e 4). A esporulação do gênero *Alternaria* ocorre à temperatura ótima de 27 °C, porém tolera extremos de 0 °C a 35 °C. São fungos que exigem elevada atividade de água (0,88 a 1,00), pH na faixa de 4,0 a 5,4 e toleram atmosferas com 2,8% a 15% de CO₂ e 0,25% (v/v) em N₂ (PITT; HOCKING, 2009; CARRILLO, 2003).



Figura 3. Conídios de *A. alternata* (CARRILLO, 2003).

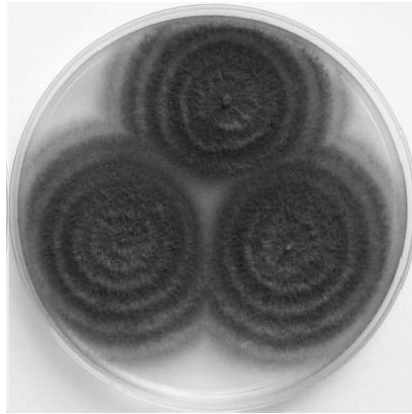


Figura 4. Colônia de *A. alternata* em meio ágar dicloran cloranfenicol extrato de malte (PITT; HOCKING, 2009).

Em função da sua capacidade produtora de diferentes micotoxinas, *A. alternata* tem despertado grande interesse na área de micologia. As principais micotoxinas produzidas por essa espécie são: AOH, AME, alterotoxina I (ATX), altenueno (ALT) e ácido tenuazônico (TeA). Culturas de milho contaminadas por *A. alternata* foram carcinogênicas para ratos e extratos de outras culturas foram mutagênicos em várias análises *in vitro* (SCOTT, 2004). Estudos com linhagens de *A. alternata* isoladas de frutos de tomate e inoculadas em meios sintéticos à base de tomate demonstram que a produção de micotoxinas ocorre em diferentes faixas de atividade de água e temperatura, sendo que para AOH as condições ótimas foram a_w de 0,954 após 28 dias de incubação a 21 °C, para AME a a_w foi a mesma, porém à temperatura de 35 °C, enquanto para TeA uma maior a_w (0,982) foi necessária à mesma temperatura. À temperatura de 6 °C a 15 °C nenhum crescimento ou germinação foi registrado em 21 dias (POSE et al., 2010).

Várias espécies de *Alternaria* (incluindo *A. citri*, *A. alternata*, *A. solani* e *A. tenuissima*) produzem substâncias tóxicas comumente encontradas em laranjas, maçãs, tomates, grãos e outros alimentos. Espécies de *Alternaria* invadem o tecido do tomate; hortaliça de textura macia e altamente suscetível à invasão fúngica, em condições de campo e também durante as etapas de armazenamento, transporte e processamento, podendo causar uma das podridões mais frequentes nessa hortaliça. *Alternaria* também pode desenvolver-se em ferimentos causados por injúrias mecânicas nos frutos de tomate, além de lesões,

queimaduras, “fundo preto” e cicatrizes de crescimento. É também responsável pela presença de micotoxinas em produtos processados (LOPES; SANTOS, 1994; POSE et al., 2010).

2.5.2.2.1 Micotoxinas produzidas por *Alternaria*

As micotoxinas AME e AOH (Figura 5) são classificadas como dibenzopirenos e são normalmente encontradas em conjunto e apresentam efeito teratogênico em ratos. A produção dessas micotoxinas tem sido relatada em tomates, frutas cítricas, pimentas, melões, grãos, maçãs e azeitonas. A produção máxima de AME e AOH ocorre a 25 °C e atividade de água de 0,98 (PITT; HOCKING, 2009). Quanto às características químicas e físicas, AME é solúvel em clorofórmio e etanol e insolúvel em benzeno e hexano, enquanto AOH é solúvel em metanol e clorofórmio e insolúvel em hexano e benzeno.

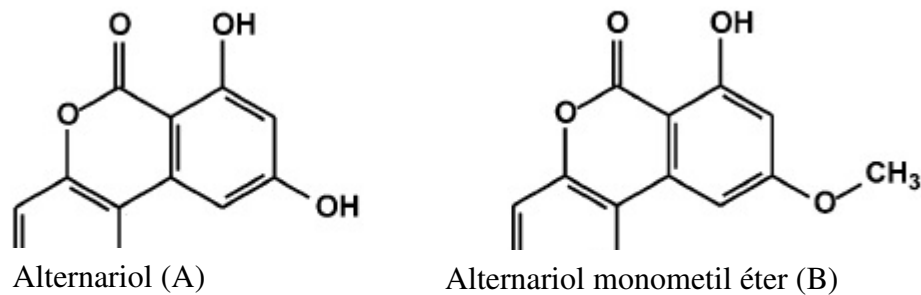


Figura 5. Estrutura química de alternariol (A) e alternariol monometil éter (B). Fonte: Magnani, Souza e Rodrigues-Filho (2005).

Além das cepas de *A. alternata*; os fungos *A. dauci*, *A. solani* e *A. tenuis* também produzem AOH. Essa micotoxina é de ocorrência natural em azeitonas, frutos de girassol, pimenta, tomate, tangerina, maçã, sorgo, trigo, centeio, aveia e cevada. Já AME é produzida por *A. alternata*, *A. dauci* e *A. cucumerina* e de ocorrência natural nos mesmos alimentos que AOH (FREITAS-SILVA et al., 2005). Rosett et al. (1957) observaram que AME e AOH correspondem a cerca de 13% do peso seco do micélio de uma cepa de *Alternaria tenuis*. Relatos na literatura confirmaram a ocorrência dessas duas micotoxinas em diferentes tipos de vegetais, tais como folhas de melão do tipo cantalupe e melancia, grãos de sorgo (SEITZ et al., 1975), noz-pecã (SCHROEDER; COLE, 1977), tomate, maçã, laranja, limão e sementes

de colza (ROBIGLIO; LOPEZ, 1995; VIÑAS; BONET; SANCHIS, 1992), além de azeitonas, tangerinas, melões, pimentas e framboesas, e também em grãos, sementes de girassol e nozes (SCOTT, 2001).

As alterotoxinas I, II e III são as mais mutagênicas e tóxicas em doses agudas para ratos do que AME e AOH, embora sua ocorrência seja menor (SCOTT, 2004). O ácido tenuazônico é tóxico para uma grande variedade de plantas e animais, principalmente ratos. A produção máxima de TeA ocorre a 25°C e atividade de água de 0,90 (PITT; HOCKING, 2009).

De 2000 a 2004 a União Europeia desenvolveu o projeto “*Safe organic vegetables and vegetable products by reducing risk factors and sources of fungal contaminants throughout the production chain: the carrot – Alternaria model*” com o objetivo de desenvolver estratégias para o fornecimento de alimentos orgânicos seguros por meio do desenvolvimento de métodos de detecção, identificação das micotoxinas de *Alternaria* na cadeia de produção, determinar os pontos críticos de controle e desenvolver medidas preventivas. Como resultados desse projeto pode-se destacar o desenvolvimento de métodos de detecção de *Alternaria* em cenoura, a compreensão do mecanismo básico de produção de micotoxinas por *Alternaria* e o monitoramento do acúmulo de micotoxinas na cadeia produtiva (SOLFRIZZO et al., 2004).

2.5.3 Micotoxinas em derivados de tomate

Estudos que avaliaram a ocorrência de micotoxinas em derivados de tomate são escassos na literatura. Mariutti e Soares (2009) avaliaram a presença de aflatoxinas em 63 produtos (polpa, pasta, catchup, tomate desidratado e tomate seco conservado em óleo) de quatro estados brasileiros e não detectaram nenhum tipo de aflatoxina nas amostras avaliadas. Eles concluíram que os produtos disponíveis no Brasil não apresentavam risco à saúde humana, seja pela ausência de fungos toxigênicos ou por falta de condições para produção das toxinas. TeA foi encontrado em derivados de tomate nas concentrações de 178 ng/g. Ácido ciclopiazônico, uma micotoxina produzida por alguns fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foi identificada em derivados de tomate (MOTTA; SOARES, 2001).

Terminiello et al. (2006) avaliaram 80 amostras de polpa de tomate comercializadas na Argentina, nas quais a presença de TeA foi identificada em 23 amostras, AME em 21 amostras e AOH em cinco amostras. Sendo que a ocorrência de duas ou mais micotoxinas em

uma mesma amostra ocorreu em dez amostras. No Brasil, Motta e Soares (2001) avaliaram 80 amostras de derivados de tomate de um total de 11 marcas vendidas em todo o país. TeA foi encontrada em sete amostras de polpa e quatro amostras de molho, sendo que AME e AOH não foram detectados nas amostras. Assim, dados referentes à contaminação natural de derivados de tomate por micotoxinas produzidas por *A. alternata* e *Fusarium* são escassos na literatura.

Alternaria foi capaz de produzir todas as cinco micotoxinas (alternariol, alternariol monometil éter, altueno, ácido tenuazônico e altertoxina-I) na concentração de 137 mg/100g em tomates incubados por 21 dias a 21 °C. Em outro estudo, o TeA foi a principal toxina produzida em tomates, em níveis de 13,9 mg/100g (JAY, 2000). Existem relatos anteriores referentes à presença de TeA em pasta de tomate, além da presença de pequenas quantidades de AOH, AME e ALT em tomates adquiridos comercialmente (FRANK, 1987; SCOTT; KANHERE, 1980). Em estudos preliminares realizados *in vitro* com 20 isolados de *Alternaria* sp originários de frutos de tomate, constatou-se que dez isolados produziram as micotoxinas alternariol, alternariol monometil éter e altueno (FREITAS-SILVA et al., 2001).

2.6 EFEITOS TÓXICOS DA INGESTÃO CRÔNICA DE MICOTOXINAS

As micotoxicoses são doenças causadas pela ingestão de alimentos ou rações contaminados com micotoxinas ou pela inalação destas em forma de partículas suspensas. Data de 1960 o episódio mais conhecido de micotoxicose ocorrido na Inglaterra, como resultado da ingestão de torta de amendoim importada do Brasil, da qual um extrato obtido em clorofórmio e administrado a marrecos jovens foi capaz de reproduzir lesões hepáticas semelhantes à doença original. A micotoxina em questão foi denominada como “*A. flavus toxin*” ou aflatoxina (POZZI et al., 2002). As micotoxicoses são doenças que se apresentam de forma isolada, não sendo contagiosas, nem infecciosas. O tratamento não responde a terapia convencional com drogas e antibióticos. A micotoxicose causada pela ingestão direta de vegetais contaminados é denominada “micotoxicose primária”, enquanto a causada pelo consumo de carne ou leite proveniente de animais que consumiram alimentos contaminados é denominada “micotoxicose secundária” (FREITAS-SILVA et al., 2005).

As micotoxinas podem apresentar toxicidade aguda, subaguda ou crônica em humanos e/ou animais, além de apresentarem potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico (DRUSCH; RAGAB, 2003). A toxicidade da micotoxina, a extensão da exposição, o estado nutricional e os efeitos sinérgicos com outros agentes químicos ou biológicos são fatores que influenciam a severidade das micotoxicoses em humanos e animais (BENNETT; KLICH, 2003). O diagnóstico da micotoxicose é possível com a utilização de biomarcadores que avaliam a relação dose/resposta entre a micotoxina e os efeitos tóxicos (BANDO et al., 2007).

A contaminação de alimentos com *Alternaria alternata* foi considerada um dos fatores etiológicos responsáveis pela alta incidência de câncer do esôfago na província de Linxian na China. Das micotoxinas isoladas de *A. alternata*, a alterotoxina I é a mais tóxica, sendo que AME e AOH não apresentam elevada toxicidade, enquanto o ácido tenuazônico apresenta uma toxicidade aguda e subaguda em várias espécies de animais (SCOTT, 2001). AOH, AME e ALT são metabolitos também produzidos por *A. alternata*. Embora seu efeito tóxico agudo seja baixo, AME e AOH são mutagênicos e relatos disponíveis na literatura evidenciam sua ação mutagênica em células de mamíferos. Um potencial efeito estrogênico foi atribuído a AOH, em função do seu potencial inibitório da proliferação celular e seu efeito genotóxico em cultura de células de mamíferos (LEHMANN; WAGNER; METXLER, 2006). Cultura de milho contaminada por *A. alternata* mostrou-se carcinogênica para ratos e extratos de outras espécies apresentaram mutagenicidade em várias análises *in vitro*. Em ratos foram observados danos no fígado e rins após 28 dias da administração de um extrato contaminado com *A. alternata*. A ocorrência de baixos níveis de AOH em frutas processadas, atomatados, suco de uva, vinho tinto é importante para a saúde pública. AME também foi detectada em sucos de maçã e néctar de ameixa. Níveis de 5300 ng/g de AOH e 139 000 ng/g de TeA foram relatados em tomates (BARKAI-GOLAN, 2008; LAU et al., 2003; SCOTT, 2001).

A produção de AOH foi capaz de suprimir o crescimento de *Staphylococcus aureus* na concentração de 25 µg/mL e de *Escherichia coli* na concentração 50 µg/mL. Em ratas grávidas AOH foi teratogênica e fetotóxica quando foi inoculada uma dose de 100 µg/kg. Quando AOH está em associação com AME se observa um efeito teratogênico/fetotóxico. AME apresenta atividade citotóxica em células bacterianas e de mamíferos, além de ser capaz de inibir *Bacillus mycoides* a uma dose de 500 µg/kg. Essa micotoxina possui atividade mutagênica e quando associada à AOH, apresenta um efeito tóxico sinérgico (FREITAS-SILVA et al., 2005).

Embora a ocorrência de AOH e AME em produtos processados ocorra em baixas concentrações, é de grande importância a investigação dos riscos à saúde humana. O grande problema da presença de micotoxinas em derivados de tomate é sua termorresistência, sendo que AOH, AME e altertoxina I permaneceram estáveis quando submetidas a temperaturas de autoclavagem e também permaneceram estáveis em estudos com sucos de frutas e vinho armazenados por 20 dias ou submetidos a 80 °C por 20 min (LAWLEY, 2010). Embora o risco da ingestão crônica de micotoxinas seja um problema real, de acordo com *European Mycotoxins Awareness Network* (KUBO, 2012) até o ano de 2012 não existiam regulamentações específicas para nenhuma das micotoxinas produzidas por *Alternaria* em alimentos. No Brasil a legislação mais recente foi publicada em 2011 e estabelece limites máximos tolerados para aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona (BRASIL, 2011a).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a qualidade físico-química, microbiológica e a ocorrência de micotoxinas de *Alternaria alternata* em derivados de tomate e tomates frescos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as características físicas de diferentes marcas de extratos, polpas e catchups.
- Determinar a qualidade microbiológica de diferentes marcas de extratos, polpas e catchups comercializados no Brasil.
- Identificar a presença de resíduos microscópicos oriundos da matéria-prima em diferentes marcas de extratos, polpas e catchups.
- Quantificar as micotoxinas produzidas por *Alternaria alternata* – alternariol monometil éter (AME), alternariol (AOH) – em derivados de tomate de diferentes marcas e em tomates frescos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os frutos de tomate industrial foram obtidos em campos de produção das agroindústrias de processamento de tomates do Estado de Goiás e os derivados adquiridos no comércio local do Distrito Federal e transportados aos Laboratórios de Fitopatologia e de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para as análises, foi adquirido um lote contendo 16 unidades experimentais de três marcas diferentes de extratos de tomate, polpa e catchup. As marcas foram escolhidas entre as mais populares no mercado nacional e entre aquelas que possuíam as mesmas linhas de produtos. Foram selecionados nove tratamentos em um esquema fatorial 3×3 [(três derivados de tomate (extrato de tomate, polpa e catchup) e três marcas diferentes (codificadas como A, B e C)]. Para o catchup em sachê, 92 unidades de 9 g da marca C. A unidade experimental foi composta por 16 embalagens de 350 g de extrato de tomate, 520 g de polpa e 400 g de catchup. O catchup em sachê encontrado foi apenas da marca C (92 sachês de 9 g).

As 16 unidades de cada produto (exceto o catchup em sachê) foram enumeradas de 1 a 16 e sorteadas quatro unidades para compor quatro blocos. Cada bloco foi homogeneizado e armazenado em recipientes de vidro de 200 g previamente esterilizados. Seis lotes com sete frutos de tomate industrial cada, comprovadamente infectados com *A. alternata*, foram analisados quanto à presença das micotoxinas AME e AOH. Os dados das análises físicas, químicas e microscópicas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa *Statistica* versão Demo (STATSOFT, 2007).

4.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE DERIVADOS DE TOMATE

4.3.1 Extrato seco e teor de água

O extrato seco total e o teor de umidade foram estimados por aquecimento direto em estufa com circulação forçada de ar a 75 °C, até a obtenção do peso constante de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

4.3.2 Acidez titulável e pH

A acidez titulável foi determinada por meio de titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L (IAL, 2005). Para as análises de acidez titulável e pH foi utilizado o titulador automático TitroLine® easy, marca SI Analytics. Para calcular a acidez titulável, foi considerado o respectivo ácido predominante na amostra: ácido acético (para o catchup) e ácido cítrico (para o extrato e a polpa), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{V \times F \times M \times PM}{10 \times P \times n}$$

Em que:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação em mL

F = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

PM = peso molecular do ácido correspondente em g (Ácido acético: 60 e ácido cítrico: 192)

P = massa da amostra em g

n = número de hidrogênios ionizáveis (Ácido acético: 1 e ácido cítrico: 3)

4.3.3 Sólidos solúveis totais

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) foi determinado nos derivados de tomate à temperatura de 25 °C com auxílio de um refratômetro digital de bancada marca Atago PAL-1, previamente calibrado com água destilada (IAL, 2005).

4.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Inclui um conjunto de técnicas utilizadas para medir a qualidade dos alimentos e identificar os elementos histológicos característicos, de acordo com a lista de ingredientes do rótulo, bem como, pesquisar a presença de matérias estranhas. A pesquisa de matérias estranhas verifica a qualidade da matéria-prima, bem como permite concluir a cerca das condições higiênico-sanitárias utilizadas no processamento e armazenamento dos alimentos (DAROS et al., 2010).

4.4.1 Análise de matérias estranhas

As amostras foram analisadas quanto à presença de fragmentos de inseto, ácaros e pelos de roedores. As sujidades leves foram avaliadas utilizando-se 100 g de extrato e polpa e 200 g de catchup. As amostras foram homogeneizadas com 20 mL de óleo de rícino e adicionadas de água destilada a 70 °C, suficiente para preencher o frasco armadilha. A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos, com agitação ocasional. Após, o sobrenadante foi recolhido em béquer de 200 mL. Mais 200 mL de água aquecida foram adicionados ao frasco, procedendo-se à agitação e repouso por 10 minutos, após o qual o sobrenadante foi novamente recolhido para eliminar tecidos de tomate. O líquido obtido foi filtrado em papel filtro com 50 mL de heptano. O papel foi examinado em microscópio estereoscópico com aumento de 30x (BARBIERI et al., 2001). Na Figura 6 é apresentado o esquema da análise de matérias estranhas.

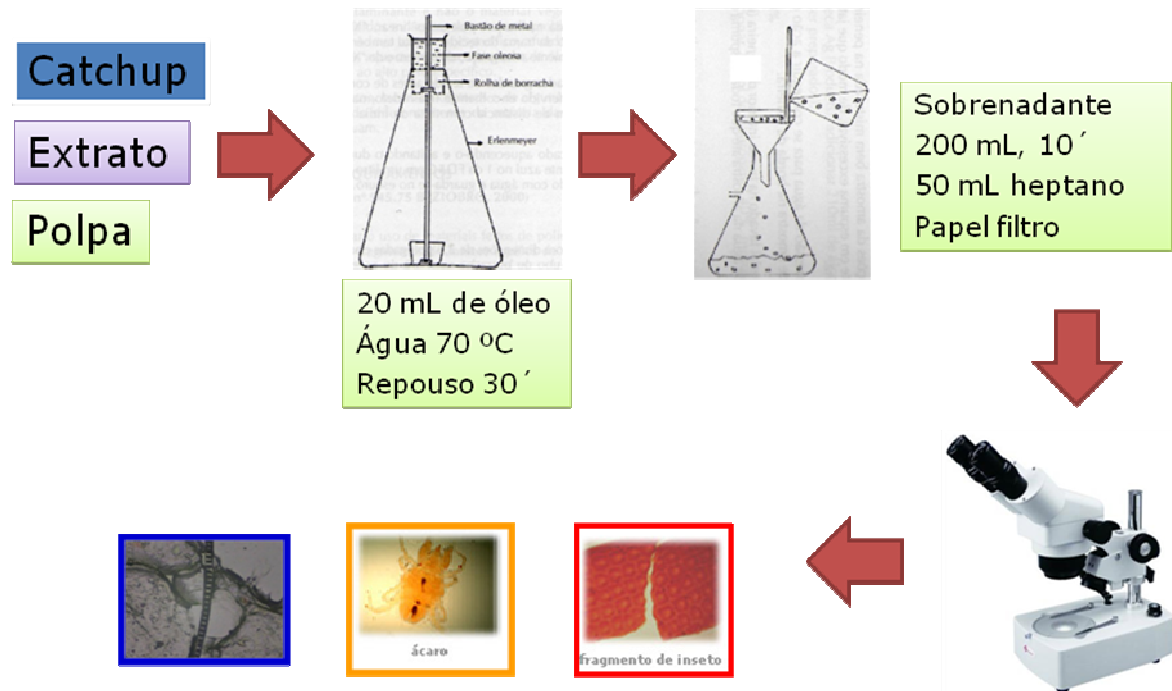


Figura 6. Esquema da análise de matérias estranhas em derivados de tomate

4.4.2 Contagem de Fungos pelo Método Howard

Para a contagem de filamentos foi adotado o método 16.17.01/984.29 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000). Quantidade suficiente da amostra foi espalhada sobre o disco da câmara para contagem de fungos Howard (Figura 7). A câmara foi posicionada em microscópio óptico e examinada com lente de ampliação de 90 a 125x para identificação dos filamentos de fungos. Para cada duplicata foram contados 75 campos (3 montagens com 25 campos cada uma) e o número de filamentos micelianos calculados pela equação: $N = (n^{\circ} \text{ de campos positivos} \times 100) / 75$. Na qual N = percentual de campos positivos para filamentos micelianos.

A Resolução CNNPA nº 12/1978 (BRASIL, 1978) estabelece o limite de 40% de campos positivos para filamentos micelianos em produtos de tomate. Esse parâmetro foi revogado pela Resolução RDC nº 175/2003 (BRASIL, 2003), que não considera a presença de filamentos micelianos como prejudicial à saúde humana. Porém, esse parâmetro ainda é adotado pelas indústrias de alimentos na avaliação da qualidade dos concentrados de tomate, por indicar a utilização de matéria-prima deteriorada e foi utilizado na avaliação dos

resultados da presente pesquisa. Outras organizações internacionais, como a Organização das Nações Unidas em seu Programa Mundial de Alimentos recomenda para a polpa de tomate um limite de no máximo 60% (WFP, 2011), já a União Europeia estabelece um limite de 70%, Estados Unidos 45% e Canadá 50% para os concentrados de tomate (FAO/WHO, 2011).



Figura 7. Câmara de Howard

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

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para as análises microbiológicas foram avaliadas três unidades de 200 g de cada produto por marca, totalizando 27 amostras, resultantes do esquema fatorial 3 x 3 (três marcas x três produtos). Para o catchup em sachê da marca C foi adquirido um lote com 92 sachês, dividido em quatro blocos com 23 sachês e feita a homogeneização. Cada bloco foi armazenado em recipientes de vidro de 200 g previamente esterilizados em autoclave. Para as análises microbiológicas foram avaliadas duas unidades de 200 g cada. Todas as amostras foram mantidas congeladas a -18 °C e transportadas em caixas térmicas até o local das análises.

As amostras foram levadas ao Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás e analisadas quanto aos níveis de contaminação por coliformes fecais (45 °C), estafilococos coagulase positiva e presença de *Salmonella* sp, segundo métodos descritos por Silva et al. (2010). Os padrões microbiológicos foram comparados com os definidos pela Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001).

4.5.1 Preparo das amostras e diluições

As análises foram realizadas em amostras de 25 g do concentrado de tomate de cada recipiente, pesada assepticamente e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1%, em homogeinizador (MARCONI MA 440/cf) por 1 minuto a 60 BPM (batidas por minuto). Diluições decimais apropriadas foram preparadas e alíquotas dessas diluições foram transferidas para meios específicos, para a determinação de cada grupo de microrganismos.

4.5.2 Determinação de Coliformes a 45 °C

A determinação de coliformes a 45 °C foi feita pela técnica do Número Mais Provável (NMP). Inoculou-se uma alçada de cada um dos tubos com caldo LST com resultados positivos, em tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC), seguindo-se incubação a $45 \pm 0,2$ °C por 24 a 48 h. O cálculo do número mais provável de coliformes fecais foi realizado com o auxílio da tabela de Hoskins. Os resultados foram expressos como NMP de coliformes presentes por grama do produto.

4.5.3 Determinação da presença de *Salmonella*

Após pré-enriquecimento com 225 mL de água peptonada 0,1%, e incubação a 35 °C por 24 h, 1 mL dessa suspensão foi transferido para 10 mL de caldo selenito-cistina, e Caldo Tetrionato (TT), incubado a 35 °C. Depois de 24 horas, foram realizadas semeaduras por esgotamento em placas de Petri contendo Ágar Bismuto Sulfito (BS) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). As colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos. Os resultados foram expressos em presença ou ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra.

4.5.4 Estafilococos coagulase positiva

A determinação de *Staphylococcus* foi realizada pelo método da contagem direta em placas. Usando-se as mesmas diluições utilizadas na análise de coliformes, foi inoculado 1 mL de cada diluição em três placas de Ágar Baird-Parker. As placas foram incubadas a 37°C/48h. Selecionou-se placas com 20 a 200 colônias, e contou-se as colônias típicas de

Staphylococcus (circulares pretas ou cinza escura, com 2-3 cm de diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, com massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca). Foram selecionadas duas colônias típicas de cada placa e inoculadas em ágar nutriente para posterior teste de coagulase.

Para o teste da coagulase, foram transferidos 3 mL de cada cultura obtida em BHI, para um tubo estéril em seguida adicionados 3 mL de Coagulase plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA). Foi realizada a mistura com movimentos de rotação, sem agitação dos tubos para não interferir na coagulação. Incubou-se a 35-37 °C e ao final de seis horas, observou-se se houve formação de coágulo firme (que não se rompe quando o tubo é virado para baixo). Os testes considerados coagulase positivos foram aqueles que ocorreram coagulação.

4.6 ANÁLISES DE MICOTOXINAS

4.6.1 Padrões

4.6.1.1 Preparo das soluções padrões

As soluções padrões foram elaboradas pesando-se os padrões das micotoxinas AME e AOH (Sigma) em balança analítica marca BEL Engineering modelo UMark 250 A (precisão 0,0001 g) e dissolvendo-se em metanol grau para cromatografia líquida de alta eficiência (Marca J. T. Baker). As concentrações das soluções padrão foram de 0,133 mg/mL para AME e 0,500 mg/mL para AOH.

4.6.1.2 Preparo das soluções de trabalho

A partir das soluções padrões foram preparadas as soluções de trabalho, por meio de diluições em metanol grau para cromatografia líquida de alta eficiência. As concentrações das soluções de trabalho variaram de 0,03 a 133 µg/mL para AME e 0,096 a 500 µg/mL para AOH. As soluções padrões foram armazenadas em frasco âmbar hermeticamente fechados a temperatura de -10 °C até o momento da utilização.

4.6.2 Curva padrão

As curvas padrão das micotoxinas foram elaboradas utilizando-se sete soluções metabólicas de concentrações variadas, por meio da injeção de cada um dos sete níveis e calculados as médias e os coeficientes de variação das áreas obtidas (WERNIMONT, 1985). A partir dos valores obtidos calculou-se a regressão linear e determinou-se $y = 99846x - 16883$ ($R^2 = 0,9991$) para AME e $y = 20763x$ ($R^2 = 0,997$) para AOH (Figuras 6 e 7). Para AOH a curva foi elaborada a partir de cinco diluições da solução padrão (excluindo-se dois pontos referentes à maior concentração – *outliers* – e forçando o zero) e para AME sete diluições da solução padrão.

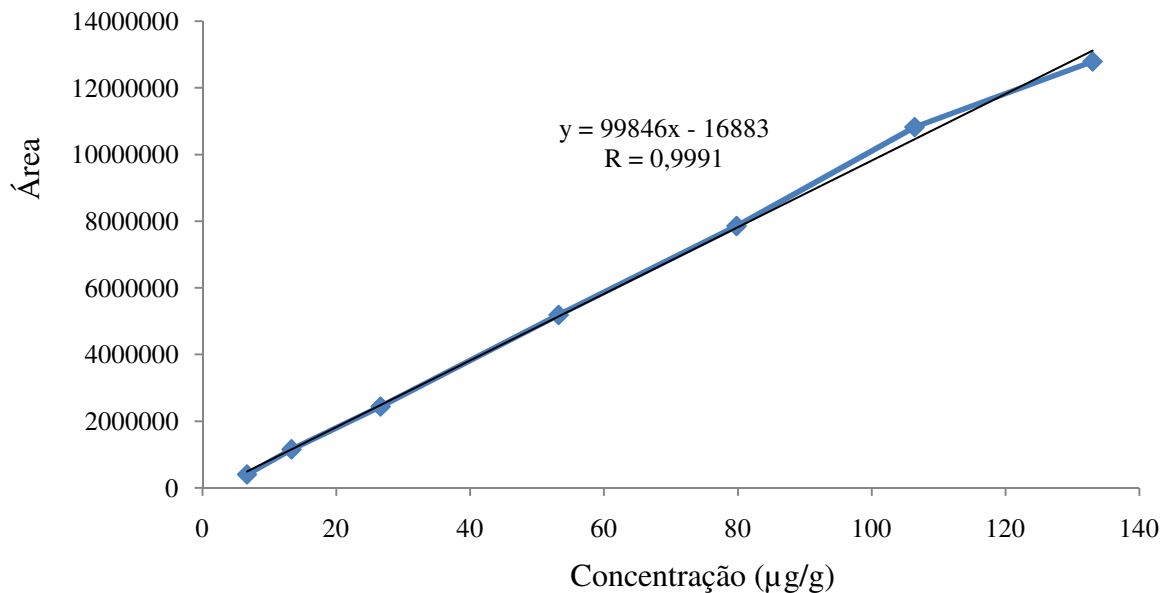


Figura 8. Curva padrão e regressão linear da micotoxina AME

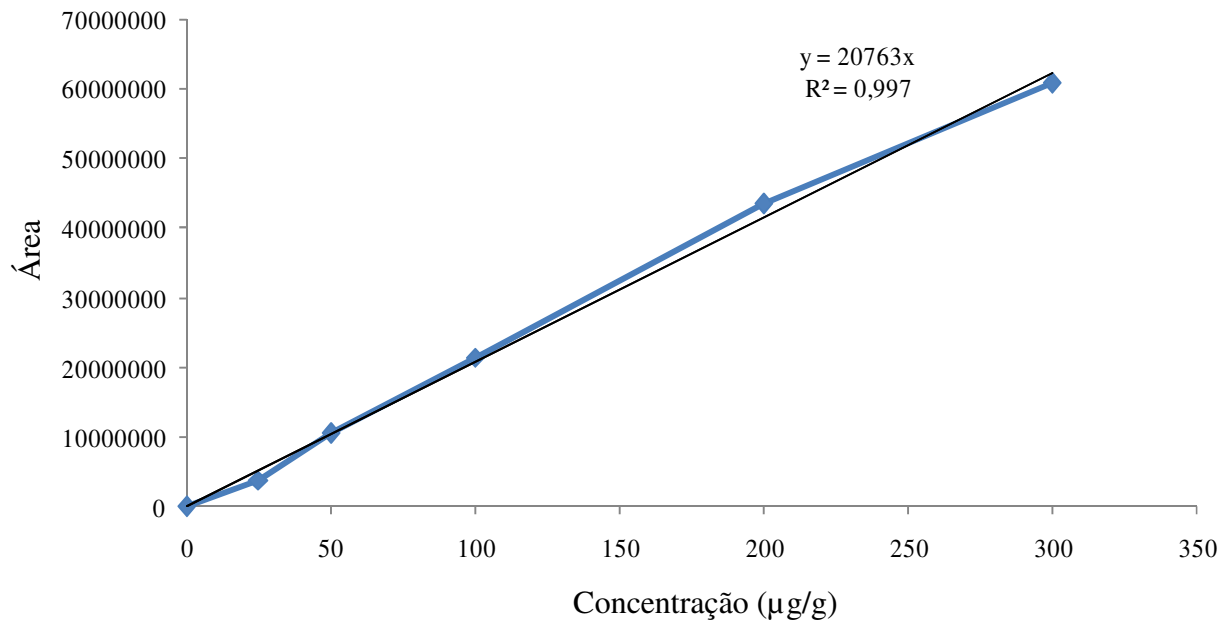


Figura 9. Curva padrão e regressão linear da micotoxina AOH

4.6.3 Aquisição das amostras de produtos de tomate

As amostras de produtos atomatados foram adquiridas no comércio local da cidade de Brasília-DF, sendo todas pertencentes ao mesmo lote de fabricação. As amostras foram mantidas em sua embalagem original a temperatura ambiente até o momento das análises. Os dados dos concentrados de tomate adquiridos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Concentrados de tomate adquiridos em Brasília-DF e utilizados nas análises

Produto	Marca	Número de amostras	Ingredientes especificados na embalagem	Validade
Catchup	A	16	Tomate, açúcar, vinagre, sal, amido modificado, cebola, alho, especiarias, aromatizantes e conservador sorbato de potássio.	08/2014
	B	16	Polpa de tomate, açúcar, vinagre, glicose, sal, espessantes goma xantana e pectina, conservador ácido sórbico, estabilizante cloreto de cálcio, acidulante ácido cítrico e aromatizantes..	11/2013
	C	16	Polpa de tomate, açúcar líquido, vinagre, sal, amido modificado, acidulante ácido cítrico, conservador ácido sórbico, aroma natural de ketchup, espessante goma guar e realçador de sabor glutamato monossódico.	09/2013
Catchup sachê	C	92	Polpa de tomate, açúcar líquido, vinagre, sal, amido modificado, acidulante ácido cítrico, conservador ácido sórbico, aroma natural de ketchup, espessante goma guar e realçador de sabor glutamato monossódico.	
Polpa	A	16	Tomate e Açúcar.	09/2014
	B	16	Tomate, açúcar, sal e acidulante ácido cítrico.	05/2013
	C	16	Tomate e acidulante ácido cítrico.	04/2014
Extrato	A	16	Tomate, açúcar e sal.	09/2014
	B	16	Tomate, açúcar e sal.	11/2013
	C	16	Polpa de tomate, açúcar e sal.	11/2013

4.6.4 Determinação de AME e AOH

As análises de micotoxinas de *Alternaria* foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme método descrito por Motta e Soares (2001). As extrações das micotoxinas em frutos de tomate e seus produtos processados foram realizadas misturando-se e homogeneizando o produto. Uma amostra de 50 g foi pesada e homogeneizada com 150 mL de metanol em *mixer* por 3 minutos. Após a homogeneização a amostra foi filtrada em papel de filtro quantitativo. Uma alíquota de 200 mL do filtrado foi coletada em béquer e adicionada de 60 mL de solução de sulfato de amônio a 10%. A mistura foi filtrada também em papel de filtro quantitativo com auxílio de bomba a vácuo. Uma alíquota de 200 mL do filtrado foi transferida para um funil de separação e adicionada de 50 mL de água ultrapura Milli-Q a 8 °C. Procederam-se duas extrações com 40 mL de clorofórmio. Todo o clorofórmio foi coletado em um funil de separação e lavado com 30 mL de água ultrapura Milli-Q a 5 °C. Após a lavagem, o volume do clorofórmio foi registrado para cálculos futuros. O clorofórmio do extrato foi evaporado com o auxílio de um rotavapor a 35 °C. O resíduo foi dissolvido em 2 mL de metanol e filtrado através de sulfato de sódio anidro.

A detecção e quantificação das micotoxinas foram realizadas em Cromatógrafo Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado com detector com arranjo de fotodiodo - DAD (Shimadzu, SPD-M10A DAD, Germany) e coluna C₁₈ em fase reversa, 10 µm de diâmetro médio de partícula, 3,9 mm de diâmetro interno e 300 mm de comprimento (Waters, Ireland), com eluição isocrática, utilizando-se 80% de metanol grau HPLC e 20% de água ultra pura MiliQ como fase móvel, contendo 300 mg ZnSO₄ · 7 H₂O/L, em um fluxo de 0,7 mL/min e detecção a um comprimento de onda de 250 nm e temperatura de 30° C. A identidade de cada pico foi confirmada comparando-se o espectro da amostra padrão das micotoxinas com o pico presumidamente positivo na amostra depois da normalização.

Os concentrados de tomate (extrato, polpa e catchup) foram analisados quanto à presença das micotoxinas AME e AOH. As amostras foram analisadas e os picos correspondentes as micotoxinas foram registrados na faixa espectral de 200 a 500 nm. Para confirmação da identidade das substâncias foi feita a comparação entre os espectros dos picos das amostras em relação aos picos dos padrões obtidos no ultravioleta. Nas Figuras 8 a 10

estão apresentados os cromatogramas e os espectros obtidos a partir da curva-padrão de AME e AOH, injetados separados e em conjunto.

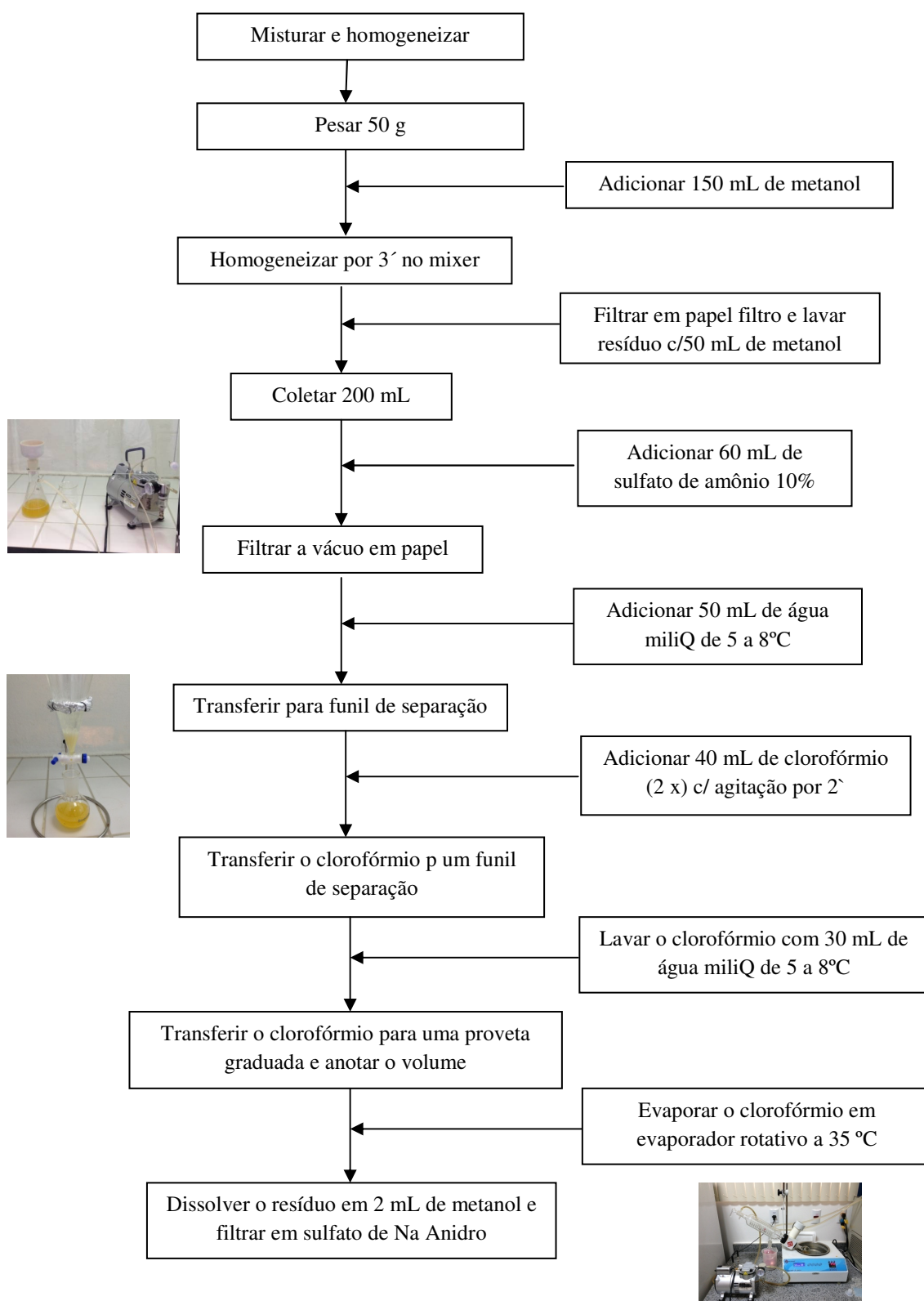


Figura 10. Fluxograma da extração das micotoxinas em tomate e derivados

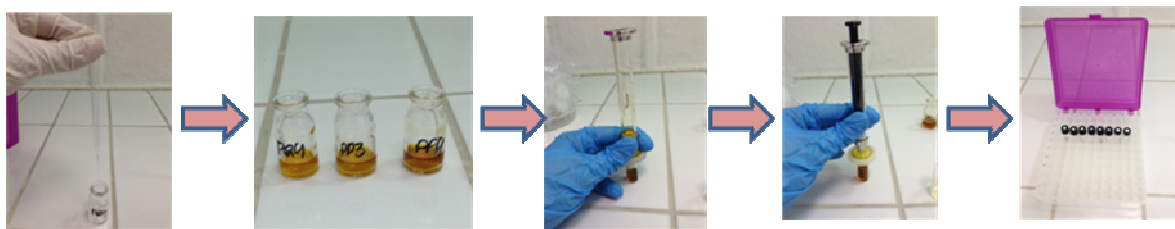


Figura 11. Filtração da amostra para injeção em HPLC

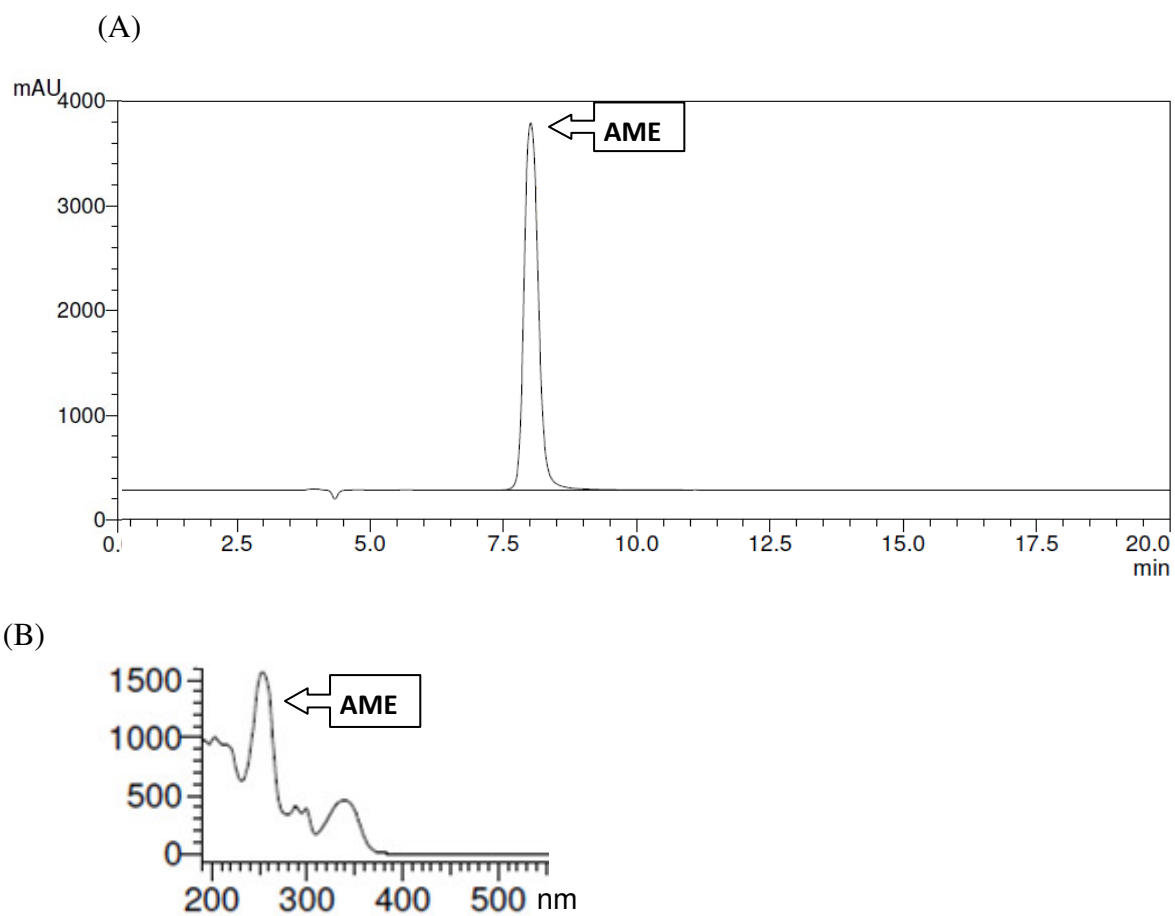


Figura 12. Perfil cromatográfico do padrão de alternariol monometil éter (A). Espectro no ultravioleta do padrão de alternariol monometil éter (B).

Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 µm, 3,9 x 300 mm

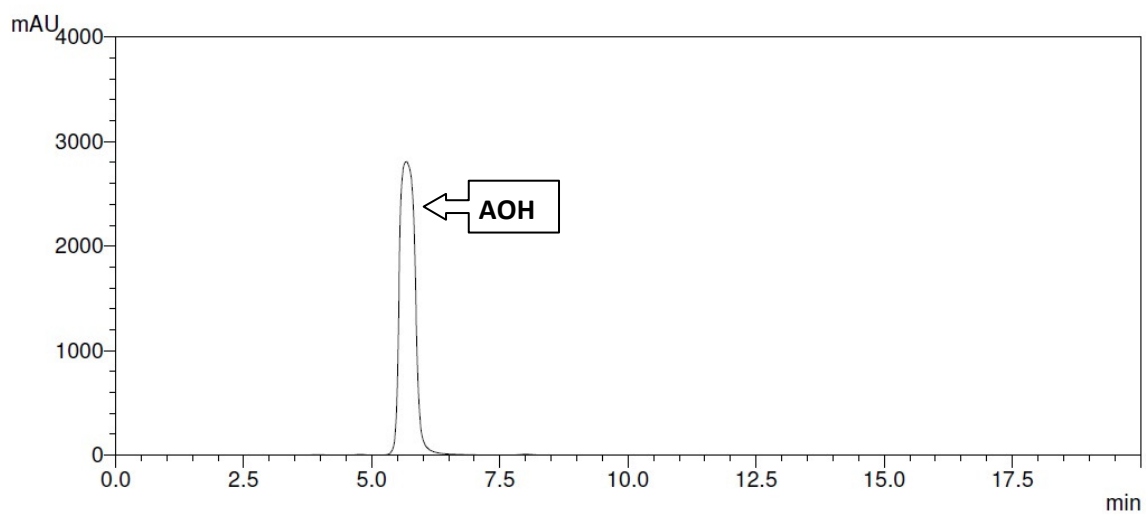
Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 µL

(A)



(B)

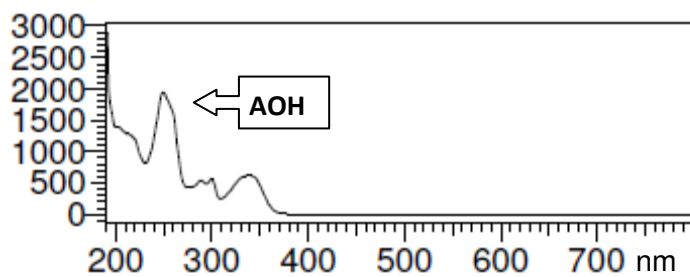


Figura 13. Perfil cromatográfico do padrão de alternariol (A). Espectro no ultravioleta do padrão de alternariol (B).

Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 μm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄ · 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 μL

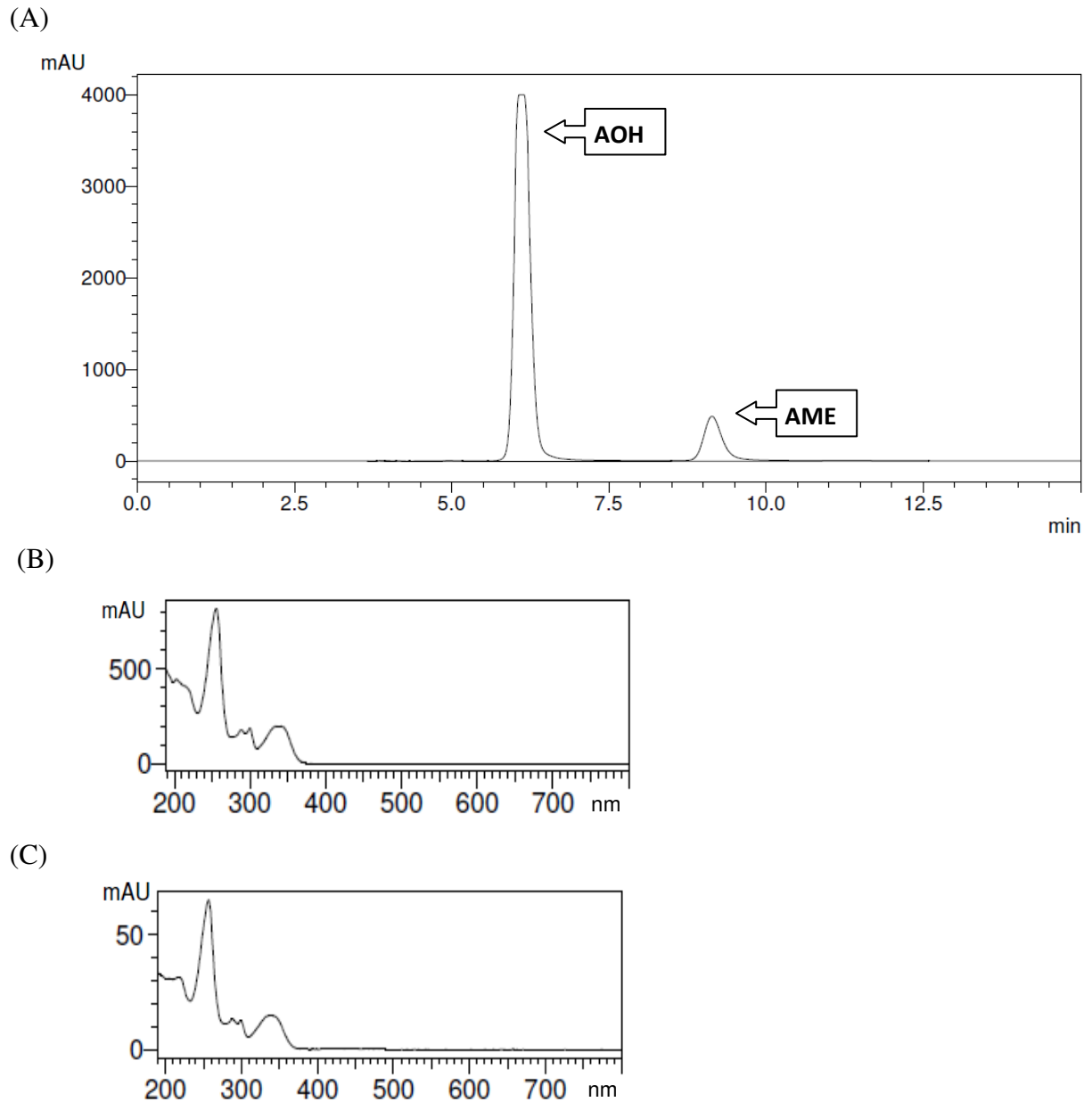


Figura 14. Perfil cromatográfico dos padrões alternariol e alternariol monometil éter (A). Espectro no ultravioleta dos padrões alternariol e alternariol monometil éter (B e C respectivamente).

Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 μm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 μL

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE DERIVADOS DE TOMATE

Quanto aos valores obtidos para os parâmetros físico-químicos dos derivados de tomate (Tabela 7) em relação à legislação vigente, que estabelece um teor mínimo de 6% de sólidos solúveis naturais (BRASIL, 2005b), apenas a polpa de tomate da marca A se mostrou em desacordo, diferindo significativamente das demais amostras de polpa.

Tabela 7. Resultados das análises físico-químicas dos derivados de tomate obtidos no comércio local de Brasília-DF (2012)

Amostra/ Marca		Análises ¹				
		Teor de água (g/100 g)	Sólidos Totais (g/100 g)	Sólidos Solúveis (° Brix)	pH	Acidez Titulável (%) ²
Catchup	A	73,17 ± 0,54 ^a	26,83 ± 0,54 ^a	28,32 ± 0,16 ^a	3,85 ± 0,03 ^a	1,32 ± 0,01 ^a
	B	69,04 ± 0,30 ^b	30,96 ± 0,30 ^b	32,47 ± 0,10 ^b	3,80 ± 0,03 ^b	1,51 ± 0,04 ^b
	C	75,72 ± 0,48 ^c	24,28 ± 0,48 ^c	27,32 ± 0,12 ^c	3,88 ± 0,04 ^c	1,75 ± 0,07 ^c
Extrato	A	88,85 ± 0,39 ^a	11,15 ± 0,39 ^a	10,55 ± 0,17 ^a	4,37 ± 0,02 ^a	0,53 ± 0,01 ^a
	B	87,84 ± 0,39 ^b	12,16 ± 0,39 ^b	12,80 ± 0,13 ^b	4,34 ± 0,03 ^b	0,70 ± 0,01 ^b
	C	87,31 ± 0,80 ^b	12,69 ± 0,80 ^b	12,87 ± 0,12 ^a	4,38 ± 0,01 ^a	0,69 ± 0,01 ^b
Polpa	A	93,68 ± 0,23 ^a	6,27 ± 0,24 ^a	5,86 ± 0,05 ^a	4,06 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
	B	92,29 ± 0,21 ^b	7,55 ± 0,19 ^b	6,92 ± 0,09 ^b	4,12 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,01 ^b
	C	90,82 ± 0,29 ^c	8,89 ± 0,16 ^c	8,00 ± 0,09 ^c	4,18 ± 0,01 ^c	0,20 ± 0,01 ^c
Catchup sachê	C	71,27 ± 0,15	28,73 ± 0,15	33,19 ± 0,16	4,01 ± 0,03	0,63 ± 0,03

¹ Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Em uma mesma coluna, médias com letras em comum não apresentam diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, para amostras de um mesmo produto.

² Expresso como acidez titulável por g de ácido acético% (m/m) para o produto catchup e acidez titulável por g de ácido cítrico% (m/m) para os produtos extrato e polpa.

Tradicionalmente, produtos concentrados de tomate são caracterizados pelo teor de sólidos solúveis. Com base nos parâmetros da Resolução CNNPA nº 12, de 30 de março de 1978 (BRASIL, 1978) os extratos avaliados estão em desacordo, visto que o teor mínimo de sólidos solúveis para esse produto ser considerado um extrato simples concentrado, descontando-se o cloreto de sódio, deve ser de no mínimo 18% (p/p).

No caso do catchup, a Resolução CNNPA nº 12, de 30 de março de 1978 (BRASIL, 1978) estabelece o mínimo de 35% de resíduo seco; assim nenhuma das marcas avaliadas está de acordo com esse parâmetro, visto que apresentaram um teor de umidade elevado e reduzido teor de sólidos totais (Tabela 7). Para o produto polpa não existem parâmetros específicos de qualidade físico-química estabelecidos na legislação vigente.

Uma das características mais importantes da matéria-prima é o teor de sólidos solúveis (°Brix), pois determina o rendimento em massa do tomate processado. Os sólidos solúveis incluem os açúcares e os ácidos do tomate, quanto maior o seu teor nos frutos, menor o consumo de energia na obtenção da massa concentrada. Estima-se que para cada aumento de um °Brix na matéria-prima ocorra um acréscimo de 20% no rendimento industrial (GIORDANO; SILVA; BARBOSA, 2000). Dos produtos avaliados o teor de sólidos solúveis foi maior no produto catchup em sachê, seguido do catchup em tubo, extrato e polpa de tomate.

Ao avaliar três diferentes marcas de polpas e de extratos de tomate Bery et al. (2011) encontraram valores médios de sólidos solúveis de 11,29 °Brix e 16,82 °Brix, respectivamente; valores superiores aos obtidos no presente trabalho. Em um estudo semelhante, Silva et al. (2011) obtiveram valores de sólidos solúveis variando de 15,1 a 21,9 °Brix em catchups comerciais da cidade de Pombal–PB, inferiores ao encontrados no presente estudo. Dados de sólidos solúveis inferiores a 30 °Brix foram encontrados por Bannwart et al. (2008) em catchups variedade *light*, como resultado do menor teor de açúcar adicionado à formulação desse tipo de produto. Embora os produtos avaliados na presente pesquisa não sejam do tipo *light*, os valores baixos de sólidos solúveis encontrados podem ser atribuídos a um maior teor de água contido na matéria-prima e ao menor teor de sólidos solúveis do tomate presente no produto final concentrado, reforçando a necessidade de uma legislação que estabeleça tais critérios, evitando assim que produtos com baixa concentração de sólidos do tomate sejam comercializados.

Em relação ao pH, de acordo com Franco e Landgraf (2002) o extrato de tomate deve apresentar valores na faixa de 4,0 e 4,5. Todas as marcas de extrato avaliadas estão dentro dessa faixa. Bery et al. (2011) encontraram valores médios de pH para polpa e extrato de tomate de 4,15 e 4,13, respectivamente. Resultado semelhante aos encontrados no presente estudo. Em relação às amostras de catchup, os valores encontrados por Silva et al. (2011) em quatro diferentes marcas de catchup na cidade de Pombal–PB foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Os valores de pH das amostras dos concentrados avaliados mostraram-se dentro de uma faixa considerada segura, na qual há uma baixa probabilidade de multiplicação microbiana.

Ao avaliar três marcas de catchup comercializadas na Suécia, Bayod, Willers e Tornber (2008) encontraram valores baixos de sólidos solúveis (26,2 a 27,1 °Brix), sólidos totais (27,16 a 27,43 g/100g) e valores semelhantes de pH (3,8). Em relação à acidez, Bannwart et al. (2008) encontraram valores semelhantes aos relatados na presente pesquisa ($1,49 \pm 0,15\%$ de ácido acético) ao avaliarem uma marca convencional de cacthup obtida no mercado local de Campinas-SP. Comparando-se os dados disponíveis na literatura percebe-se que a composição dos derivados de tomate, bem como os ingredientes utilizados na elaboração são comuns entre os produtos avaliados e os do presente estudo, o que explica a semelhança de resultados obtidos.

Azeredo e Cordeiro (2012) avaliaram sete marcas de polpa de tomate obtidas no comércio local de Campos dos Goytacazes-RJ e relataram valores médios de pH 4,19, sólidos solúveis de 7,32 °Brix e umidade de 92,42%, valores próximos aos do presente estudo para as três marcas de polpa de tomate avaliadas, assim a ausência de um padrão estabelecido pela legislação permite que produtos com baixo teor de sólidos sejam comercializados, levando o consumidor a adquirir produtos com menor valor nutritivo. Apenas os valores de acidez titulável do presente estudo foram inferiores aos relatados pelos autores, de 0,45%. A acidez titulável em polpa de tomate é expressa em g de ácido cítrico por 100 g do produto, visto que tal ácido orgânico é predominante na matéria-prima e comumente adicionado como conservante (acidulante) no produto polpa de tomate (IAL, 2005; SILVA; GIORDANO, 2000).

5.2 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

As amostras foram analisadas quanto à presença de fragmentos de inseto, ácaros e pelos de roedores e realizada a contagem de fungos pelo Método Howard com o objetivo de avaliar a qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração dos concentrados de tomate (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado contagem de fungos pelo método Howard, sujidades, larvas e parasitos

Produto	Marca	Sujidades, larvas e parasitos (em 100 g) ¹	Contagem de Filamentos Micelianos (Howard) em % ²
Catchup	A	02 fragmentos de inseto	5,33 ± 1,33 (24,95)
	B	03 fragmentos de inseto	7,55 ± 2,04 (26,97)
	C	02 ácaros e 02 fragmentos de inseto	7,55 ± 2,77 (36,74)
Polpa de tomate	A	04 pelos de rato e 01 ácaro	10,66 ± 4,81 (45,07)
	B	02 fragmento de inseto	7,44 ± 1,65 (22,11)
	C	03 fragmentos de inseto e 01 inseto inteiro	12,00 ± 4,62 (38,50)
Extrato de tomate	A	01 pelo de rato e 02 fragmento de inseto	7,99 ± 2,31 (28,89)
	B	Ausência	12,88 ± 2,04 (15,81)
	C	02 fragmentos de inseto	9,78 ± 2,04 (20,84)
Catchup sachê	C	04 fragmentos de inseto	12,67 ± 0,94 (7,43)

¹ Resultados obtidos por meio do exame de quatro alíquotas obtidas de quatro amostras diferentes do mesmo lote.

² Dados apresentados como média ± desvio-padrão (Coeficiente de variação em %) de quatro repetições por amostra.

O cultivo de tomate para fins industriais é do tipo rasteiro, no qual os frutos crescem em contato com o solo e tornam-se susceptíveis ao ataque de insetos, roedores, larvas, parasitos e outras pragas. Na maioria dos produtos derivados de frutas e hortaliças matérias

estranhas como insetos, ácaros e pelos de animais, podem estar presentes devido à seleção e lavagem inadequadas ou pela não utilização de procedimentos de boas práticas de fabricação (GORHAN, 1993).

Dos atomatados avaliados apenas a marca B de extrato de tomate apresentou ausência de sujidades, larvas e parasitos. Nas demais amostras foram encontrados fragmentos de inseto, pelos de rato e ácaros. Pelos de ratos foram encontrados em amostras de polpa de tomate e extrato de tomate, já fragmentos de insetos foram identificados em todos os produtos de todas as marcas, exceto no extrato da marca B. Apenas o catchup da marca C e a polpa da marca A apresentaram ácaros. A legislação brasileira estabelece, para produtos de tomate, a ausência de sujidades, parasitos e larvas (BRASIL, 1978) e a ausência de pelos de roedores com base na RDC nº 175 de 2003 (BRASIL, 2003). Em relação a esse parâmetro, todas as amostras avaliadas no presente estudo, exceto o extrato de tomate da marca B, estão em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação.

Por serem vetores de patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos, às moscas exercem papel importante na contaminação de alimentos, podem transportar de forma passiva microrganismos como *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholera* (OLSEN, 1998). A presença de pelos de animais pode indicar contato com animais ou produtos com excrementos e/ou urina de mamíferos, dentre os quais os roedores (GRATZ, 2006). Já os ácaros, quando ingeridos, podem desencadear reações alérgicas em indivíduos susceptíveis (GELLER et al., 2009).

A avaliação microscópica de derivados de tomate é um método que reflete a qualidade da matéria-prima utilizada e as boas práticas agrícolas e de produção. No Brasil, os primeiros testes para avaliar a qualidade de derivados de tomate comerciais foram realizados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro (INMETRO, 2013a) no ano de 2002 com o produto catchup de seis marcas nacionais e uma importada, com o objetivo de fornecer subsídios para que a indústria nacional possa melhorar a qualidade de seus produtos e prover mecanismos para que a Vigilância Sanitária mantenha o consumidor brasileiro informado sobre a adequação dos produtos e serviços aos Regulamentos e às Normas Técnicas. No teste realizado pelo Inmetro todos os produtos avaliados estavam em conformidade com a legislação vigente e constatou-se a ausência de sujidades, larvas e parasitos em 100 g (INMETRO, 2013a).

No ano de 2005 o Inmetro fez uma nova avaliação em concentrados de tomate, na qual a qualidade microbiológica de extratos de tomate foi avaliada e todos os resultados considerados satisfatórios (INMETRO, 2005). Em 2006, a Associação Brasileira de Defesa do Consumidor (PROTESTE) avaliou 30 molhos de tomate, dos quais sete apresentaram pelos de ratos (PROTESTE, 2006). Em maio de 2013 a Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro suspendeu a venda de um lote de polpa de tomate por presença de pelos de ratos no produto. No mesmo ano, após denúncia da PROTESTE, um lote de catchups também teve a venda suspensa após ser constatado pela ANVISA a presença de pelos de ratos (PROTESTE, 2013).

Dados da ANVISA demonstram que a presença de pelos de ratos em atomatados no período de 2004 a 2010 para catchup ocorreu em apenas uma de 17 amostras avaliadas. Já em molhos de tomates a ocorrência foi comprovada em seis de 58 amostras e em extrato de tomate em 22 de 100 amostras. Em um levantamento interno realizado em uma indústria de atomatados de 2007 a 2010 foi identificada a presença de pelos de ratos em 50 de 350 amostras de catchup, em 142 de 914 amostras de molhos de tomates e em 56 de 638 amostras de extrato de tomate (TADIOTTI, 2011). Dados da mesma indústria demonstram a presença de fragmentos de insetos em todas as amostras avaliadas no mesmo período. Enquanto dados da ANVISA de 2004 a 2010 indicam a presença de fragmentos em 52 de 102 amostras de extrato e em 35 de 55 amostras de molho de tomate.

A RDC nº 175 de 2003 (BRASIL, 2003) estabelece a ausência de pelos de roedores em produtos de tomates. Em função dos resultados obtidos pela indústria, órgãos fiscalizadores e de defesa do consumidor uma nova proposta de padrões para microscopia alimentar foi elaborada pela ANVISA e aguarda publicação. Trata-se da Consulta Pública nº 11, de 2 de março de 2011 (BRASIL, 2011b) que “dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências”. Em relação aos produtos de tomate o documento estabelece o limite de 10 fragmentos de insetos em 100 g do alimento, contagem de filamentos micelianos de 40% para extrato, purê, polpa e molhos; 55% para catchup e 12% para tomates pelados inteiros; para ácaros o máximo de cinco unidades na metodologia utilizada; areia e terra: 1,5% de cinzas insolúveis em ácido e pelos de ratos em um para 100 g de produtos analisados. Caso os parâmetros da consulta pública fossem vigentes na presente data, os produtos avaliados nesse estudo estariam adequados em relação a fragmentos de insetos e ácaros, porém quanto aos

pelos de ratos a polpa de tomate da marca A seria considerada inadequada, pois apresentou quatro pelos em 100 g (Tabela 8).

A presença de roedores no campo de produção é frequente, principalmente em culturas de espinafre, ervilhas e tomates para processamento. Em pelo menos nove estados americanos havia relatos desse problema na década de 80 (CRABB; RIDDLE, 1982). De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA, 2013), a presença de pelos de ratos é considerada uma contaminação “estética” (ofensiva para os sentidos), visto que não acarreta riscos a saúde do consumidor, uma vez que os derivados de tomate são submetidos a tratamento térmico (pasteurização). Na literatura não há relatos de casos de indivíduos ou animais que tenham contraído leptospirose ou hantavirose por ingestão de alimentos contendo pelos de ratos (MEERBURG; SINGLETON; KIJLSTRA, 2009).

O FDA, órgão que define a legislação para alimentos e drogas nos EUA, possui um documento intitulado “*Defect Levels Handbook – The Food Defect Action Levels: Levels of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans*” no qual são estabelecidos os níveis mínimos de contaminantes naturais ou inevitáveis em alimentos que não apresentam perigo para humanos, dentre os quais estão inclusos pelos de ratos e fragmentos de insetos em diversos alimentos, como canela moída, temperos em geral, chocolate, cacau, fubá, macarrão, noz-moscada, pimenta, pipoca entre outros. Porém, para tomate e seus derivados o documento estabelece limites apenas para a presença de fragmentos de insetos e fungos (FDA, 2013).

Em relação a contagem de filamentos micelianos pelo método Howard as amostras avaliadas estão adequadas. O método de Howard é empregado nas indústrias de alimentos há mais de meio século para determinar o grau de limpeza e cuidados durante o processamento. A contagem baixa de fungos por esse método não assegura que o produto seja processado adequadamente, mas uma contagem alta sempre indica deficiência na seleção, com utilização de tomates podres para processamento. No processamento do tomate o material decomposto pode aparecer no produto acabado se a triagem e seleção dos frutos frescos não forem realizadas adequadamente (CARVALHO, 2010).

Os fungos penetram nos tomates e infectam a polpa. Erros na fabricação e nas técnicas de industrialização, além de condições inadequadas e manuseio incorreto são as principais causas de uma alta contagem de fungos no produto final. Os fungos crescem abaixo da casca do tomate, originando hifas que não podem ser removidas pela lavagem. Para controlar e

administrar a quantidade e os efeitos dos fungos presentes em matérias-primas vegetais, como o tomate, criou-se o Método Howard. Assim, tomates com 4% de podres apresentam, em média, 40% de campos positivos quando avaliados pelo método (CORREIA; RONCADA, 2002; YOKOYA, 1993).

Daros et al. (2010) avaliaram os aspectos microscópicos e de rotulagem dos produtos que integram as cestas básicas comercializadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo. Amostras de extrato de tomate avaliadas pelos autores não apresentaram contagem de filamentos micelianos acima de 40%, limite este aceitável para produtos derivados de tomate. Os autores também identificaram ácaros e fragmentos de insetos nas amostras de extratos avaliadas, dados semelhantes aos do presente estudo.

A contagem de filamentos micelianos é um método também utilizado na avaliação da qualidade de outros alimentos. Zamboni, Alves e Santos (1981) realizaram a contagem de filamentos micelianos em doces em pasta de goiaba, marmelo, pêsego e figo utilizando o método de Howard. Do total de 184 amostras de doces em pasta, cerca de 31,32% das amostras de goiabada apresentaram contagem superior a 50% de campos positivos com filamentos micelianos, o que caracterizou o uso de matéria-prima deteriorada. Spiteri, Barion e Zamboni (1981) avaliaram a qualidade da matéria-prima utilizada na fabricação de sucos de tomate, maracujá, caju e uva e concluíram que de 210 amostras analisadas, 30% dos sucos de tomate e maracujá apresentaram contagem superior a 20% de campos positivos com filamentos de fungos, os demais estavam em condições higiênicas satisfatórias.

Correia e Roncada (2003) avaliaram a presença de filamentos de fungos totais e de matéria estranha em geleias de frutas em 117 amostras colhidas em supermercados da cidade de São Paulo, das quais 56,4% das amostras continham matérias estranhas (principalmente fragmentos de insetos) e 73% apresentaram elevada contagem de filamentos micelianos pelo método Howard, reforçando a má qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração dos produtos. Minazzi-Rodrigues et al. (1991) realizaram a avaliação físico-química e microscópica de 122 amostras de extrato, purê e polpa de tomate, produtos comercializados na região metropolitana de São Paulo e observaram que 67,7% dos extratos e 100% dos purês de tomate, encontravam-se de acordo com a legislação vigente, quanto às características físico-químicas, já em relação à contagem de filamentos micelianos, 48,4% dos extratos, 46,7% dos purês e 33,3% das polpas de tomate estavam em desacordo com a legislação.

Enquanto em purês e polpas foi identificada a presença de material estranho como areia, nematóides, leveduras e esporos.

Em 114 amostras de frutas em calda de diferentes tipos e marcas, Correia e Roncada (2002a) observaram que 53,5% das amostras estavam em desacordo com a legislação em vigor por apresentarem filamentos micelianos superior a 10% de campos positivos e 32,5% apresentaram matérias estranhas, principalmente fragmentos de insetos e ácaros. Bueno et al. (2002) avaliaram a qualidade de 15 amostras de polpa de frutas congelada e identificaram a presença de fragmentos e/ou larvas de insetos e ácaros em 60% das amostras, além de fragmentos micelianos. Ao contrário de produtos elaborados com frutas, os derivados de tomate avaliados apresentam baixa contagem de fungos micelianos, com uma baixa porcentagem de utilização de matéria-prima deteriorada.

5.3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Tomates industriais e seus derivados podem ser contaminados com microrganismos patogênicos por meio do ambiente de cultivo (solo), água de irrigação, adubos orgânicos, água utilizada nos procedimentos de pós-colheita, mãos dos trabalhadores que manipulam os frutos durante a colheita e etapas de pós-colheita (MORETTI; MATTOS, 2009). Quanto as análises microbiológicas, todas as amostras avaliadas na presente pesquisa apresentaram ausência de *Salmonella* sp por 25 g, contagem de coliformes a 45 °C inferior a 3 NMP/g e estafilococos coagulase positiva inferior a 10 UFC/g. Todas as amostras de concentrados de tomate deste estudo atenderam as especificações da Resolução RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001).

Souza et al. (2012) avaliaram a qualidade de extrato de tomate produzido em uma indústria de Goiás e obtiveram resultados satisfatórios em relação a qualidade microbiológica. Os produtos de tomates são todos submetidos a processo de pasteurização (pH dos produtos inferior a 4,5), a presença de microrganismos patogênicos pode indicar problemas as diversas etapas de processamento e armazenamento dos produtos.

Para o produto catchup, em 2001 o Inmetro realizou análises microbiológicas, físico-químicas e microscópicas de sete marcas comerciais, sendo quatro provenientes de indústrias localizadas no Estado de Goiás (duas provenientes da cidade de Goiânia, uma de Nova Glória e uma de Rio Verde), uma importada dos Estados Unidos e duas de Araçatuba-SP. Todas as

amostras avaliadas estavam em conformidade com a legislação vigente, tendo como base a Resolução nº 12/1978 (BRASIL, 1978) e a RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001).

5.4 OCORRÊNCIA DE AME E AOH EM TOMATES FRESCOS CONTAMINADOS E CONCENTRADOS DE TOMATES

Foram analisadas 38 amostras de concentrados de tomate: 12 de catchup, 12 de extrato de tomate, 12 de polpa de tomate e dois de catchup em sachê e 6 amostras de tomate. Na Tabela 9 estão apresentados os dados referentes à presença das micotoxinas nas amostras analisadas. Nas amostras de polpa e extrato de tomate de todas as marcas não foram identificados níveis detectáveis das micotoxinas (resultado não apresentado).

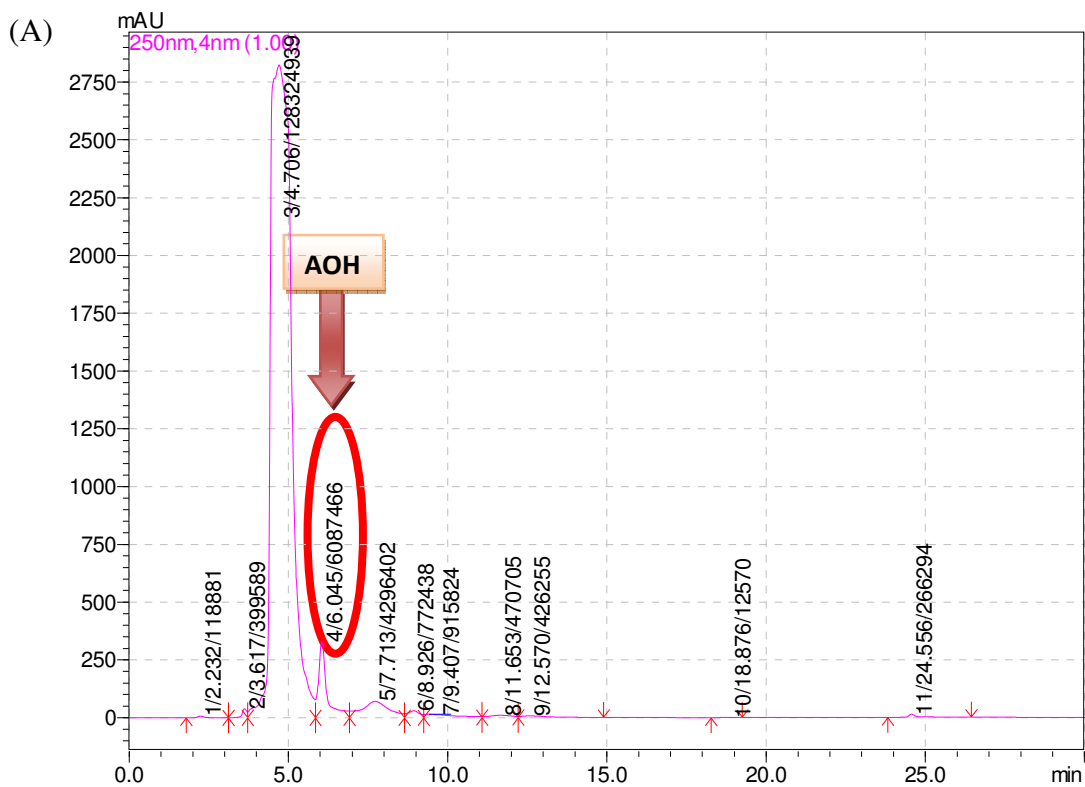
Tabela 9. Ocorrência de alternariol monometil éter (AME) e alternariol (AHO) em amostras de catchup (tubo) e tomates infectados com *A. alternata*

Produto	Amostra	AME ($\mu\text{g/g}$) ¹	AOH ($\mu\text{g/g}$) ¹
Catchup Marca A	1	nd	nd
	2	nd	nd
	3	nd	nd
	4	nd	nd
Catchup Marca B	1	nd	1,16 \pm 0,01
	2	nd	1,03 \pm 0,01
	3	nd	0,49 \pm 0,01
	4	nd	0,54 \pm 0,01
Catchup Marca C	1	nd	nd
	2	nd	nd
	3	nd	nd
	4	nd	nd
Tomate fresco	1	nd	1,85 \pm 0,01
	2	nd	2,06 \pm 0,09
Catchup sache Marca C	1	0,03 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01

¹ nd: não detectado. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão de duplicatas por amostra.

No levantamento das micotoxinas apenas uma amostra de catchup foi identificada apresentando a contaminação simultânea pelas duas micotoxinas, conforme relatos na

literatura dessa ocorrência (TERMINIELLO et al., 2006). Na Figura 11 a 18 estão apresentados os cromatogramas e os espectros das amostras de catchup da marca B e das amostras de tomate comprovadamente contaminadas com *A. alternata* nas quais foi identificada a micotoxina alternariol.



(B)

Peak# : 4
Retention Time : 6.045

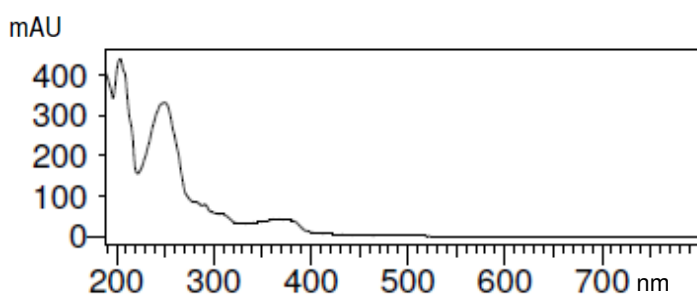


Figura 11. Perfil cromatográfico da amostra 1 de catchup da marca B (A) e o espectro no ultravioleta do pico de alternariol (B).

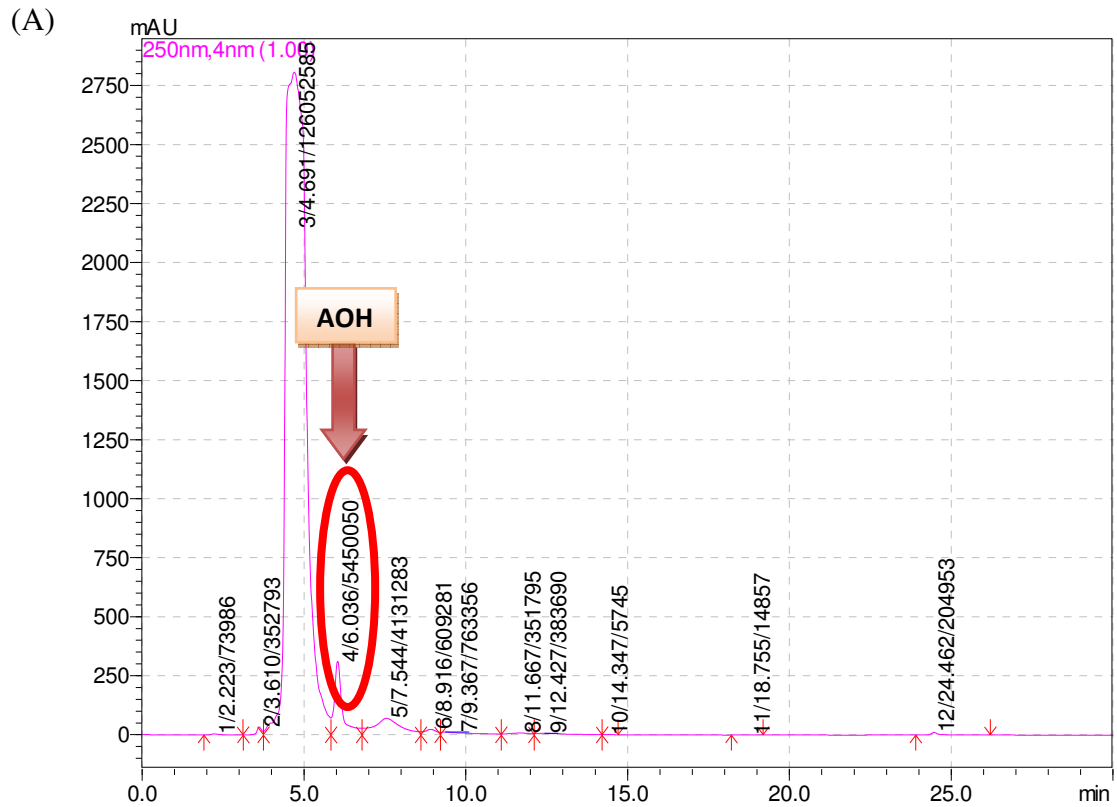
Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 μm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 μL



(B)

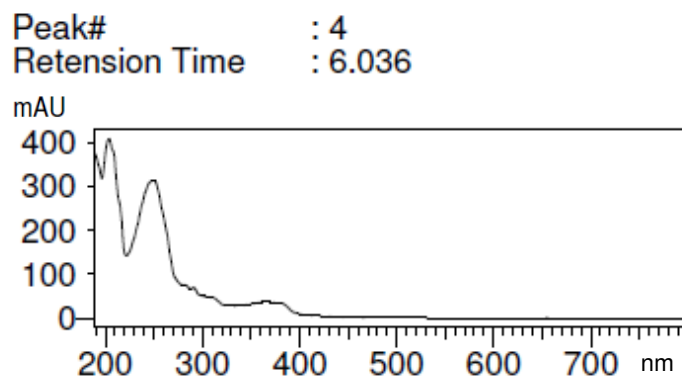


Figura 12. Perfil cromatográfico da amostra 2 de catchup da marca B (A) e o espectro no ultravioleta do pico de alternariol (B).

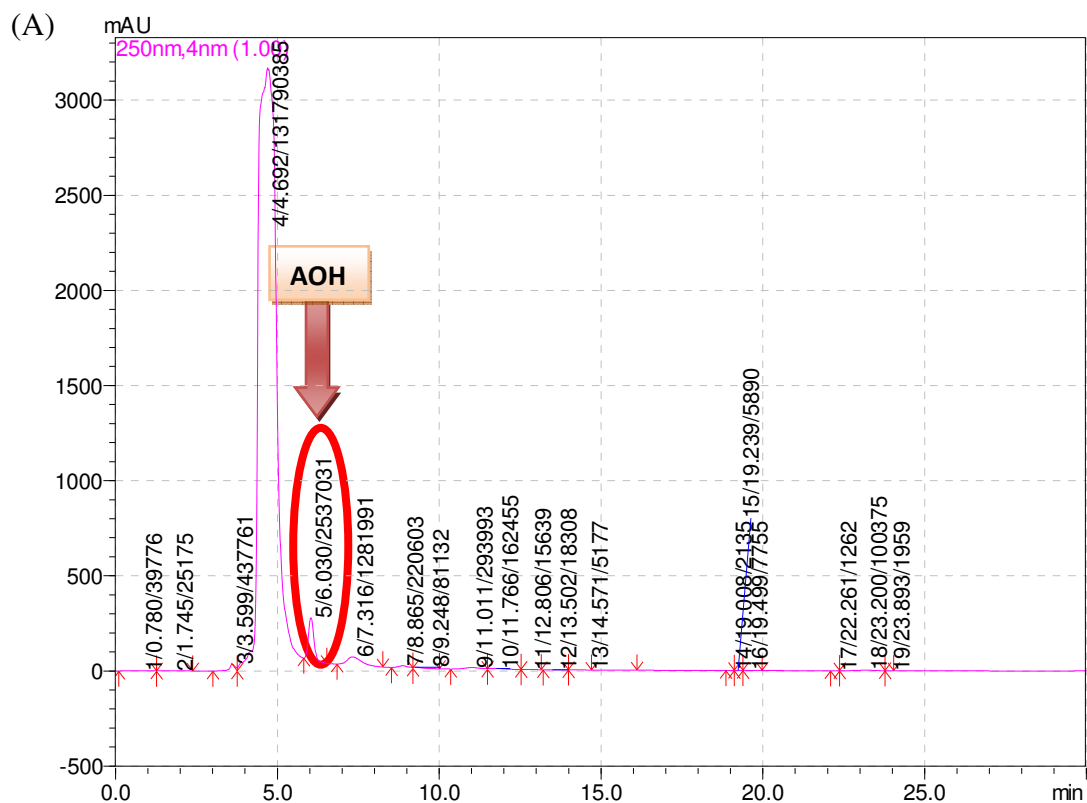
Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 µm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 µL



(B)

Peak# : 5
Retention Time : 6.030

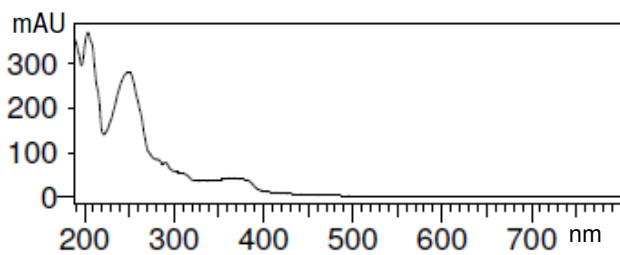


Figura 13. Perfil cromatográfico da amostra 3 de catchup da marca B (A) e o espectro no ultravioleta do pico de alternariol (B).

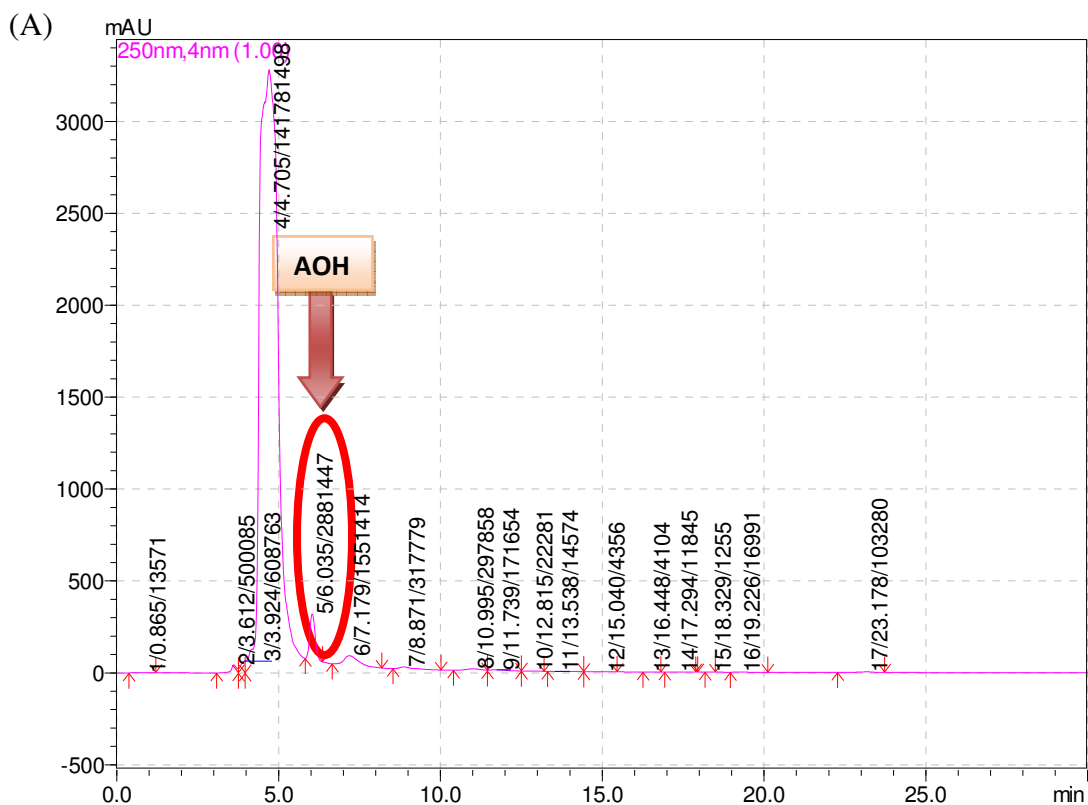
Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 μm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 μL



(B)

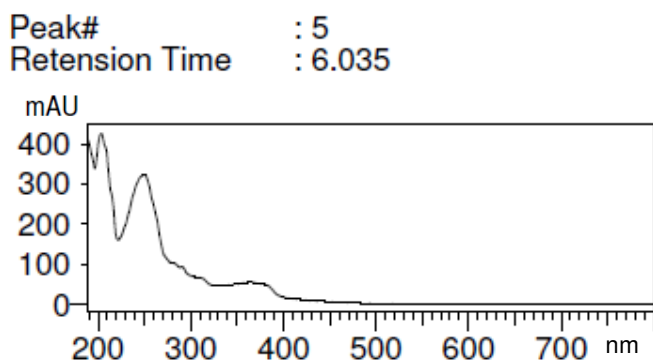


Figura 14. Perfil cromatográfico da amostra 4 de catchup da marca B (A) e o espectro no ultravioleta do pico de alternariol (B).

Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 µm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 µL

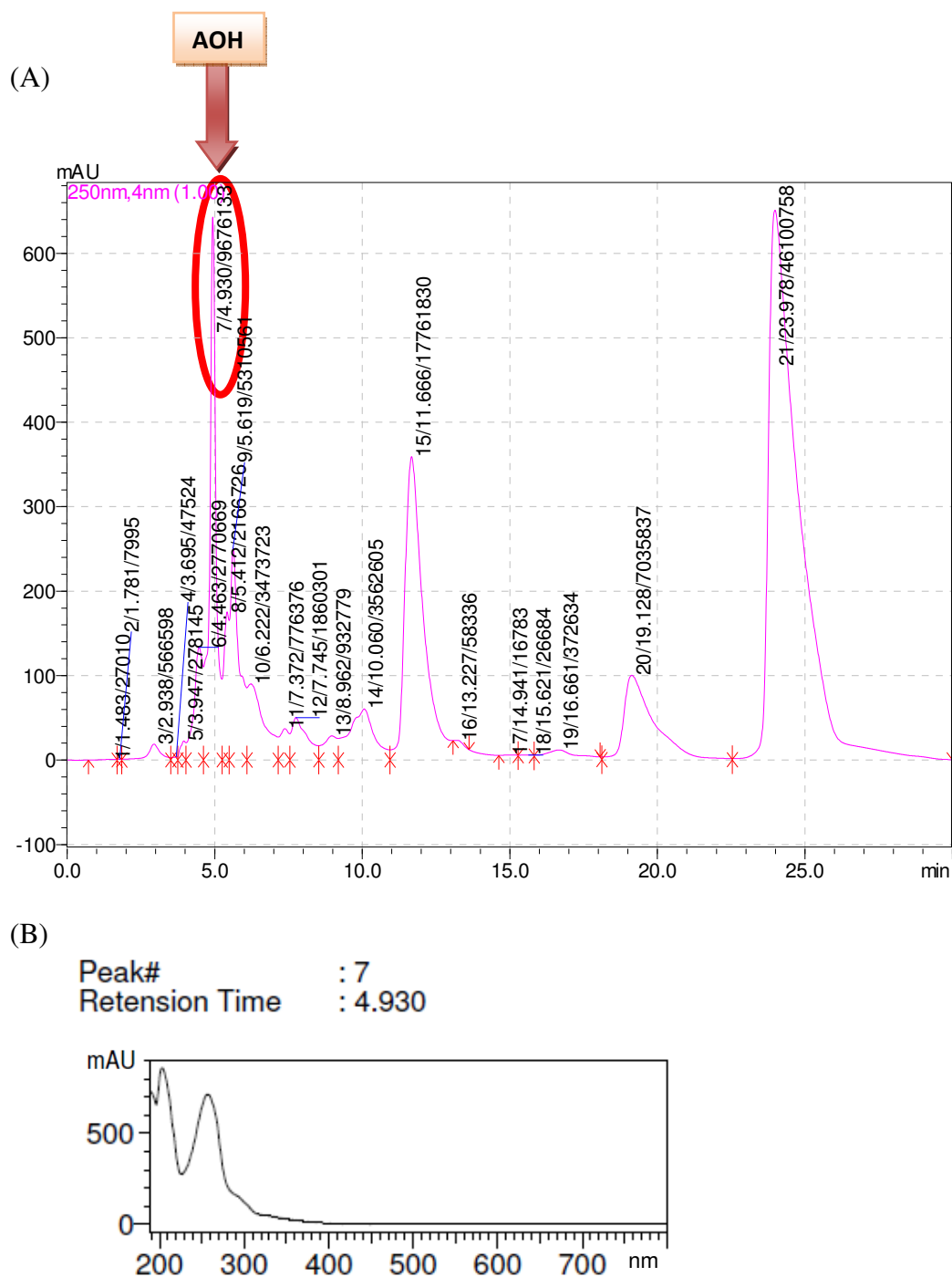


Figura 15. Perfil cromatográfico da amostra 1 de tomate contaminado com *A. alternata* (A) e o espectro no ultravioleta do pico de alternariol (B).

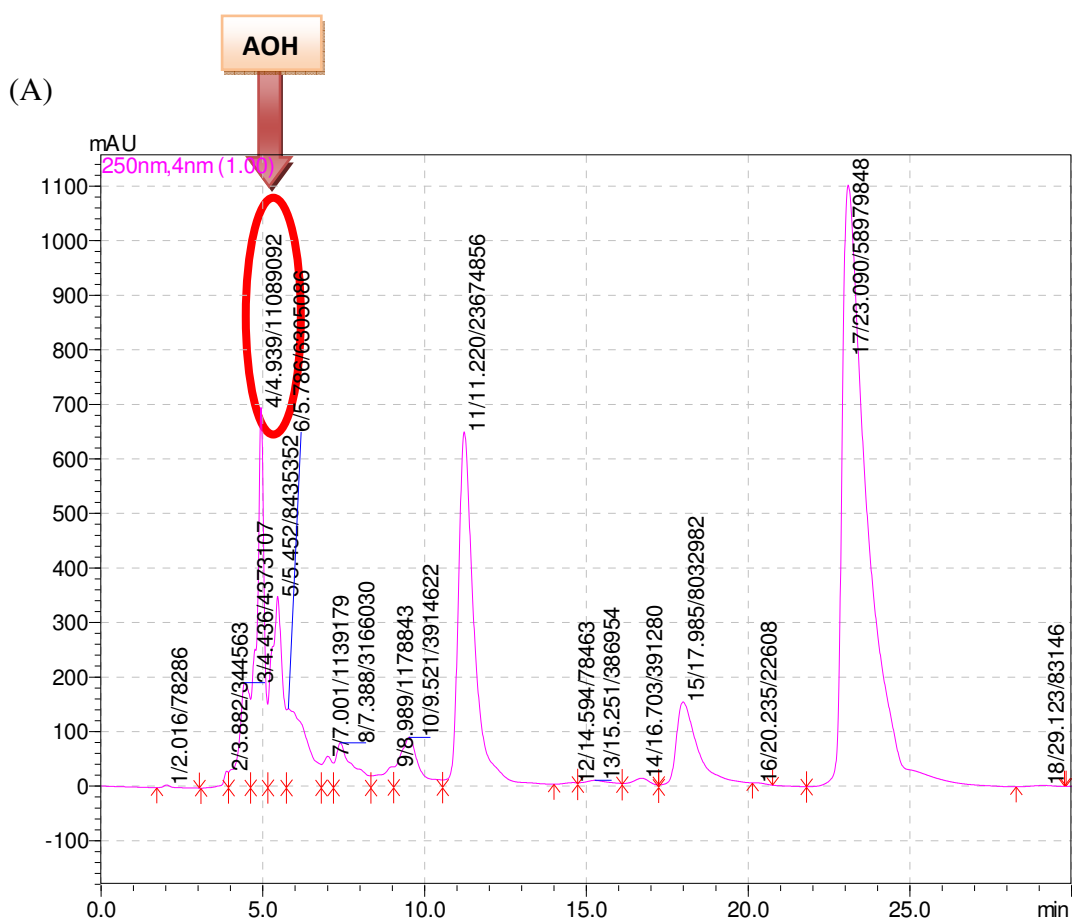
Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 µm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 µL



(B)

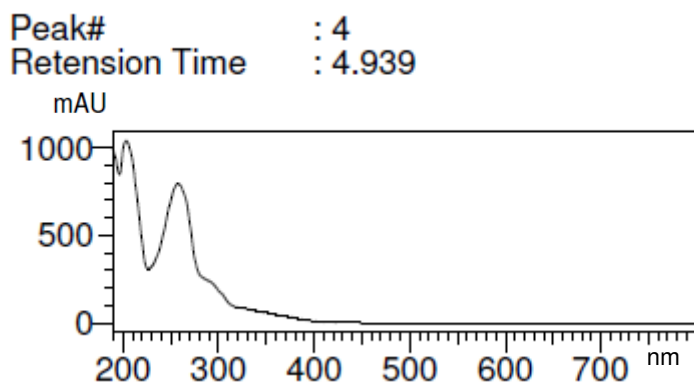


Figura 16. Perfil cromatográfico da amostra 2 de tomate contaminado com *A. alternata* (A) e o espectro no ultravioleta do pico de alternariol (B).

Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 μm, 3,9 x 300 mm

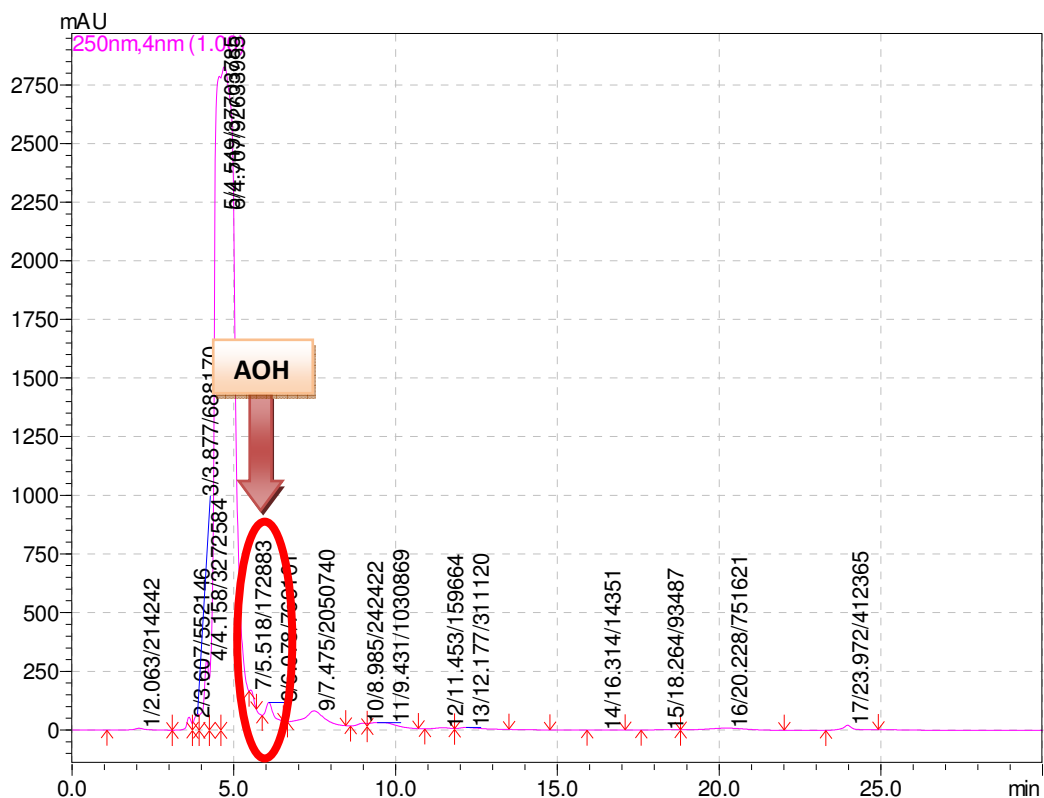
Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄ · 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 μL

(A)



(B)

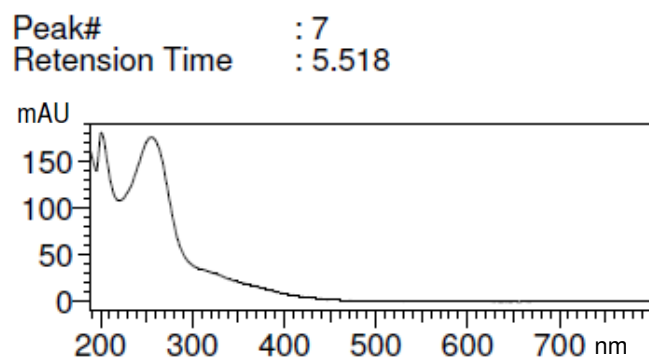


Figura 17. Perfil cromatográfico da amostra 3 de catchup da marca C (A) e o espectro no ultravioleta do pico de alternariol (B).

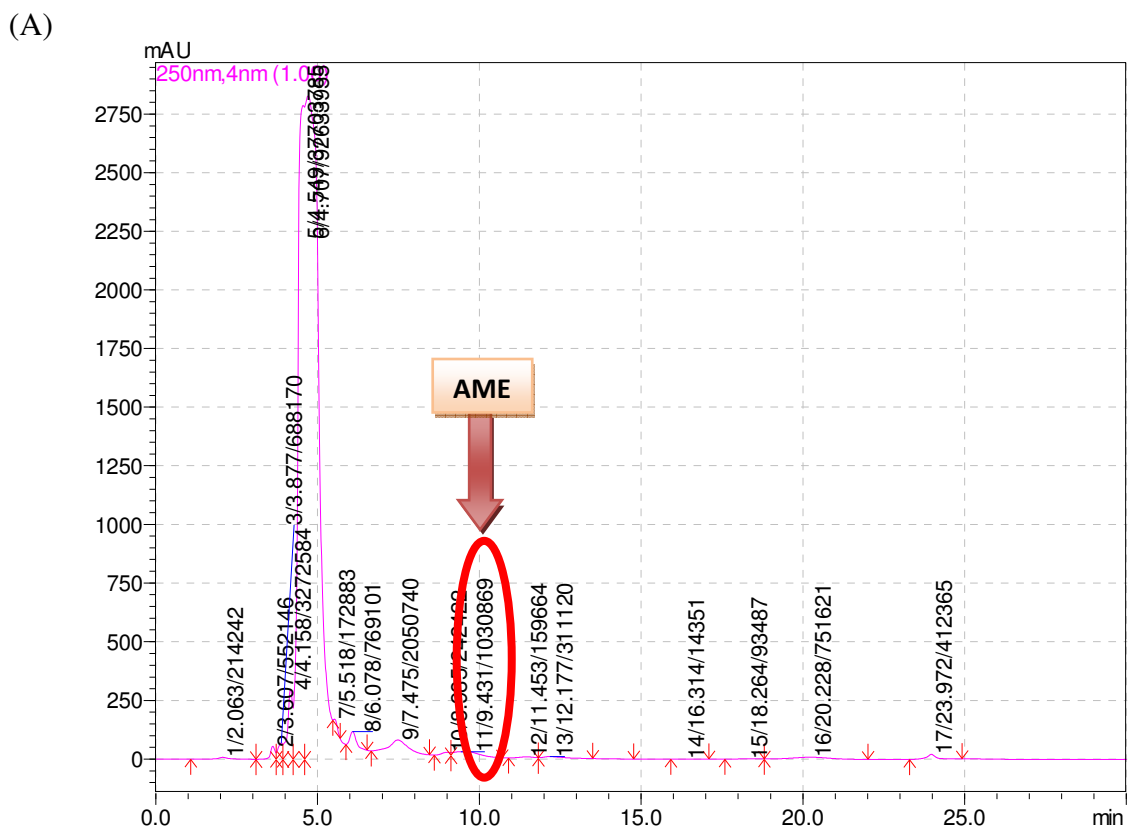
Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 µm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 µL



(B)

Peak# : 11
Retention Time : 9.431

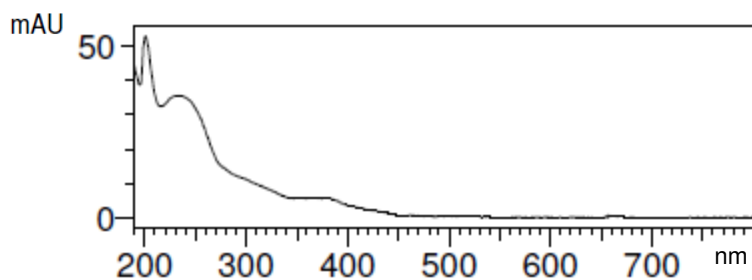


Figura 18. Perfil cromatográfico da amostra 3 de catchup da marca C (A) e o espectro no ultravioleta do pico de alternariol monometil éter (B).

Condições: Coluna Waters C₁₈, 10 µm, 3,9 x 300 mm

Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v) com 300 mg ZnSO₄. 7 H₂O/L

Fluxo: 0,7 mL/min

Detector: Espectrofotométrico com arranjo de diodo a 250 nm

Quantidade de amostra injetada: 20 µL

Ao todo três marcas e quatro diferentes produtos foram avaliados. Apenas as amostras de catchup apresentaram contaminação por micotoxinas de *A. alternata*. De acordo com Bannwart (2006) o catchup é elaborado a partir de polpa de tomate, na forma fresca ou de pasta concentrada. De todos os concentrados o catchup é o que apresenta maior teor de sólidos provenientes do tomate (LUCAS; SILVA; DORO, 2008), o que poderia explicar a maior probabilidade de identificação de micotoxinas nesse produto, associado ao fato de que tomates mais maduros são destinados a produção desse concentrado. Além disso, vários parâmetros determinam as características do catchup, como a qualidade da matéria-prima e as condições de processamento (BAYOD; WILLERS; TORNER, 2008).

Stack et al. (1985) avaliaram 142 amostras obtidas da linha de produção de catchup e não encontraram AME, porém ácido tenuazônico foi identificado em 73 amostras nas concentrações de 0,4 a 70 µg/g. Terminiello et al. (2006) avaliaram 80 amostras de polpa de tomate processadas e comercializadas na Argentina e encontraram 39 amostras contaminadas por micotoxinas de *A. alternata*. O TeA foi encontrado em 23 amostras (39-4021 µg/kg), AOH em 5 amostras (187-8756 µg/kg) e AME (84-1.734 µg/kg) em 21 amostras, em 10 amostras a ocorrência conjunta de duas micotoxinas foi observada.

Pavón et al. (2012) avaliaram treze diferentes amostras de catchup e encontraram AOH em duas, nas concentrações de 460 e 680 µg/kg. Já em 20 amostras de tomates mofados, 11 apresentaram elevadas concentrações de AOH, variando de 24.670 a 73.490 µg/kg. O processamento conjunto de frutos sadios e contaminados com *Alternaria* promove uma redução do teor de micotoxinas nos produtos derivados por diluição, porém não é capaz de eliminar a micotoxina do produto final, o que pode explicar a identificação das mesmas apenas no tomate infectado e em catchup, um produto concentrado com alto teor de sólidos do tomate.

Stinson et al. (1980) avaliaram a produção de micotoxinas em maçãs e tomates contaminados com espécies de *Alternaria* e concluíram que de sete cepas de *A. alternata* seis produziram em conjunto as micotoxinas AME e AOH nas concentrações de 0,35 a 4,35 mg/100 g e 0,33 a 2,4 mg/100 g, respectivamente. Para o fungo *A. alternata* 584S os autores encontraram médias de produção da micotoxina AOH em tomates (16,8 µg/g) semelhantes aos do presente estudo (15,98 a 18,18 µg/g). Indicando que espécies de *Alternaria* produtoras de micotoxinas (*A. tenuis*, *A. alternata*, *A. tenuissima* e *A. solani*) podem produzir quantidades abundantes de micotoxinas nos frutos infectados, nos quais o

elevado teor de umidade pode ser o fator determinante. Porém, os autores ressaltaram que mais estudos seriam necessários para estabelecer se as micotoxinas são formadas em frutas intactas e se poderiam ser encontradas em produtos processados.

Ao avaliarem frutos inteiros de tomates, maçãs, laranjas e limões Stinson et al. (1981) concluíram que a principal micotoxina produzida em tomates foi o ácido tenuazônico, em concentrações superiores a 13,9 mg/100 g, porém quantidades reduzidas de AME, AOH e ALT estavam presentes e a ocorrência de AOH foi maior que AME. As concentrações de AOH variaram de 0,3 a 5,3 µg/g em tomates inteiros contaminados com fungos do gênero *Alternaria*. Esses valores são semelhantes aos encontrados no presente estudo (Tabela 9) em tomates inteiros naturalmente contaminados *Alternaria alternata*. Embora os autores não tenham identificado a espécie contaminante, fica evidente que a produção de micotoxinas em frutos naturalmente contaminados é frequente e levanta a possibilidade de que tomates infectados possam ser incorporados a derivados processados em função de erros de classificação/seleção dos frutos ou mesmo por negligência, contribuindo para um risco potencial a saúde do consumidor.

Ao avaliarem tomates frescos provenientes do mercado da Dinamarca e Espanha, com lesões fúngicas aparentes (mofados), Andersen e Frisvad (2004) observaram que o gênero predominante era *Alternaria* em 40% das amostras avaliadas. Harwig et al. (1979) também encontraram *Alternaria* em 37% dos tomates mofados de Ontário-Canadá e Mislivec et al. (1987) em 47% e 60% de tomates com bolor nas regiões Leste e Centro-Oeste dos EUA, respectivamente. Enquanto que no Estado da Califórnia, maior produtor de tomate nos EUA, a ocorrência de *Alternaria* foi de apenas 23%, enquanto *Aspergillus* foi identificado em 57% dos tomates infectados. Muhammad et al. (2004) também observaram uma maior frequência de tomates mofados infectados com *Aspergillus* na Nigéria. Assim, levantou-se a hipótese de que fatores climáticos e geográficos interfiram na microbiota de tomates, e que a contaminação por *Aspergillus* seria mais frequente em climas secos e quentes e por *Alternaria* em climas mais úmidos e temperados (ANDERSEN; FRISVAD, 2004).

AME e AOH foram identificadas em amostras de polpa de tomate e catchup avaliadas por Hajslova (2006 apud OSTRY, 2008) nos anos de 2004 e 2006 na República Tcheca. Do total de 8 amostras de catchup avaliadas em 2004, AOH e AME estavam presentes em todas nas concentrações de 6,9 µg/kg e 1,6 µg/kg, respectivamente. Já nas amostras avaliadas em 2006, AOH foi identificado em 17 de 21 amostras com valores entre 0,1 a 3,7 µg/kg e AME

em todas as 21 amostras com valores entre 0,06 a 1,2 µg/kg. As concentrações de AOH e AME relatadas por esse autor são inferiores as obtidas no presente estudo (Tabela 9), o que pode ser justificado pela diferença de composição dos produtos tipo catchup avaliados, qualidade da matéria-prima utilizada, condições climáticas e geográficas, além da espécie de fungo infectante da matéria-prima e da metodologia utilizada. Conforme demonstrado por Stinson et al. (1980), as espécies do gênero *Alternaria* produzem quantidades variadas das micotoxinas AME, AOH, TeA e ALT em um mesmo substrato, logo a concentração dessas micotoxinas em derivados de tomate depende também da cepa contaminante da matéria-prima.

Embora haja um consenso de que o gênero *Alternaria* seja o principal causador de deterioração fúngica em tomates (OSTRY, 2008; THOMMA, 2003) estudos que avaliaram a ocorrência de micotoxinas em tomates e atomatados ainda são escassos na literatura. Porém, há relatos de AME, AOH e TeA em vinhos (SCOTT et al., 2006), suco de uva (OSTRY et al., 2007), cevada, trigo, aveia (HAGGBLOM; STEPINSKA; SOLYAKOV 2007) e ervilhas (KRÁLOVÁ et al., 2006).

Na China, Li e Yoshizawa (2000) identificaram a presença de *A. alternata* em 87,3% de amostras de trigo infectadas por fungos. Um total de 22 amostras de grãos de trigo da safra de 1998 foram avaliados quanto a presença de micotoxinas de *Alternaria* por cromatografia líquida de alta eficiência. AOH foi detectada em 20 de 22 amostras em concentrações de 116 a 731 µg/kg e AME em concentrações de 52 a 1426 µg/kg em 21 amostras.

Noser et al. (2011) avaliaram 19 amostras de catchup obtidas do comércio local da Suíça e identificaram as micotoxinas AME e AOH em três produtos, nas concentrações de 4 a 5 µg/kg e 1 µg/kg, respectivamente. Em relação à micotoxina TeA os valores foram de três a 141 µg/kg, o que levou os autores a concluir que TeA é a micotoxina prevalente em derivados de tomate. Os valores encontrados por esses autores são inferiores aos relatados no presente estudo para as micotoxinas. No Brasil, Motta e Soares (2001) avaliaram a ocorrência de AOH, AME e TeA por cromatografia líquida com detector de díodos em produtos de tomate processados e vendidos no Brasil. Oitenta amostras de produtos de tomate foram examinadas. TeA foi encontrado em sete amostras de polpa de tomate na concentração de 39 a 111 ng/g e em quatro amostras de extrato de tomate (29 a 76 ng/g). Porém, nem AME nem AOH foram detectados nas amostras.

Tomates obtidos no comércio local da Alemanha, com sinais visíveis de infecção por *Alternaria*, armazenados em temperatura ambiente por até quatro semanas, apresentaram níveis de AOH superiores a 50 µg/g, valor superior aos obtidos no presente estudo, no qual o armazenamento dos tomates infectados sob congelamento ocorreu três dias após a coleta das amostras na indústria. Assim, o tempo pelo qual Ackermann et al. (2011) mantiveram os tomates infectados a temperatura ambiente pode ter favorecido a multiplicação do fungo com consequente aumento da síntese de metabolitos, como as micotoxinas. Além desses fatores, os métodos utilizados na quantificação de micotoxinas são diversos, o que pode levar a uma grande variabilidade de resultados. Elevados limites de detecção podem explicar como alguns métodos não obtêm resultados para determinadas micotoxinas de *Alternaria* e o fato de que Motta e Soares (2001) não encontraram AOH e AME em suas amostras de produtos de tomate. Embora o limite de detecção não tenha sido avaliado no presente estudo, a identificação de AOH e AME nas amostras avaliadas de catchup e tomate foi possível.

Na literatura, os níveis mais elevados de AOH foram quantificados em hortaliças, nozes e sementes oleaginosas, grãos e produtos à base de cereais destinados a alimentação animal. As concentrações mais baixas foram encontradas em cereais e derivados para consumo humano, além de frutas e produtos de frutas. Já para AME, os maiores níveis foram quantificados em grãos e produtos à base de grãos usados como ração, enquanto que as menores concentrações foram observados em sucos de frutas e hortaliças, grãos e produtos à base de cereais para o consumo (EFSA, 2011).

As micotoxinas de *Alternaria* estão presentes em quantidades consideradas preocupantes em tomates, derivados de tomate e em outros alimentos como uva, ervilha, trigo, maçã, vinho, cenoura e milho (GROSS et al., 2011; NOSER et al., 2011; HAGGBLOM; STEPINSKA; SOLYAKOV, 2007; OSTRY et al., 2007; KRÁLOVÁ et al., 2006; SCOTT et al., 2006; LI; YOSHIZAWA, 2000). Porém, não há uma legislação que estabeleça limites toleráveis das micotoxinas de *Alternaria* em alimentos. AOH, AME e TeA nem sequer figuram entre as micotoxinas de maior importância mundial, das quais destacam-se aflatoxinas, zealerona, ocratoxina, fumonisina, patulina e tricotecenos (MURPHY et al., 2006). A falta de limites de tolerância das micotoxinas de *Alternaria* em alimentos pode ser justificada por alguns pontos levantados pela *European Food Safety Authority* (EFSA) como a necessidade de materiais de referência certificados, critérios de desempenho definidos para a análise em alimentos e rações, necessidade de mais estudos sobre a influência da ingestão

dessas micotoxinas na alimentação (humana e animal) e falta de dados de toxicidade para AOH e AME que permitiram a avaliação de risco (EFSA, 2011).

A ocorrência natural de toxinas de *Alternaria* em alimentos foi analisada por diversos autores (BOTTALICO; LOGRIECO, 1998; SCOTT, 2001; OSTRY, 2008; FERNANDEZ-CRUZ; MANSILLA; TADEO, 2010). De acordo com Ostry (2008), os níveis máximos de toxinas de *Alternaria* foram relatados para produtos disponíveis no comércio (1 a 1000 mg/kg). Os níveis mais elevados foram encontrados em amostras de alimentos visivelmente infectadas por *Alternaria* e, portanto, esses alimentos não eram apropriados para o consumo humano.

Dados da EFSA (2011) demonstraram que AOH foi quantificado em 3% das amostras de tomate e seus produtos, em concentrações variando de 5 a 8756 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (8,756 $\mu\text{g}/\text{g}$), o valor superior foi relatado por Terminiello et al. (2006) em polpa de tomate. No presente estudo valores superiores a 8,756 $\mu\text{g}/\text{g}$ foram identificados em tomates (Tabela 9). Já AME foi identificada em 13% das amostras disponíveis na literatura até o ano de 2011, em concentrações de 2 a 1734 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Terminiello et al. (2006) relataram a concentração mais elevada de AME em uma amostra de polpa de tomate (1734 $\mu\text{g}/\text{kg}$), enquanto Motta e Soares (2001) não encontraram AME e AOH em produtos de tomate. Na Europa a micotoxina AOH foi identificada em 13% das amostras de lentilha avaliadas por Ostry et al. (2004) e AME em 6% das amostras de linhaça avaliadas por Králová et al. (2006).

Várias técnicas são adequados para a quantificação de toxina *Alternaria* em alimentos e rações, porém a cromatografia líquida é o método de escolha. Porém, existem vários fatores limitantes para a análise das micotoxinas, como a eficiência da extração, a disponibilidade de quantidades (suficientes) de padrão, a falta de materiais de referência para alimentação humana e animal. Além do que, a maioria dos métodos de análise não possui estudos de validação interlaboratorial, padronização dos métodos analíticos ou realização de testes de proficiência. Na literatura não há relatos de testes para avaliação do risco da ingestão de toxinas de *Alternaria* em alimentos e rações a nível nacional ou internacional. A falta de regulamentação sobre estas micotoxinas na alimentação humana e animal é uma realidade na Europa e em outras regiões do mundo (EFSA, 2011).

6 CONCLUSÕES

- As três marcas de extratos, polpas e catchup de tomate avaliadas apresentaram diferenças em relação às características físicas e químicas, porém adequadas a legislação vigente.
- Quanto à qualidade microbiológica todas as marcas e produtos avaliados (extrato, polpa e catchup) estão adequados a legislação vigente.
- Fragmentos de insetos, ácaros e pelos de roedores foram identificados em todas as marcas e produtos de tomate, exceto para o extrato de tomate da marca B.
- Em relação à contagem de filamentos micelianos, todos os produtos avaliados estão adequados.
- As micotoxinas alternariol e alternariol monometil éter, produzida por *Alternaria Alternata*, foram identificada em catchup de tomate da marca A, catchup em sachê da marca C e tomate infectado por *A. alternata* obtido da indústria de processamento.

7 SUGESTÕES

- A legislação específica para atomatados deve ser estudada e discutida quanto à necessidade de novos parâmetros físico-químicos e microscópicos de qualidade.
- Novos trabalhos devem focar o efeito *in vivo* da intoxicação aguda por micotoxinas de *Alternaria alternata* e quais efeitos pode desencadear a saúde humana.
- São necessários dados de toxicidade para AOH e AME para permitir a sua avaliação de risco.
- Uma legislação que estabeleça limites de micotoxinas de *Alternaria alternata* em produtos de tomate é necessária.
- A indústria química e farmacêutica deve aumentar a oferta de padrões das principais micotoxinas de *Alternaria*.
- São necessários mais estudos sobre a influência do processamento do tomate na concentração das micotoxinas de *Alternaria* em derivados de tomate.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, Y.; CURTUI, V.; DIETRICH, R.; GROSS, M.; LATIF, H.; MARTLBAUER, E.; USLEBER, E. Widespread occurrence of low levels of alternariol in apple and tomato products, as determined by comparative immunochemical assessment using monoclonal and polyclonal antibodies. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6360–6368, 2011.
- ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção e campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 393p.
- ANDERSEN, B.; FRISVAD, J. C. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, n. 25, p. 7507-7513, 2004.
- ANDREUCCETTI, C. **Avaliação da qualidade do tomate de mesa tratado com gás etileno**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Campinas, 2005. 134f. Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC**. International. 17 ed. Gaithersburg, 2000. Cap. 16. (1 CD-ROM).
- AZEREDO, L. F. S. P.; CORDEIRO, C. A. M. Análise bromatológica de polpa de tomate industrial. **Higiene Alimentar**, v. 26, n. 206/207, p. 81-86, 2012.
- 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.
- BANDO, E.; GONCALES, L. N.; TAMURA, N. K.; MACHINSKI JUNIOR, M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 03, p. 175-180, 2007.
- BARBIERI, M. K.; ATHIÉ, I.; PAULA, D. C.; CARDOZO, G. M. B. Q. **Microscopia em alimentos: identificação histológica e material estranho**, 2001. 151p.
- BARKAI-GOLAN, R. Alternaria mycotoxins. In: BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. **Mycotoxins in fruits and vegetables**. San Diego: Elsevier, 2008. cap. 8, p. 185-204.
- BAYOD, E.; WILLERSB, E. P.; TORNBERG, E. Rheological and structural characterization of tomato paste and its influence on the quality of ketchup. **LWT Swiss Society of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1289–1300, 2008.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BERY, C. C. S.; OLIVEIRA, J. K.; REINOSO, A. C. L.; SILVA, D. A.; NARAIN, N. Avaliação da qualidade de extratos, molhos e polpas de tomates industrializados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 194/195, p. 423-425, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 278 de 30 de novembro de 1988**. Norma de identidade, qualidade, embalagem e apresentação do tomate para indústria. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº 12, de 30 de março de 1978. **Normas técnicas especiais**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2010.

BRASIL. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 10 de jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 10 de Jul. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia alimentar para a população brasileira**: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2005a. 236 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005b**. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos de Vegetais, Produtos de Frutas e Cogumelos Comestíveis e revoga dispositivos dos normativos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>>. Acesso em: 26 ago. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005c**. Aprova o Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c8b2040047457a8c873cd73fbc4c6735/RDC_276_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 26 ago. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011a**. Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. 2011. Disponível em: <<http://www.mycotoxins.com.br/rdc7a.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 11, de 2 de março de 2011b**. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. 2011a. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 09 mar. 2011a. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/media/LEG_ConsultaPublica_11-2011.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2014.

BANNWART, G. C. M. C.; BOLINI, H. M. A.; TOLEDO, M. C. F.; KOHN, A. P. C.; CANTANHEDE, G. C. Evaluation of Brazilian light ketchups II: quantitative descriptive and physicochemical analysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p. 107-115, 2008.

BOTTALICO, A; LOGRIECO, A. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: SINHA, K. K.; BHATNAGER, D.; DEKKER, M. **Mycotoxins in agriculture and food safety**. New York, p. 65-108, 1998.

BUENO, S. M.; LOPES, M. R. V.; GRACIANO, R. A. S; FERNANDES, E. C. B; GARCIA-CRUZ, C. H. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n. 02 , p. 121-126, 2002.

CAMARGO, F. P.; ALVES, H. S.; CAMARGO FILHO, W. P.; VILELA, N. J. Desenvolvimento do sistema agroindustrial de tomate. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 11, p. 53-65, 2006.

CAMPOS, C. A. B.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H. R.; BLANCO, F. F.; GONÇALVES, C. B.; CAMPOS, S. A. F. Yield and fruit quality of industrial tomato under saline irrigation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, n.2, p.146-152, 2006.

CARRILLO, L. *Alternaria*. In: _____. **Los hongos de los alimentos y forrajes**. Salta: Buenos Aires, 2003. cap. 7, p. 81- 86.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010. 84 p.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 02, p.700-710, 2007.

CIRILLO, T.; RITIENI, A.; GALVANO, F.; COCCHIERI, R. A. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 20, n. 06, p. 566-571, 2003.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e filamentos micelianos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n. 02, p. 85-90, 2002.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Ocorrência de filamentos micelianos e de matérias estranhas em frutas em calda comercializadas em São Paulo, SP. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, São Paulo, v. 20, n. 01, p. 89-102, 2002a.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Padronização de métodos e quantificação de matérias estranhas e fungos filamentosos. II. Geléias de frutas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 01, p. 41-48, 2003.

COSTA, J. M.; HEUVELINK, E. Introduction: the tomato crop and industry. In: HEUVELINK, E. **Tomatoes**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2005. cap.1, p. 1-20. (Crop production science in horticulture; 13).

CRABB, A. C.; RIDDLE, R. L. Rodent problems relative to mechanical harvesting. In: _____. **Proceedings of the tenth vertebrate pest conference**. University of Nebraska, 1982. p. 119-122.

CPT. Centro de Produções Técnicas. **Tomate industrial**: o Brasil está entre os dez maiores produtores da hortalica no mundo. 2010. Disponível em: <<http://www.cpt.com.br/artigos/tomate-industrial-o-brasil-esta-entre-os-dez-maiores-produtores-da-hortalica-no-mundo>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

CUNHA, J. M. Atomatados: uma categoria saborosa e lucrativa. **Gôndola**, São Paulo. 2006. Disponível em: <http://www.portalamis.org.br/site/revista/revista_atual.a_spx?idRevista=58>. Acesso em: 20 jan. 2011.

DANTAS, R. Atomatados: com sabor de praticidade. **Giro News**, v. 01, n. 45, p. 10-11, 2008. Disponível em: <<http://www.gironews.com/revistas/revista-145-831.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2010.

DAROS, V. S. M. G.; PRADO, S. P. T.; MARTINI, M. H.; GRACIANO, R. A. S.; STANCARI, R. C. A., GONZAGA, Z. M. Alimentos embalados que compõem as cestas básicas: avaliação microscópica e da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 04, p. 525-530, 2010.

DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 66, n. 8, p. 1514–1527, 2003.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. **EFSA Journal**, v. 09, n. 10, p.1-97, 2011.

EMBRAPA HORTALIÇAS (Brasil). **Cultivares de tomate**. 2011. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/produtos/cultivares/tomate_viradoro.htm >. Acesso em: 31 jan. 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Databases 2008**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> >. Acesso em: 29 jan. 2011.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization. World Health Organization. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on processed fruits and vegetables 22nd Session, Washington, DC metro area, U.S.A., 27 September – 1 October 2004. **Proposed draft revised codex standard for processed tomato concentrates**. 2011. Disponível em: <http://documents.wfp.org/stellent/groups/public/documents/manual_guide_proced/wfp251120.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops statistics concepts, definitions and classifications. **FAO Statistics**, 2011. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/documents/Production_trade/definitions/Crops_statistics_concepts_definitions_classifications.doc>. Acesso em: 13 jan 2014.

FDA. Food and Drug Administration. **Defect Levels Handbook- The Food Defect Action Levels: levels of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans.** 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/sanitationtransportation/ucm056174.htm#CHPT1>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

FERNANDES, O. A.; CARDOSO, A. M.; MARTINELLI, S. **Manejo integrado de pragas do tomate.** 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2010. 39p.

FERNANDEZ-CRUZ, M. L.; MANSILLA, M. L.; TADEO, J. L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research**, v. 01, n. 02, p. 113–122, 2010.

FERRARI, A. A. **Caracterização química de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) empregando análise por ativação neutrônica instrumental.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008. 150 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló.** Lavras: UFLA, 2003. 331 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** 3. ed: Viçosa: UFV, 2008. 422 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2002. 182p.

FRANÇA, B. H. C. **Dossiê técnico: cultivo e processamento do tomate.** Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. 2007. 36p. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br/>>. Acesso em: 31 jan. 2011.

FRANK, H. K. Mycotoxins and phytoalexins in stored crops. In: Weichmann, J. **Postharvest physiology of vegetables.** New York: Dekker, 1987. p. 413-426.

FREITAS-SILVA, O.; OLIVEIRA, E. M. M.; FARIAS, A. X.; SOUZA, M. L. M. **Alternaria spp: detecção do potencial toxígeno em tomate pós-colheita.** Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005. 21p.

FREITAS-SILVA, O.; TORRES, A. M.; SOUZA, M. L. M.; CORRÊA, T. B. S. **Ocorrência e produção de micotoxinas por isolados de *Alternaria alternata* em tomate.** Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, comunicado técnico. 2001, 3p.

GAMEIRO, A. H.; CAIXETA FILHO, J. V.; ROCCO, C. D.; RANGEL, R. Estimativa de perdas no suprimento de tomates para processamento industrial no estado de Goiás. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.37, n.7, p. 7-16, 2007.

GIORDANO, L. B.; SILVA, J. B. C. Clima e época de plantio. In: _____. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000. cap. 3, p. 18-21.

GIORDANO, L. B.; SILVA, J. B. C.; BARBOSA, V. Colheita. In: SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. de B. (Org.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília, DF: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia: EMBRAPA-CNPQ, 2000. p. 128-135.

GOIÁS. Governo do Estado de Goiás. **Conjuntura econômica Goiana**. n. 16. Goiânia: Secretaria do Planejamento e Desenvolvimento do Estado de Goiás, 2010. 105 p.

GORHAN, J. R. Filth in foods: implications for health. In: GORHAN, J. R. (Ed.). **Principles of food analysis for filth, decomposition and foreign matter**. 3rd ed. Washington (DC): FDA, 1993. p. 27-32. (FDA Technical Bulletin no 1).

GRATZ, N. G. **The vector- and rodent-borne diseases of Europe and North America: their distribution and public health burden**. Cambridge University Press: Cambridge, 2006. 360 p. Disponível em: <http://www.langtoninfo.com/web_content/9780521854474_frontmatter.pdf>. Acesso em: 10 dez. 13.

GELLER, M.; HAHNSTADT, R. L.; REGO, R. M.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E. Anafilaxia induzida por farinha de trigo contaminada por ácaros. **Revista Brasileira de Alergia e Imunologia**, São Paulo, v. 32, n. 05, p. 199-201, 2009.

GROSS, M.; CURTUI, V.; ACKERMANN, Y.; LATIF, H.; USLEBER, E. Enzyme immunoassay for tenuazonic acid in apple and tomato products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12317–12322, 2011.

HAGGBLOM, P.; STEPINSKA, A.; SOLYAKOV, A. *Alternaria* mycotoxins in Swedish feed grain. In: **Gesellschaft für Mykotoxin Forschung** (Ed.) Proceedings of the 29th mycotoxin workshop. May 14-16, 2007, Stuttgart-Fellbach, Germany, p. 35.

HENZ, G. P.; LOPES, C. A. Doenças de pós-colheita. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p.133-144.

HARWIG, J.; SCOTT, P. M.; STOLTZ, D. R.; BLANCHFIELD, B. J. Toxins of molds from decaying tomato fruit. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 02, p. 267-274. 1979.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on Humans and animals. **Toxicology**, New York, v. 167, p. 101–134, 2001.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**, Aquisição alimentar domiciliar per capita Brasil e Grandes Regiões, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf>. Acesso em: 17 jul 2012.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005, 1018 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Catchup**. 2013a. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/catchup.asp?iacao=imprimir>>. Acesso em: 08 out. 13.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Catchup**. 2005. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/catchup.asp?iacao=imprimir>>. Acesso em: 08 out. 13.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6, ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 790p.

KABAK, B.; DOBSON, A.D. W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 46, n. 8, p. 593-619, 2006.

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.

KNOBLICH, M.; ANDERSON, B.; LATSHAW, D. Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 07, p. 1166-1170, 2005.

KORSTEN, L.; WEHNER, F. C. Fungi. In: BARTZ, J. A.; BRECHT, J. K. In: WEICHMANN, J. **Postharvest physiology and pathology of vegetables**. 2 ed. New York: Dekker, 2003. p. 485-518.

KRÁLOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; POUŠTKA, J.; HOCHMAN, M.; BIELKOVÁ, M.; ODSTRČILOVÁ, L. Occurrence of *Alternaria* toxins in fibre flax, linseed, and peas grown in organic and conventional farms: monitoring pilot study. **Czech Journal of Food Science**, v. 24, n. 06, p. 288-296, 2006.

KUBO, M. **Mycotoxins legislation worldwide** (last updated February 2012). European Mycotoxins Awareness Network. Disponível em: <<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=79>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

- LAU, B. P. Y.; SCOTT, P. M.; LEWIS, D. A.; KANHERE, S. R.; CLÉROUX, C.; ROSCOE, V. A. Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 998, n. 1-2, p. 119-131, 2003.
- LAWLEY, R. *Alternaria*. Factsheet. European Mycotoxin Awareness Network, 2010. Disponível em: <<http://www.mycotoxins.org>>. Acesso em: 22 jan. 2011.
- LEHMANN, L.; WAGNER, J.; METXLER, M. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 03, p. 398-408, 2006
- LI, F.; YOSHIZAWA, T. *Alternaria* mycotoxins in weathered wheat from China. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 07, p. 2920-2924, 2000.
- LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. Doenças fúngicas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p.17-51.
- LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS/EMBRAPA-SPI, 1994. 61p.
- LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do Tomateiro**. Embrapa Hortaliças. Brasília: 2005. 151 p.
- LUCAS, D.; SILVA, E. S.; DORO, A. **Processamento de ketchup**. Portugal: Instituto politécnico de Coimbra - Escola Superior Agrária, 2008. Disponível em: <http://www.esac.pt/noronha/pgs/0708/trabalhos/Processamento_ketchup_PGA_07_08.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2012.
- MAGNANI, R. F.; SOUZA, G. D.; RODRIGUES-FILHO, E. Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus eticulata*) with symptoms of *Alternaria* brown spot. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 55, n. 13, p. 4980-4986, 2007.
- MAKISHIMA, N.; MELO, W. F. Tomate: o rei das hortaliças. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 29, n. especial, p. 28-32, 2004.
- MARIUTTI, L. R. B. **Aflatoxinas em produtos de tomate**: avaliação de metodologia analítica e ocorrência. 2003. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- MARIUTTI, L. R. B.; SOARES, L. M. V. Survey of aflatoxins in tomato products. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n.02, p. 431-434, 2009.
- MELO, P. C. T.; VILELA, N. J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.154-157, 2005.

MEERBURG, B. G.; SINGLETON, G. R.; KIJLSTRA, A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 03, n. 35, p. 221–270, 2009.

MINAZZI-RODRIGUES, R. S.; AMARAL-MELLO, M. R. P.; ZAMBONI, C. Q.; SPITERI, N. Avaliação físico-química e microscópica de extrato, purê e polpa de tomate. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 51, n. 1/2, p. 53-56, 1991.

MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; STACK, M. E.; BANDLER, R. Molds and tenuazonic acid in fresh tomatoes used for catsup production. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 1, p. 38-41, 1987.

MORETTI, C. L.; CALBO, A. G.; HENZ, G. P. Fisiologia e Manejo pós-colheita. In: SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000. cap. 11, p. 136-143.

MORETTI, C. L.; MATTOS, L. M. **Análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) manual específico para a produção integrada de tomate industrial**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 12p. Circular Técnica, 74.

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. Biodisponibilidade do licopeno. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 02, p. 265-273, 2006.

MOTTA, S.; SOARES, L. M. V. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. **Food Chemistry**, London, v. 71, n. 01, p. 111-116, 2000.

MOTTA, S.; SOARES, L. M. V. Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 18, n. 7, p.630-634, 2001.

MUHAMMAD, S.; SHEHU, K.; AMUSA, N. A. Survey of the market diseases and aflatoxin contamination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruit in Sokoto, Northwestern Nigeria. **Nutrition and Food Science**, v. 34, n. 02, p. 72-76, 2004.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 05, 2006.

NEPA/UNICAMP. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos** / NEPA - UNICAMP. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2012.

NOSER, J.; SCHNEIDER, P.; ROTHER, M.; SCHMUTZ, H. Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. **Mycotoxin Research**, v. 27, n. 04, p. 265–271, 2011.

OLSEN, A. R. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. Review of flies and foodborne enteric disease. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v. 28, p. 199-211, 1998.

OSTRY, V.; SKARKOVA, J.; PROCHAZKOVA, I.; KUBATOVA, A.; MALIR, F.; RUPRICH, J. Mycobiota of Czech wine grapes and occurrence of ochratoxin A and *Alternaria* mycotoxins in fresh grape juice, must and wine. **Czech Mycology**, v. 59, n. 02, p. 241-254, 2007.

OSTRY, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal**,; v.01, n. 02, p. 175-188, 2008.

PAVÓN, M. A.; LUNA, A.; CRUZ, S.; GONZÁLEZ, I.; MARTÍN, R. GARCÍA, T. PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products. **Food Control**, v. 25, n. 01, p. 45-52, 2012.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Springer, 2009. 519p.

POSE, G.; LUDEMANN, V.; SEGURA, J.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomatoes affected by blackmold in Argentina. **Mycotoxin Research**, New York, v. 20, n 02, p. 80-86, 2004.

POSE, G.; PATRIARCA, A.; KVANKO, V.; PARDO, A.; FERNÁNDEZ PINTO, V. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 03, p. 348–353, 2010.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 05, p. 901-907, 2002.

PROTESTE. Molhos de tomate: manchou feio. **Proteste**, São Paulo, v. 49, n. 01, p. 8-13, 2006. Disponível em: <<http://www.proteste.org.br/revistas/proteste/2006>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

PROTESTE. Como a PROTESTE, Anvisa detecta pelos de roedor em ketchup. **Proteste**, São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.proteste.org.br/alimentacao/nc/noticia/como-a-proteste-anvisa-detecta-pelos-de-roedor-em-ketchup-1>>. Acesso em: 08 nov. 2013.

REIS, A.; LOPES, C. A. Doenças caudadas por fungos e distúrbios fisiológicos . In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. Embrapa: Brasília, 2012. cap. 8, p. 179-202.

ROBIGLIO, A. L.; LOPEZ, S. E. Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Red Delicious apples in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 413-417, 1995.

ROSETT, T.; SANKHALA, R. H.; STICKINGS, C. E.; TAILOR, M. E. U.; THOMAS, R. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 103- Metabolites of *Alternaria tenuis* auct: culture filtrate products. **Biochemical Journal**, v. 67, p. 390-400, 1957.

SATO, G. S. Uma análise da estrutura de mercado de derivados de tomate no Brasil. In: **Palestra sobre semana do administrador** - SEMAD, 25., 2005, Universidade Estadual de Maringá – PR.

SANTOS, A. T.; PANATA, C. H.; SCHMITT, J.; PADILHA, M. I.; AMANTE, L. N. A história de pessoas com obesidade mórbida: uma experiência no sul do Brasil. **Enfermagem em Foco**, São Paulo, v. 01, n. 03, p. 109-113, 2010.

SCHROEDER, H. W.; COLE, R. J. Natural occurrence of alternariols in discolored pecans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 01, p. 204-206, 1977.

SCOTT, P. M. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 84, n. 06, p. 1809-1817, 2001.

SCOTT, P. M. Other mycotoxins, In: MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food**. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 17, p. 406-440.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A.; LAU, B. P. Y. Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. **Mycotoxin Research**, v. 22, n. 02, p. 142-147, 2006.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Liquid chromatographic of tenuazonic acids in tomato paste. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, n. 3, p. 612-621, 1980.

SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; MOHR, H. E.; BURROUGHS, R. Weathered grain sorghum: natural occurrence of alternariols and storability of the grain. **Phytopathology**, v. 65, n. 11, p. 1259-1263, 1975.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. (org.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 168p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. 625p.

SILVA, G. A. S.; DEODATO, J. N. V.; PEREIRA, K. D.; LIMA, F. F.; ALMEIDA, M. C. B. M.; ARAUJO, A. S. Determinação da qualidade físico-química de maioneses e ketchups servidos em lanchonetes. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 194/195, p. 381-382, 2011.

SOARES, B. B.; RANGEL, R. Aspectos industriais da cultura. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. Embrapa: Brasília, 2012. cap. 15, p. 331-344.

SOLFRIZZO, M.; DE GIROLAMO, A.; VITTI, C.; VISCONTI, A.; VAN DEN BULK, R. Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. **Journal of AOAC International**, v. 87, p. 101-106, 2004.

SONGSERMSAKULA, P.; RAZZAZI-FAZELIB, E. A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, New York, v. 31, n. 11 - 12, p. 1641-1686, 2008.

SOUZA, E. A., SANTOS, D. G., SOUZA, K. N. D. , BATISTA, K. A., LOPES, F. M. controle microbiológico de produto industrializado à base de tomate. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, São Paulo, v. 01, n. 01, p. 72-86, 2012.

SPITERI, N.; BARION, M. I. E.; ZAMBONI, C. Q. Contagem de filamentos micelianos pelo método de Howard em sucos de tomate, maracujá. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 41, n. 2, p.79-82, 1981.

SPOTTL, E.; QUINTARALLA, S.; MUTTI, P. Contaminazione da spore fungine termoresistenti di frutta, pomodoro e loro derivati. **Industria Conserve**, v.67, p.421- 425, 1992.

STACK, M. E.; MISLIVEC, P. B.; ROACH, J. A. G.; POHLAND, A. E. Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 68, n. 04, p. 640-642, 1985.

STATSOFT, Statistica Stat Soft Inc., 1984-2007 (versão Demo). Tulsa, EUA.

STINSON, E. E.; OSMAN, S. F; HEISLER, E. G.; SICILIANO, J.; BILLS, D. D. CEPONIS, M. J.; Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 28, n. 5, p. 960-963, 1980.

STINSON, E. E.; BILLS, D. D.; OSMAN, S. F.; SICILIANO, J.; CEPONIS, M. J.; HEISLER, E. G. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 29, n. 4, p. 790-792, 1981.

TADIOTTI, A. C. Influência da matéria-prima no produto final. In: **7º Congresso Brasileiro de Tomate Industrial**. 2011. Disponível em: <<http://www.congressotomate.com.br/2011/palestras/index.php>>. Acesso em: 03 jun. 2012.

TERMINIELLO, L.; PATRIARCA, A.; POSE, G.; FERNBNDEZ PINTO, V. Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. **Mycotoxin Research**, New York, v. 22, n. 04, p. 236-240, 2006.

THOMMA, B. P. H. J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, v. 04, n. 04, p. 225-236, 2003.

VIEBIG, R. F.; PASTOR-VALERO, M.; SCAZUFCA, M.; MENEZES, P. R. Consumo de frutas e hortaliças por idosos de baixa renda na cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n.05, p. 806-813, 2009.

VILELA, N. J.; MELO, P. C. T.; BOITEUX, L. S.; CLEMENTE, F. M. V. T. Perfil socioeconômico da cadeia agroindustrial no Brasil. In: CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. **Produção de tomate para processamento industrial**. Embrapa: Brasília, 2012. cap. 1, p.17-27.

VIÑAS, I.; BONET, J.; SANCHIS, V. Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuis* in decayed apples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 14, p. 284-287, 1992.

WERNIMONT, G. T. **Use of statistics to develop and evaluate analytical methods**. Arlington: AOAC, 1985. 183p.

WILKINSON, J. **Demandas tecnológicas, competitividade e inovação no sistema agroalimentar do MERCOSUL ampliado**. Montevideo: PROCISUR/BID, 2000. 36 p. (Serie Documentos: 9).

WFP. World Food Processing. United Nations. **Technical specification for: tomato paste**. 2011. Disponível em: <http://documents.wfp.org/stellent/groups/public/documents/manual_guide_proced/wfp251120.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2013.

WPTC. World Processing Tomato Council. **WPTC crop update as of 1 may 2009**. Disponível em: <<http://www.wptc.to/pdf/releases/releases23.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2011.

WPTC. World Processing Tomato Council. **WPTC World production estimate of tomatoes for processing (in 1000 metric tonnes) - 2013**. Disponível em: <<http://www.wptc.to/pdf/releases/WPTC%20World%20Production%20estimate%205%20February%202013.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2014.

YOKOYA, F. **Método Howard para contagem de fungos em produtos industrializados**. Campinas: UNICAMP, 1993. 12 p.

ZAMBONI, C. Q.; ALVES, H. I.; SANTOS, M. C. Contagem de filamentos micelianos em doces em pasta de goiaba, marmelo, pêsego e figo, pelo método de Howard. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 41, n. 01, p. 31-35, 1981.