

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
(PPGCTA)

**FUNGOS TOXIGÊNICOS EM MAÇÃS E OCORRÊNCIA DE PATULINA
NOS SUCOS DERIVADOS**

Juliane Elisa Welke
(Química Industrial de Alimentos – UNIJUÍ)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos como um dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Isa Beatriz Noll

Co-orientador: Horacio Alberto Dottori

Porto Alegre
2008

Juliane Elisa Welke
(Química Industrial de Alimentos – UNIJUÍ)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:
Por:

ISA BEATRIZ NOLL
Orientador – PPGCTA – UFRGS

HORACIO ALBERTO DOTTORI
Co-orientador – IF – UFRGS

ERNA VOGT DE JONG
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA)

JOSÉ MARIA WIEST
PPGCTA – UFRGS

ALESSANDRO DE OLIVEIRA RIOS
Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos – UFRGS

RENAR JOÃO BENDER
Faculdade de Agronomia – UFRGS

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

À Fundação para Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pelo apoio financeiro a este trabalho.

À Empresa **Golden Sucos Ltda** pelas amostras cedidas e em especial a **Marlice Carini**, pela sua disposição em ajudar e responder todas as dúvidas em relação ao processamento do suco.

Ao professor co-orientador, **Horacio Alberto Dottori**, pelos ensinamentos de fotometria fotográfica e uso do programa Imstat, pelo desenvolvimento do equipamento que permitiu melhorar a quantificação da patulina e por suas sugestões e correções.

À colega de laboratório e amiga, **Michele Hoeltz**, pelos ensinamentos de micologia, em especial a identificação dos fungos, pelas sugestões no decorrer do trabalho e pela importante troca de experiências.

Às bolsistas de iniciação científica que colaboraram com esse trabalho, **Thamara Duarte, Mariana Horvath, Patrícia Heidrich e Sibele Guareschi**.

Ao funcionário do ICTA, **Roberval Bittencourt**, pelo empréstimo do rota-vapor e colaboração nos processos de evaporação.

A bibliotecária **Márcia** do ICTA pela disponibilidade, atenção e ajuda.

Aos colegas de mestrado pela troca de experiências e amizade.

Em especial à minha orientadora, Professora Dra. **Isa Beatriz Noll**, por ter me proporcionado à oportunidade de realizar este projeto, que muito me gratificou, pela sua orientação, paciência e ensinamentos, enfim, pela expressiva contribuição para minha formação profissional.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, **Norberto**, um exemplo de dedicação e competência,

À minha mãe, **Solange**, que nunca mediu esforços para que meus sonhos fossem realizados,

Ao meu namorado, **Aldrin**, que sempre esteve ao meu lado me incentivado e ajudando,

À professora Dra. **Isa Beatriz Noll** pela orientação, apoio, oportunidades e amizade

À estas pessoas especiais,

Dedico este trabalho!

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	12
Objetivo Geral.....	12
Objetivos Específicos	12
CAPÍTULO 1	13
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 Maçã.....	13
1.2 Suco de maçã.....	14
1.3 Fungos.....	15
1.4 Micotoxinas.....	15
1.5 Micotoxinas em frutas.....	17
1.6 Patulina.....	19
1.6.1 Características físico-químicas.....	19
1.6.2 Fungos produtores de patulina.....	19
1.6.3 Toxicologia da patulina	22
1.6.4 Ocorrência de patulina.....	25
1.6.5 Legislação sobre patulina.....	26
1.6.6 Eliminação da patulina.....	28
1.6.6.1 Maçã.....	28
1.6.6.2 Suco de maçã.....	29
1.6.7 Métodos para análise de patulina	31
1.7 Quantificação por Fotometria Fotográfica usando CCD	36
1.8 Validação de método	38
1.8.1 Curva padrão / linearidade	38
1.8.2 Recuperação	39
1.8.3 Precisão.....	39
1.8.4 Limite de quantificação.....	39
1.8.5 Limite de detecção.....	40
CAPÍTULO 2	41

Artigo: Fate of apple juice production using apple naturally contaminated with Penicillium spp.....	41
CAPÍTULO 3	55
Artigo: Determination of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using charge-coupled device imaging	55
CAPÍTULO 4	69
Artigo: Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels	70
CAPÍTULO 5	81
Artigo: Patulina – revisão sobre ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos analíticos e controle.....	812
CAPÍTULO 6	101
6. DISCUSSÃO GERAL	101
6.1 Pesquisa da microbiota fúngica das maçãs.....	101
6.2 Otimização do processo de extração da patulina da maçã e suco de maçã	105
6.3 Otimização das condições cromatográficas.....	109
6.4 Validação do método	112
6.5 Determinação da presença de patulina nas maçãs e no suco.....	116
6.6 Avaliação dos níveis de patulina durante as fases de produção do suco concentrado	119
6.7 Pesquisa de fungos termorresistentes.....	121
CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da patulina (The Merck Index, 1996).....	19
Figura 2. Podridão causada por <i>P. expansum</i> (mofo azul).....	20
Figura 3. <i>P. expansum</i> em diferentes meios.....	102
Figura 4. Imagem de Conidióforo de (a) <i>P. commune</i> , (b) <i>P. expansum</i> e (c) <i>P. aurantiogriseum</i> em microscopia com aumento de 400x.....	102
Figura 5. Gêneros fúngicos isolados das maçãs destinadas à produção de suco.....	103
Figura 6. Espécies de <i>Penicillium</i> isoladas das maçãs destinadas à produção de suco.....	104
Figura 7. Fluxograma de extração da patulina de maçã e suco de maçã.....	106
Figura 8. Coluna de sílica-gel utilizada para eluição do extrato orgânico e que auxiliou a separação do 5-hidroximetilfurfural da patulina.....	108
Figura 9. Placa de CCD com 3 concentrações de extrato de suco de maçã demonstrando a separação do HMF da patulina.....	108
Figura 10. Placa de CCD com padrão de patulina e 3 concentrações de patulina de amostra de suco de maçã.....	110
Figura 11. Cromatograma referente a patulina nas concentrações de 5,10 e 20 µg/L de solução padrão.....	111
Figura 12. Imagem de placa de CCD obtida pelo DCA.....	112
Figura 13. Curva padrão demonstrando a linearidade do método.....	113
Figura 14. Placa de CCD com diferentes concentrações de padrão de patulina.....	113
Figura 15. Níveis de patulina em 16 lotes de maçãs.....	117
Figura 16. Níveis de patulina do suco de maçã concentrado.....	117
Figura 17. Níveis de patulina do suco de maçã diluído.....	118
Figura 18. Redução da concentração de patulina do suco de maçã nas fases do processamento dos 16 lotes de maçãs provenientes de câmaras frias que foram utilizadas para a produção de suco concentrado	119
Figura 19. <i>B. nivea</i> desenvolvido em CYA 25°C/7dias.....	122
Figura 20. <i>B. fulva</i> desenvolvido em CYA 25°C/7dias.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Micotoxinas presentes em alimentos contaminados.....	16
Tabela 2. Micotoxinas em derivados de frutas.....	18
Tabela 3. Ocorrência de patulina em suco de maçã em alguns países.....	26
Tabela 4. Países que possuem legislação para patulina e o limite máximo permitido..	27
Tabela 5. Métodos de análise de patulina.....	33
Tabela 6. Recuperação do método de análise de patulina em maçã	114
Tabela 7. Recuperação do método de análise de patulina em suco de maçã diluído.....	114
Tabela 8. Recuperação do método de análise de patulina em suco de maçã concentrado.....	114
Tabela 9. Precisão do método para análise de patulina em suco de maçã.....	115
Tabela 10. Limite de quantificação da patulina utilizando CCD com detector DCA.....	115
Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) aplicada aos níveis de patulina nas etapas da produção do suco.....	120

RESUMO

Significantes quantidades de maçãs produzidas no Rio Grande do Sul são usadas para a produção de suco destinado à exportação. As frutas que são utilizadas pela indústria são aquelas que não atingem o padrão exigido para o consumo *in natura*. Estas maçãs constituem fator de risco quanto à contaminação por fungos, que podem produzir micotoxinas, como a patulina. O Brasil não tem legislação que estabeleça níveis permitidos de patulina em alimentos. Mas muitos países têm adotado a recomendação do *Codex Alimentarius* que indica um nível máximo permitido de 50 µg/L de patulina em suco de maçã. Esse fato estimula países exportadores, como o Brasil, a pesquisar a qualidade micotoxicológica dos seus produtos, a fim de se tornarem competitivos no mercado internacional e de fornecerem alimentos seguros. Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram: (1) avaliar a contaminação fúngica de maçãs destinadas à produção de suco, bem como a possível presença de patulina nos sucos produzidos a partir destas frutas; (2) adaptar metodologicamente a técnica de cromatografia em camada delgada à quantificação de patulina em maçãs e sucos de maçã; (3) analisar os níveis de patulina nas fases do processamento de suco de maçã; e (4) pesquisar fungos termorresistentes nos sucos em estudo. As amostras de maçãs e de sucos foram fornecidas pela Golden Sucos Ltda de Farroupilha, RS. *Penicillium expansum* foi a espécie isolada predominantemente, sendo que 94,44% dos isolados pertencentes a esta espécie se mostraram produtores de patulina nas condições testadas. A prevalência de fungos produtores de patulina nas maçãs processadas resultou em altas concentrações da micotoxina nessas maçãs, variando entre 254,62 e 653,37 µg/kg e também nos sucos concentrados produzidos, com níveis de patulina nestes entre 56,04 e 231,44 µg/L. O método desenvolvido para extração e quantificação da patulina foi eficaz. O detector de carga acoplada forneceu boa sensibilidade, precisão, linearidade e recuperação para a determinação quantitativa de patulina. Todos os estágios do processamento do suco contribuíram para a redução dos níveis de patulina. Desde a maçã até o suco a redução foi de 75,2%. A presença de *Byssosclamyces nivea* em uma das amostras de suco indica que a patulina poderia ser produzida por este fungo durante o armazenamento.

Palavras-chave: maçã, suco, patulina, fungos toxigênicos

ABSTRACT

Significant amounts of apples produced in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, are used to juice production destined to exportation. Fruits used by the industry show some defects and are not accepted for fresh consumption. These apples are a risk factor considering the contamination by fungus, which can produce mycotoxins, such as patulin. Brazil does not have legislation for patulin in food. But many countries have adopted the recommendation of the Codex Alimentarius, which indicates a maximum permitted level of 50 µg/L of patulin in apple juice. This concern stimulates exporting countries, like Brazil, in the research of mycotoxigenic quality of apples and by-products, to become competitive and provide safe foods. In this context, the objectives of this work were (1) evaluate mould contamination of apples used to juice production and possible presence of patulin in apples; (2) methodologically adapt the thin-layer chromatographic technique for quantification of patulin in apples and apple juice; (3) analyze patulin levels in some processing stages of apple juice production; and (4) investigate heat-resistant moulds in juices. The apples and juice samples were obtained from Golden Sucos Ltda, located in Farroupilha city, in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Penicillium expansum* was the most frequently isolated fungus, among these isolates, 94.44% were able to produce patulin under the tested conditions. The prevalence of patulin-producing fungi in apples resulted in high patulin levels in these apples, ranging from 254.62 to 653.37 µg/Kg and in juices ranging from 56.04 to 231.44 µg/L. The method developed to patulin extraction and quantification was effective. The charged coupled device imaging system provides good sensitivity, precision and linearity for the quantitative determination of patulin. All stages of apple juice production contributed to patulin reduction. The overall loss of patulin through processing from apple to apple juice was 75.2%. The presence of *Byssochlamys nivea* in a juice sample indicates that this fungus could produce patulin during storage.

Key words: apple, juice, patulin, toxigenic fungi

INTRODUÇÃO

O suco e os demais derivados da maçã são elaborados, principalmente, a partir de frutas que não alcançam o padrão exigido para consumo *in natura*. Estas maçãs constituem fator de risco quanto à contaminação por fungos, causadores de deterioração e produtores de metabólitos tóxicos, as micotoxinas e entre estas, a patulina.

A patulina tem mostrado inúmeros efeitos tóxicos, incluindo potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico. Em virtude disso, alguns países estabeleceram limites máximos da patulina em maçãs e derivados. O Brasil não possui legislação para patulina em alimentos. O *Codex Alimentarius* recomenda um nível máximo aceitável de 50 µg/L de patulina em suco de maçã. A União Européia adotou recentemente este limite, assim como outros países têm estabelecido legislação para esta micotoxina.

A produção e comercialização de sucos no Brasil são insignificantes quando comparadas com a Europa e aos Estados Unidos. Uma das principais preocupações em relação à contaminação do suco de maçã com a patulina é o fato de que o Brasil exporta este produto a países que possuem limites estabelecidos por legislação para esta micotoxina em sucos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a contaminação fúngica de maçãs utilizadas para a produção de suco e a presença de patulina nos sucos de maçã durante as diferentes etapas de produção do suco em uma indústria.

Objetivos Específicos

- Isolar e identificar espécies de fungos presentes em maçãs destinadas à produção de sucos;
- Desenvolver/adaptar metodologia de quantificação de patulina em três matrizes: maçã, suco diluído e suco concentrado maçã com o uso de equipamentos simples e eficientes, com exatidão, precisão e detecção em baixos níveis;
- Determinar a presença de patulina por cromatografia em camada delgada em cinco pontos da produção do suco de maçã;
- Quantificar os teores de patulina por cromatografia em camada delgada utilizando detector de carga acoplada;
- Validar quanto à linearidade, recuperação, precisão, limite de quantificação e detecção os métodos desenvolvidos e/ou modificados;
- Avaliar a influência das diferentes etapas da produção do suco de maçã nos teores de patulina;
- Verificar a presença de fungos termorresistentes nos sucos de maçã concentrados.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Maçã

A maçã (*Malus domestica* Borkhausen) é uma fruta de clima temperado, comercializada como fruta fresca, tanto no mercado internacional quanto no nacional. No Brasil, na safra de 2005/06, foram produzidas 849 mil toneladas de maçã (FAO, 2007). Foram exportadas 99 mil toneladas de maçã *in natura* e 33 mil toneladas na forma de suco de maçã (IBRAF, 2007). A região sul apresenta clima propício para a produção de maçã, sendo responsável por 98% da produção nacional na safra de 2004/05, com 583 mil toneladas provenientes do estado de Santa Catarina, 353 mil toneladas do Rio Grande do Sul e 40 mil toneladas do Paraná (BRASIL, 2005).

A maior parte da produção brasileira de maçãs provém de três cultivares: Gala, Fuji e Golden Delicious. A cultivar Gala é a primeira a ser colhida, em fevereiro, representando 46% da produção total; a Fuji, cuja colheita se dá em abril, participa com 45% da produção; a cultivar Golden Delicious, colhida em março, representa 6% da produção total, sendo os 3% restantes compostos por outras cultivares (MELLO, 2004).

Frutos destinados à comercialização e à exportação são aqueles que apresentam melhor qualidade em termos de aparência. As maçãs que não se destinam imediatamente ao mercado consumidor são armazenadas em câmaras frigoríficas, que contribuem para a diminuição de seu metabolismo e conservação de suas características físico-químicas (IBRAF, 2007). O armazenamento pode ser associado à atmosfera controlada, onde baixas concentrações de oxigênio e dióxido de carbono (1 e 0,5% respectivamente) mantêm melhor a qualidade da maçã, proporcionando maior retenção da firmeza da polpa (BRACKMANN et al., 1998).

1.2 Suco de maçã

O suco de maçã é o produto extraído da fruta por moagem ou sob pressão, passando por processo de clarificação, adição de antioxidante, desaeração, pasteurização e envase (WOSIACKI et al., 2002). O Ministério da Agricultura define o suco de maçã como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da maçã por processo tecnológico adequado. Pelo regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade de suco de maçã, define-se que a cor deve ser translúcida, o conteúdo de sólidos solúveis deve ser no mínimo de 10,5°Brix (20°C), a acidez total (expressa em ácido málico) deve estar acima de 0,15 g/100g, a acidez volátil no máximo de 0,04 g/100g (expressa em ácido acético) e açúcares totais naturais do fruto de até 13,5 g/100g (BRASIL, 2000).

Como acontece com a maioria das produções agrícolas, existe uma fração da safra de maçã que não é comercializada no mercado na forma *in natura*, sendo destinada à industrialização (WOSIACKI et al., 2002). A maior parte da produção nacional de suco concentrado de maçã destina-se à exportação, apresentando grande concorrência com a Argentina e Chile, países com tradição no processamento de maçã e grandes produtores mundiais de suco de maçã (PRADO et al., 2000).

Existem variedades de maçã que são mais adequadas para o processamento industrial e outras, para o consumo *in natura*. Czelusniak et al. (2003) classificaram maçãs comerciais e industriais de acordo com a razão entre os teores de açúcares totais e a acidez total, pois quanto mais baixa for esta razão mais interessante a variedade passa a ser para os processos industriais. Neste estudo os autores concluíram que as melhores variedades industriais são: Ana, Eva, Einshemer, Gala, Princesa e Rainha, no estado do Paraná; Golden Delicious e Wille Sharp, no estado do Rio Grande do Sul e Primícia e Melrose no estado de Santa Catarina.

O suco e os demais derivados da maçã são elaborados, principalmente, a partir de frutas que não alcançam o padrão exigido para consumo, com defeitos relacionados ao aspecto, tamanho e uniformidade e ainda são destinadas ao processamento as maçãs que apresentam em sua superfície picadas de insetos, injúrias mecânicas, cicatrizes na epiderme, má formação do fruto e problemas

fitossanitários (MELLO, 2004). Essas frutas podem estar contaminadas com fungos, causadores de deterioração e produtores de metabólitos tóxicos, as micotoxinas (FERNANDEZ, ARIAS-VERDES & SERSA-ESPINOSA, 2001).

1.3 Fungos

Um grande número de fungos produz metabólitos secundários tóxicos, as micotoxinas, que desempenham um importante papel na contaminação de alimentos destinados ao consumo humano e animal (HARISSON, 1989; ABARCA et al., 2001). Entretanto, o desenvolvimento dos fungos não está necessariamente associado com a produção de micotoxinas. Dentro de uma espécie, o potencial micotoxigênico do fungo depende largamente da cepa, bem como da composição física e química da matriz colonizada pelo fungo e de fatores ambientais (DRUSCH & RAGAB, 2003).

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

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

1.4 Micotoxinas

As micotoxinas mais comumente encontradas em alimentos são as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, fumonisinas, ácido ciclopiazônico, ácido penicílico, zearalenona, citrinina e patulina (JELINEK et al., 1989; SCOTT, 2001). Os

principais gêneros de fungos associados à contaminação de alimentos e as respectivas micotoxinas produzidas estão destacados na tabela 1.

Estes compostos são produzidos sob condições específicas, que geralmente são independentes das requeridas para o crescimento dos fungos. A produção destes metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores, entre eles a umidade relativa do ar, a temperatura, a umidade, a composição do substrato, a atividade de água, o pH e a linhagem do fungo contaminante (TANIWAKI & SILVA, 2001).

Tabela 1. Micotoxinas presentes em alimentos contaminados

Toxinas	Espécie fúngica	Alimentos
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	amendoim, milho
Ocratoxinas	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. sclerotiorum</i> <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. carbonar</i> , <i>A. niger</i>	nozes, castanha, arroz, trigo, feijão, café
Patulina	<i>A. terreus</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>Penicillium citeonigrum</i> <i>P. expansum</i> , <i>P. variabile</i> , <i>P. roqueforti</i> <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. canescens</i>	maçã, uva, cereja, pêssego, pêra, abacaxi, banana
Zearalenona	<i>Fusarium equiseti</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	milho

Fonte: (TANIWAKI & SILVA, 2001)

As micotoxinas podem ser carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e estrogênicas (DICKENS & JONES, 1961; PERAICA et al., 1999; PHILLIPS, 1999; BENNETT & KLICH, 2003). Em geral, animais são diretamente expostos a micotoxinas pelo consumo de ração mofada. A exposição humana pode se dar através de duas vias: exposição direta, devido ao consumo de produtos de alimentos mofados ou exposição indireta, pelo consumo de produtos animais contaminados (carne, leite e ovo) contendo quantidades residuais de micotoxinas ingeridas pelos animais (DAVIES & DIENER, 1987).

Estes contaminantes apresentam impacto significativo na economia, causando perdas de animais ou apresentando problemas na sua criação ou pela

produção de produtos inaceitáveis no comércio nacional e internacional devido à presença de níveis que não atendam os regulamentos existentes (SCOTT, 1984). Deste modo, as micotoxinas são consideradas um importante problema mundial em termos de saúde pública, agricultura e economia (DAVIS & DIENER, 1987).

1.5 Micotoxinas em frutas

A maioria das frutas tem alta acidez. O pH das frutas varia entre 2,5 e 5 e esta faixa é considerada o mais importante fator na determinação dos tipos de microrganismos que podem deteriorar essa classe de alimentos (STINSON et al., 1980).. Os fungos, capazes de tolerar essa faixa de pH, são os principais microrganismos deteriorantes de frutas e de produtos derivados de frutas (PITT & HOCKING, 1997).

As frutas tornam-se mais susceptíveis à invasão de fungos durante a maturação, pois o pH dos tecidos aumenta, a casca torna-se mais macia, carboidratos solúveis são formados e as barreiras de defesa se enfraquecem (STINSON et al., 1981). A contaminação de derivados de frutas com micotoxinas geralmente resulta do uso de frutas com qualidade deficiente no processamento (SYDENHAM et al., 1995). A tabela 2 mostra derivados de frutas, as micotoxinas e as concentrações detectadas.

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

Tabela 2. Incidência de micotoxinas e concentração máxima detectada em derivados de frutas.

Tipo de produto	Micotoxina	Amostras positivas/ amostras analisadas	Concentração máxima detectada	Referência
Suco de maçã concentrado	Patulina	215/215	376 µg/L	Gökmen & Acar (1998)
Suco de maçã concentrado	Alternariol	17/32	5,42 µg/L	Delgado & Gómez-Cordovés (1998)
	Alternariol	17/32	1,71 µg/L	
Suco de maçã	Aflatoxina B1, G1	5/5	30 µg/L	Abdel-Sater et al. (2001)
Suco de maçã	Patulina	27/45	733 µg/L	Yurdun et al. (2001)
Vinho	Ocratoxina A	24/24	0,39 µg/L	Shephard et al. (2003)
Vinagre de maçã	Patulina	0/3	-	Ritieni (2003)
Alimento infantil de maçã	Patulina	2/10	17,7 µg/L	
Vinho	Ocratoxina A	45/116	0,76 ng/mL	Blesa et al. (2004)
Suco de maçã	Patulina	42/42	285,3 µg/L	Cheraghali et al. (2005)
Suco de uva	Ocratoxina A	0/38	-	Shundo et al. (2006)
Vinho	Ocratoxina A	27/63	1,33 ng/mL	
Suco de uva	Ocratoxina A	14/48	100 ng/L	Chulze, Magnoli & Dalcero (2006)
Polpa de uva	Ocratoxina A	2/16	35,4 ng/L	
Suco de maçã	Patulina	47/135	55,41 µg/L	Spadaro et al. (2007)

1.6 Patulina

1.6.1 Características físico-químicas

A patulina é uma lactona de nome química 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona (Figura 1) e seu peso molecular é de 150,12. Forma cristais incolores, tem ponto de fusão de 111°C, é solúvel em água, etanol, acetona, acetato de etila, éter e clorofórmio, mas é insolúvel em benzeno e éter de petróleo. Sua quantidade é reduzida por estocagem prolongada, ação de sulfito, alta temperatura, adição de ácido ascórbico, fermentação alcoólica e tratamento com carvão ativo e resinas sintéticas. A patulina perde sua atividade biológica em meio alcalino e em presença de moléculas contendo grupo sulfidrilais tais como cisteína e glutatona (CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS, 1998).

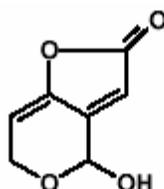


Figura 1: Estrutura da patulina (Fonte: The Merck Index, 1996)

1.6.2 Fungos produtores de patulina

A patulina é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssosclamyces* e principalmente por *P. expansum*, *A. clavatus* e *B. nivea* (STEIMAN, EIGLE & KRIVOBOK, 1989; PITT & HOCKING, 1997; FRISVAD et al., 2004). As espécies de *Penicillium* que já foram

identificadas como produtoras de patulina são: *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* e *P. vulpinum* (FRISVAD et al., 2004).

Penicillium spp. é certamente o fungo toxigênico de maior incidência em maçãs, cresce em atividade de água (a_w) entre 0,83 a 0,99 e tem capacidade de tolerar até 80% de sacarose (p/v) no meio de crescimento. É considerado como parasita de fermentos, causando podridão de coloração azul na parte externa da maçã (Figura 2) e bege ou marrom-clara no tecido, deixando o tecido encharcado e mole (HEFNAWY & ABOU-ZEID, 2003).



Figura 2. Podridão causada por *P. expansum* (mofo azul)

Salienta-se a importância do *P. expansum* devido à frequência de detecção durante o armazenamento de frutas (TANIWAKI et al., 1989; BURDA, 1992; GÖKMEN & ACAR, 1998). O *P. expansum* já foi determinado em maçãs, cerejas, pêssegos, nectarinas e pêras (KARABULUT & BAYKAL, 2002; KARABULUT et al., 2002; VERO et al., 2002; VENTURINI et al., 2002).

P. expansum tem sido relatado como responsável por 70 a 80% da deterioração de frutas armazenadas (VIÑAS et al., 1993). O armazenamento das frutas a baixas temperaturas não é suficiente para prevenir a formação de micotoxinas, pois o *P. expansum* é capaz de crescer e produzir patulina em temperaturas menores que 5°C (NORTHOLT & BULLERMAN, 1982).

Sydenham et al. (1997) estudaram a influência da estocagem em ambiente aberto de maçãs durante 7, 15 ou 33 dias sobre os níveis de patulina no suco de maçã. Segundo os autores esta prática de armazenamento é comum em países da África onde o estudo foi realizado. Os resultados mostram que houve um aumento significativo na quantidade de frutas deterioradas juntamente com o aumento significativo na concentração de patulina durante o tempo de armazenamento. E de acordo com as análises microbiológicas e químicas, a remoção de frações estragadas das frutas reduz significativamente a quantidade total de fungos e patulina nos sucos.

O gênero *Byssochlamys* possui duas espécies economicamente importantes, *B. nivea* e *B. fulva*, sendo que ambas causam deterioração de frutas e produtos processados a partir das mesmas. Este gênero de fungos é o principal causador da deterioração pós-tratamento térmico em derivados de frutas (TOURNAS, 1994).

B. nivea e *B. fulva* estão presentes no solo que é a fonte inicial de contaminação de frutas. Quando presentes, estes fungos se desenvolvem rapidamente em alimentos à base frutas, onde as condições de acidez e teores de açúcares são ideais (KING et al., 1969). *B. nivea* e *B. fulva* causam problemas consideráveis para a indústria de alimentos, porque ocorrem em produtos de grande significado econômico, como sucos de frutas, geralmente conservados pela pasteurização (PITT & HOCKING, 1997). O suco de maçã é um excelente substrato para o crescimento de *B. nivea*, com produção de patulina em uma faixa de temperatura variando de 12-37°C (ROLAND & BEUCHAT, 1984).

Os ascósporos de *Byssochlamys* são capazes de resistir à temperatura de 87°C por 30 minutos em sucos de frutas. Estes ascósporos resistentes ao tratamento térmico empregado no processamento de frutas podem germinar, crescer e assim deteriorar produtos durante o armazenamento a temperatura ambiente (OLLIVER & RENDLE, 1934).

1.6.3 Toxicologia da patulina

Desde 1941, a patulina tem sido objeto de estudo, primeiramente por sua ação como antibiótico e depois por suas propriedades fitotóxicas e carcinogênicas. A patulina foi relatada como sendo tóxica para ratos (BROOM et al., 1944), teratogênica para embriões de galinha (CIEGLER, 1976) e imunossupressora em camundongos e coelhos (ESCOULA et al., 1988).

Em 1986, a Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer, concluiu que não há evidências suficientes sobre a carcinogenicidade da patulina em animais e que não se pode fazer qualquer afirmação sobre a carcinogenicidade em humanos. Entretanto, nas últimas décadas, inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de evidenciar a toxicidade dessa micotoxina (IARC, 1986).

Ao nível celular, a patulina tem mostrado efeitos incluindo rompimento da membrana de células plasmáticas (MAHFOUD et al., 2002) e inibição da síntese de DNA (WICHMANN et al., 2003). Segundo Arafat e Musa (1995) a patulina inibe o crescimento e a síntese de proteína em cultura de tecido hepático e isso se deve ao bloqueio da captação dos aminoácidos através da membrana e também à sua incorporação na proteína.

Além disso, a patulina, em estudo *in vitro* se mostrou capaz de inativar várias enzimas incluindo as polimerases de ácido ribonucléico e de ácido desoxirribonucléico. Isto também afeta a transcrição e a tradução, tendo um efeito direto no DNA (CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS, 1998). Esta propriedade de inativar enzimas ocorre principalmente como uma consequência da formação de ligações covalentes com células essenciais contendo grupos sulfidril ou tiol (SH) (ARAFAT & MUSA, 1995; FLIEGE & METZLER, 1999). A afinidade pelos grupos SH também é responsável, em termos de mecanismos bioquímicos, pelos efeitos tóxicos da patulina em várias células (LIU et al., 2006; MAHFOUD et al., 2002). O conhecimento sobre a reatividade da micotoxina poderá ajudar a caracterizar os mecanismos de citotoxicidade e efeitos genéticos desta toxina

na molécula base, e possivelmente, facilitar o desenvolvimento de biomonitoração da patulina, com base nas estruturas químicas formadas (FLIEGE & METZLER, 2000).

A patulina causou danos ao fígado e rins de ratos (HIROS et al., 1982; SPEIJERS et al., 1988), além de revelar toxicidade ao sistema imunológico (BONDY & PETSTKA, 2000). Em humanos, os efeitos tóxicos da patulina ainda não são conclusivos, mas já foram relatados náuseas, distúrbios gastrintestinais e vômito em decorrência do consumo de derivados de maçã contaminados com essa micotoxina (LAI et al., 2000).

Rychlik et al. (2004) estudando a absorção de patulina em estômago de ratos demonstraram que uma pequena quantidade da toxina ultrapassou a parede gástrica, sendo que a maior parte desapareceu por meio de mecanismos desconhecidos. Segundo os autores, a micotoxina pode ter se ligado a proteínas ou ter sido degradada a metabólitos que podem também ser tóxicos. E é improvável que a toxicidade seja sistemática, já que a patulina é degradada depois da absorção no trato gastrintestinal e provavelmente leva apenas a efeitos tóxicos locais.

A patulina mostrou genotoxicidade e possível atividade mutagênica em células mamárias de ratos em estudo *in vitro* (SCHUMACHER et al., 2004). Schumacher et al. (2005) relataram que a patulina é uma genotoxina ao estudar a mutagenicidade da patulina em células V79 de pulmão de hamster chinês.

A patulina exerceu efeitos sobre a tireóide, testículos e níveis hormonais de ratos machos em fase de crescimento, mas não afetou o crescimento dos mesmos (SELMANOGLU & KOÇKAYA, 2004). Além disso, a patulina afetou a morfologia do esperma de ratos machos, diminuiu a quantidade de esperma e causou mudanças histopatológicas no epidídimo e próstata (SELMANOGLU, 2006).

Após vários estudos em ratos determinou-se que a dose letal (DL 50) da patulina para estes animais varia de 15 a 35 mg/kg, dependendo do modo de administração (CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS, 1998).

Na Bélgica, uma neurotoxicose fatal ocorreu em bovinos. Os sinais clínicos começaram com fraqueza das patas, ataxia e tremor muscular; progressivamente, paralisia e tetraplegia. Em 16 dias, 30 animais foram intoxicados e

10 morreram. Depois de realizada a necropsia nos animais e análises de fungos e toxinas na ração (grãos de cevada), concluiu-se que *Aspergillus clavatus* foi o fungo predominante na ração. A análise multitoxina revelou a presença de verruculogeno e também patulina na concentração de 20 µg/g de ração (SABATER-VILAR et al., 2004).

Células humanas têm sido usadas para avaliar a toxicidade desta micotoxina, que contribuiu para danos no DNA ao se expor culturas de células embrionárias de rim a diferentes concentrações da toxina (WU et al., 2005). A indução do dano oxidativo do DNA é discutido baseando-se na observação de que essa micotoxina reage com o antioxidante celular glutathione (FLIEGE & METZLER, 2000) e poderia diminuir sua capacidade antioxidante (LIU et al., 2003).

Estudos indicam que a patulina está associada a danos no trato gastrointestinal, incluindo úlceras e inflamação do estômago e intestino. Para caracterizar o mecanismo envolvido nos danos intestinais, Mahfoud et al. (2002) expuseram dois tipos de células epiteliais humanas a micotoxina. O resultado do estudo sugeriu que a patulina reage com a cadeia lateral do resíduo de cisteína na proteína fosfatase de células epiteliais intestinais, resultando na perda da atividade da fosfatase, que é responsável pelo decréscimo da resistência transepitelial. Além disso, a patulina aumenta o risco de desenvolvimento de alergia em células T de humanos (WICHMANN et al., 2003).

Em 1995, o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) estabeleceu como ingestão diária tolerável máxima provisória (PMTDI) a dose de 0,4 µg/kg de peso corpóreo (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001). Embora as avaliações revelem que a exposição da população europeia está bem abaixo da PMTDI, grupos específicos de consumidores, especialmente os recém nascidos, estão mais expostos, pois eles tendem a consumir mais produtos derivados de maçã (DRUSCH et al., 2007).

1.6.4 Ocorrência de patulina

A maçã constitui o principal substrato para a produção de patulina por *P. expansum* (BULLERMAN, 1979; SANDERSON & SPOTTS, 1995). A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas do fruto. Sendo que, a intensidade de difusão dessa micotoxina é de 1 cm em direção ao tecido sadio (TANIWAKI et al., 1992). Rychlik e Schieberle (2001), entretanto, encontraram patulina a 2 cm além do tecido deteriorado de maçãs. Em estudo semelhante, a difusão de patulina em pêras foi de 0,6 cm (LAIDOU et al., 2001). Já em tomates, a micotoxina penetra em toda a fruta. Isto ocorre, devido ao alto conteúdo de água e baixa quantidade de polissacarídeos estruturais que o tomate possui, assim o coeficiente de difusão da patulina em tomates é maior do que em maçãs (RYCHLIK & SCHIEBERLE, 2001).

Nos últimos anos várias pesquisas têm sido focadas na ocorrência de patulina em suco de maçã em diversos países (Tabela 3). Em todos os países pesquisados foram encontradas amostras contaminadas com a toxina. Porém os dados ainda são insuficientes para uma conclusão a respeito da incidência de patulina nestes países. Rodrigues-Amaya e Sabino (2000) sugerem que mais pesquisas sobre a incidência da patulina em alimentos no Brasil sejam realizadas, devido a divergências nos resultados.

Malmauret et al. (2002) e Piemontese et al. (2005) observaram que maçãs orgânicas apresentam maiores níveis de patulina que maçãs convencionais. Segundo os autores, esta maior contaminação nas frutas orgânicas se deve ao não tratamento com fungicidas, o que provavelmente resultou em maior incidência de fungos toxigênicos e, conseqüentemente, de patulina nessas frutas.

Tabela 3. Ocorrência de patulina em suco de maçã em alguns países.

País	n*	Amostras positivas (%)	Intervalo patulina ($\mu\text{g/L}$)	Referência
Brasil	30	1 (3)	< 17	Sylos & Rodrigues-Amaya (1999)
EUA	10	2 (20)	80 – 110	Trucksess & Tang (1999)
Turquia	482	162 (34)	50 – 376	Gökmen & Acar (2000)
Brasil	13	1 (8)	< 10	Prado et al. (2000)
África do Sul	20	6 (23)	5 – 45	Leggott & Shephard (2001)
Cuba	20	1 (5)	<1,72	Fernandez et al (2001)
Suécia	39	5 (13)	2 – 50	Thurvander et al. (2001)
Turquia	45	27 (60)	19,1 – 732,8	Yurdun et al. (2001)
Itália	21	5 (24)	5,8 – 56,4	Ritieni (2003)
Bélgica	43	35 (81)	0,7 – 17,3	Tangni et al. (2003)
Japão	76	15 (20)	1,4 – 45,6	Ito et al. (2004)
Irã	23	18 (78)	15 – 149	Cheraghali et al. (2005)
Itália	67	28 (42)	0,07 – 69,3	Piemontese et al. (2005)
Brasil	27	3 (11)	3 – 7	Iha & Sabino (2008)

* número de amostras analisadas

1.6.5 Legislação sobre patulina

Na maioria dos países, incluindo o Brasil, ainda não há legislação para controle dos níveis de patulina em alimentos. Na tabela 3 observa-se que os países que tem legislação seguem a recomendação da Organização Mundial da Saúde que indica um nível máximo aceitável de 50 $\mu\text{g/L}$ de patulina em suco de maçã. A União Européia adotou recentemente este mesmo nível máximo e também 25 $\mu\text{g/kg}$ em

produtos sólidos incluindo compota de maçã e purê de maçã e ainda o nível máximo permitido de 10 µg/kg é proposto para produtos de maçã destinados à crianças.

Tabela 4. Países que possuem legislação para patulina e o limite máximo permitido.

País	Tipo de alimento	Limite (µg/L ou kg)
Alemanha	Suco de maçã	50
Áustria	Sucos de frutas	50
Uruguai	Suco de frutas	50
Suíça	Sucos de frutas	50
Israel	Suco de maçã	50
França, Grécia	Suco de maçã e produtos derivados	50
Grécia	Suco de maçã e produtos de maçã	50
Itália	Suco de frutas	50
Noruega	Suco de maçã concentrado	50
Suécia	Sucos e frutas	50
Finlândia	Todos os alimentos	50
Romênia	Todos os alimentos	50
	Rações	30
República Tcheca	Todos os alimentos	50
	Alimentos para crianças	30
	Alimentos infantis	20

Fonte: FONSECA (2007).

No Brasil, o comércio interno de suco de fruta é pequeno, em torno de 5 a 7 litros anuais por habitante (IBGE, 2003). A produção e comercialização de sucos no Brasil são insignificantes quando comparadas com a Europa e aos Estados Unidos, onde o consumo de sucos de frutas alcança 30 litros anuais por habitante, destacando-se o suco de maçã, considerado como o mais popular e que entre os sucos de frutas ocupa a segunda posição em consumo no mundo (IBRAF, 2007).

Uma das principais preocupações em relação à contaminação do suco de maçã com a patulina é o fato de que o Brasil exporta este produto a países que possuem limites estabelecidos por legislação para esta micotoxina em sucos (MELLO, 2004).

1.6.6 Eliminação da patulina

1.6.6.1 Maçã

Uma das formas de evitar a contaminação por patulina é eliminar o fungo produtor da toxina. O hipoclorito de sódio, ao ser usado na lavagem de frutas, não permite a colonização de fungos e assim não ocorre produção de patulina (HASAN, 2000). Da mesma maneira, o peróxido de hidrogênio tem mostrado ser inibidor do crescimento de *P. expansum* (VENTURINI et al., 2002).

A diminuição da contaminação de *P. expansum* em maçãs em tanques pode ser feita utilizando-se a oxidação eletrolisada da água. Porém este processo possui o inconveniente do custo alto do equipamento e o consumo de energia elétrica (OKULL & LABORDE, 2004).

Outros estudos mencionam alternativas, como por exemplo, remoção das partes deterioradas do fruto antes do processamento (SYDENHAM et al., 1995; CHERAGHALI et al., 2005) e detoxificação biológica efetuada pela microbiota presente no próprio fruto (HARWIG et al., 1973; ROSS, 1995; WALKER et al., 1995; KARLOVSKY, 1999).

Sydenham et al. (1997) estudaram a influência do armazenamento de maçãs em ambiente aberto sobre os níveis de patulina e observaram que houve aumento da quantidade de frutas deterioradas juntamente com o aumento na concentração de patulina durante o período de armazenamento. O mesmo foi observado por Kadakal e Nas (2002) que verificaram que o aumento da fração deteriorada da maçã também resultava no aumento da concentração de patulina e que frutas com área deteriorada maior que 30% não devem ser usadas na produção de suco. Já o estudo de Martins et al. (2002) que analisaram 351 amostras de maçã

com 25 a 42% de áreas deterioradas, não revelou correlação entre a quantidade de patulina e o tamanho da porção deteriorada. De acordo com Beretta et al. (2000) maior concentração de patulina (1170 µg/kg) é encontrada na maçã com casca enquanto em amostras descascadas menor quantidade da toxina (93 µg/kg) é verificada.

1.6.6.2 Suco de maçã

O uso de conservantes durante o processamento industrial de frutas, capazes de preservar a qualidade dos produtos derivados, tornou-se uma necessidade para garantir a segurança alimentar. O metabissulfito possui a propriedade de degradar a patulina (ROSS, 1995). O ácido ascórbico e o ascorbato são aditivos permitidos em alimentos e sua presença em suco de maçã contribui para diminuição da concentração de patulina (BRACKETT & MARTH, 1979).

A adição de ácido ascórbico (500 mg/kg) e dióxido de enxofre (100 mg/kg) reduziu em 25% os níveis de patulina em suco de maçã (AYTAÇ & ACAR, 1994). Segundo Drusch et al. (2007), para uma rápida degradação da patulina pelo ácido ascórbico é necessária a presença de oxigênio e radicais livres. A oxidação do ácido ascórbico na presença de oxigênio e íons metálicos é uma possível fonte destes radicais. Devido ao baixo conteúdo de oxigênio no espaço livre das embalagens de sucos, a adição de ácido ascórbico antes do enchimento das embalagens não é uma eficiente estratégia de descontaminação.

As etapas iniciais do processamento de maçãs foram estudadas por Sydenham et al. (1995). A análise de patulina foi feita nas frutas antes da lavagem, depois da lavagem, depois da seleção e nas frutas estragadas. Os resultados indicaram diferença significativa entre os níveis de patulina nas maçãs antes da lavagem e depois da lavagem e seleção dos frutos. Isto demonstra que a remoção das partes danificadas e seleção das maçãs utilizadas na produção de suco é uma etapa importante para reduzir os níveis da micotoxina nos produtos derivados.

O ozônio degrada as micotoxinas presentes nos alimentos com destruição mínima de nutrientes. McKenzie et al. (1997) utilizaram uma solução contendo patulina que foi tratada com ozônio e observaram que ao utilizar alta concentração de ozônio (20%) em 15 segundos houve a degradação total da toxina.

O carvão ativado, por suas propriedades adsorventes, foi usado para reduzir os níveis de patulina em suco de maçã. No entanto, sabe-se que a aparência e o sabor do suco podem ser afetados pelo tratamento com carvão ativado (LEGGOTT et al., 2001; HUEBNER et al., 2000; KADAKAL & NAS, 2002). Um material constituído de partículas de carvão ativado ligado a grãos de quartzo foi desenvolvido e caracterizado por Huebner et al. (2000) para remover a patulina em solução aquosa. Para confirmar a eficiência do material desenvolvido foi utilizado um organismo aquático (*Hydra attenuata*) que possui baixa tolerância a toxinas. Sua sensibilidade a torna ideal para avaliar a toxicidade de diversos compostos químicos, como a patulina. Os resultados indicaram que o material estudado reduz em até 76% o nível de patulina em suco de maçã naturalmente contaminado.

O efeito da quantidade e do tempo de contato do carvão ativo sobre a concentração de patulina em suco de maçã foi estudado Kadakal e Nas (2002). O melhor resultado foi obtido utilizando-se 3 gramas de carvão ativo por litro de suco com tempo de contato de 5 minutos, em que foi obtida uma redução na concentração da micotoxina de 62,2 para 30,8 µg/kg.

A redução da quantidade de patulina durante o processo de clarificação do suco foi relatada por vários autores. Bissessur et al. (2001) estudaram alguns tipos de clarificação e constataram ser a centrifugação o mais efetivo, com redução de 20,5% do total da toxina. Ao comparar a clarificação utilizando filtro rotatório a vácuo e ultrafiltração, Acar et al. (1998) concluíram que o filtro rotatório é mais eficaz na redução da patulina, com redução de 39% nos níveis da micotoxina; a ultrafiltração possibilitou redução de 25% de redução dos níveis de patulina. Gökmen et al. (2001) estudaram alguns tipos de clarificação e concluíram que a forma mais eficiente de eliminar patulina do suco de maçã foi através do uso de gelatina e bentonita, seguido de tratamento com carvão ativo.

O uso de leveduras com o objetivo de degradar a patulina está bem elucidado. Harwig et al. (1973) eliminaram a patulina, submetendo o suco de maçã à fermentação por *Saccharomyces* spp. durante duas semanas. Em estudo realizado por Moss e Long (2002), a patulina foi eliminada na presença de *S. cerevisiae*, sob condições fermentativas, o que não ocorreu quando a levedura foi cultivada em condições aeróbias. Os mesmos autores também confirmaram que a degradação da patulina tem como produtos (Z)-ascladiol e (E)-ascladiol sendo este último o metabólito de maior incidência. Stinson et al. (1978) relataram a degradação completa de patulina durante a fermentação alcoólica de suco de maçã para produção de cidra. Sumbu et al. (1983) mostraram que a degradação de patulina por leveduras está associada a um mecanismo de defesa do microrganismo e depende da síntese de proteínas, uma vez que esta micotoxina não era degradada quando adicionada simultaneamente com cicloheximida, um inibidor de síntese protéica.

1.6.7 Métodos para análise de patulina

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de patulina, incluindo cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC). Alguns métodos de análise de patulina que foram publicados recentemente (Tabela 5). A maioria dos métodos utiliza, na etapa de preparação de amostras, a extração líquido-líquido (ELL) (VERO et al., 1999; SEWRAM et al., 2000; AKTAS et al., 2004; IHA & SABINO, 2006; LI et al., 2007). A ELL se baseia na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, orgânica e aquosa, sendo que a eficiência da separação está relacionada à afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (SHEPHARD & LEGGOTT, 2000). No entanto, a extração em fase sólida (EFS) também tem sido usada para extração e purificação de esta micotoxina do suco de maçã (EISELE & GIBSON, 2003; ITO et al., 2004; GÖKMEN

et al., 2005). Nestes métodos, o problema é o custo das colunas de extração, que é alto em relação à ELL.

A CCD foi um dos primeiros métodos desenvolvidos para determinação de patulina, caracterizado por ser simples, de baixo custo e não exigir equipamentos sofisticados. Este método envolve extração com acetato de etila e limpeza com solução de carbonato de sódio. A detecção e quantificação de patulina nas placas de sílica-gel são feitas pela formação de derivados fluorescentes. Isto ocorre através do borrifamento de 3-metilbenzotiazolinona hidrazona (MBTH), em que se obtém um limite de detecção de 20 µg/L (AOAC, 2000), ou através da exposição das placas de CCD a vapores de amônia e quantificação por fluorodensitometria com limite de detecção (LD) de 100 µg/L (DURAKOVIC et al., 1993).

A diálise bifásica pode ser utilizada para extração de patulina e foi relatada como satisfatória para determinação da concentração da micotoxina por CCD (PRIETA et al., 1992) e CLAE (PRIETA et al., 1993). Na diálise bifásica uma membrana semipermeável separa as duas fases imiscíveis, como água e solvente orgânico. Nesta técnica, a membrana contendo o solvente orgânico é agitada na matriz aquosa até que os analitos de interesse, que possuem baixo peso molecular, passem através da membrana, enquanto que as demais substâncias de maior peso molecular sejam retidas na fase aquosa. Esta técnica possui um processo simples de preparação da amostra, com economia de mão de obra e solventes (SHEU & SHYU, 1999).

Tabela 5. Métodos de análise de patulina

Extração	Limpeza	Técnica	LD (µg/L)	Recuperação (%)	Referência
Acetato de Etila	-	CLAE-UV	8,96	42-82,3	Batolomé et al. (1994)
Acetato de etila	Carbonato de sódio	CCD	12* ou 20**	78	Vero et al. (1999)
EFS: Oasis HLB, Waters	Bicarbonato de sódio, Ácido acético	CLAE-UV	5	93-104	Trucksess & Tang (1999)
Acetato de etila	Sílica-gel	CCD	20	-	AOAC (2000)
Acetato de etila	Carbonato de sódio	CLAE-UV	20	-	AOAC (2000)
Acetato de etila	Carbonato de sódio	CLAE-EM	4	96	Sewram et al. (2000)
Acetonitrila-4%KCl (9:1)	-	CCD	0,01µg/ ponto	90-95	Martins et al. (2002)
EFS: Oasis HLB, Waters	Bicarbonato de sódio, Ácido acético	CLAE-UV	10	92	Eisele & Gibson (2003)
EFS: Oasis HLB, GL-Pak PLS-2	-	CLAE-EM	-	>95	Ito et al. (2004)

(Continua....)

(...Continuação)

Extração	Limpeza	Técnica	LD (µg/L)	Recuperação (%)	Referência
EFS: Oasis HLB, Waters	-	CLAE-UV	3	92-96	Gökmen et al. (2005)
EFS: PVPP	EFS – C18	CLAE-UV	3	91-96	Gökmen et al. (2005)
Enzimas	EFS – C18 e Romer	CLAE-UV	25***	87	Boonzaaijer et al. (2005)
Acetato de etila	-	CLAE-DAD	3	81,1 – 91,7	Iha & Sabino (2006)
EFS: C18 ou	-	CLAE-UV	5	96,4 – 114,1	Li et al. (2007)
ELL: acetato de etila	Carbonato de sódio	CLAE-UV	5	75,2 – 89,2	

LD: limite de detecção; EFS: extração em fase sólida, CCD: cromatografia em camada delgada, CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta, CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por espectrometria de massas, CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos, ELL: extração líquido-líquido, *com MBTH (3-metilbenzotiazolinona hidrazona), **sem MBTH, *** limite de quantificação

A obtenção do derivado patulina-acetato através do processo de acilação antes da extração permitiu o aumento da estabilidade da micotoxina. A utilização deste procedimento juntamente com a determinação por cromatografia gasosa acoplada a detector por espectrometria de massas (CG/EM) em modo de íon seletivo permitiu um limite de quantificação de 10 µg/L e média de recuperação de 79% (SHEU & SHYU, 1999).

Rychlik e Schieberle (1999) desenvolveram dois métodos usando patulina com carbono marcado (C^{13}). A quantificação ocorreu no primeiro método por cromatografia líquida acoplada a detector por espectrometria de massas (CL/EM) sem derivatização e no segundo método por CG/EM depois da trimetilsilação da patulina. O método CG/EM mostrou melhor reprodutibilidade cujo coeficiente de variação de 9%, 96% de recuperação e LD de 12 ng/L, 100 vezes mais baixo comparado com o procedimento padrão (CLAE/UV).

A eletroforese capilar foi uma técnica desenvolvida para análise rápida de patulina com simples preparação da amostra e baixo custo (TSAO & ZHOU, 2000). Neste estudo a cromatografia capilar micelar eletrocínética foi utilizada com detector de fotiodo a 273 nm e o LD foi de 3,8 µg/L.

A CLAE acoplada a detector UV é um método comumente usado para determinação e quantificação de patulina, visto que esta toxina é relativamente polar e exibe amplo espectro de absorção (GÖKMEN & ACAR, 1996; YURDUM et al., 2001; GÖKMEN et al., 2005). A extração é feita com acetato de etila e a limpeza é realizada pela extração líquido-líquido com solução de carbonato de sódio 1,5%. O extrato de acetato de etila é seco com sulfato de sódio anidro, o solvente é então evaporado e o resíduo seco é dissolvido em água/ácido acético (pH 4) e analisado por CLAE/UV (AOAC, 2000). Há métodos de CLAE em fase normal e em fase reversa para determinação de patulina.

MacDonald et al. (2000) realizaram um estudo colaborativo para determinar patulina em suco de maçã utilizando CLAE/UV, acetato de etila como solvente extrator e bicarbonato de cálcio para limpeza. Participaram do estudo 14 laboratórios de 12 países, que receberam amostra em branco e amostras

contaminadas. De acordo com os resultados o desvio-padrão e da repetitividade foi de 8 – 35% e para a reprodutibilidade foi de 11 – 36%.

O 5-hidroximetilfurfural (HMF) é o interferente mais encontrado durante a análise de patulina por cromatografia líquida, pois apresenta propriedades cromatográficas similares devido a sua estrutura química ser semelhante a da patulina (SEWRAM et al., 2000). A determinação simultânea de HMF e patulina em suco de maçã por CLAE em fase reversa foi descrita por Gökmen e Acar (1999). Usando coluna de C18 e detector de fotiodo, o HMF e a patulina foram completamente separados com a fase móvel de água/acetonitrila (99:1, v/v). A recuperação de HMF variou de 86 a 100% e de patulina de 94 a 125%. O LD do HMF e patulina foram <0,01 mg/L e <5 µg/L, respectivamente.

1.7 Quantificação por Fotometria Fotográfica usando CCD

Tradicionalmente, a CCD é utilizada como um método quantitativo de análise através do uso da densitometria, que consiste em determinar a intensidade de cor apresentada pela substância-padrão e pela amostra (LIN et al., 1998). Vero et al. (1999) quantificaram patulina em derivados de maçã utilizando CCD e densitômetro com limite de detecção de 30 ng por ponto.

A comparação visual da intensidade da fluorescência dos padrões da micotoxina com a fluorescência da amostra pode ser utilizada como um método semiquantitativo de análise por CCD. Como alternativa às medidas semiquantitativas tradicionais das manchas fluorescentes das placas de CCD realizadas a olho nu, tanto dos padrões de micotoxina quanto de amostras pode ser utilizado o método de fotometria fotográfica com detectores carga acoplada (DCA), semelhante ao utilizado modernamente em astronomia para medir a luminosidade das estrelas e outros objetos (WALKER, 2004).

DCAs são detectores bidimensionais que contém um arranjo de sensores que podem captar uma imagem em frações de segundos (LANCASTER et al., 2005)

ou em tempo real (LANCASTER et al. 2006). A vantagem de um sistema fotométrico deste tipo é que a sensibilidade dos detectores DCA é muito maior que a do olho humano, além de que a sua resposta é linear, enquanto que a resposta do olho é logarítmica (lei fisiológica de Fechner). Assim, o DCA permite fazer acumulação da luz em exposições longas enquanto que o olho não permite esta acumulação. Em consequência, em um processo de contagem dos fótons acumulados pelo DCA, podem-se quantificar as medidas realizadas através dos padrões e, assim, calcular os erros inerentes às medidas. Com a realização de várias medidas os erros podem ser determinados com maior precisão (DOTTORI, 1998).

Métodos usando o DCA têm sido desenvolvidos para a análise quantitativa de aflatoxinas (LIANG et al., 1996), norfloxacin (SIMONOVSKA et al., 1999) e tetraciclina (LIANG et al., 1999). Estes métodos têm se mostrado rápidos e eficientes, pois o sistema DCA é suficientemente sensível para captar pequenas mudanças na intensidade da fluorescência (SIMON et al., 2001).

O aparelho utilizado para obter as imagens através do DCA pode ser o mesmo que se usa para realizar a observação ocular das amostras. O aparelho tem uma câmara escura, com uma lâmpada UV e com duas aberturas, uma para colocar a placa de CCD com os padrões e extratos de amostras aplicados e a outra para observação. Na abertura destinada à observação é adaptada uma câmera fotográfica com boa resolução.

O processo de medida consiste em tomar cinco fotografias simultâneas do padrão e da amostra. Estas imagens digitais podem ser avaliadas com um *software* específico de fotometria que mede a intensidade dentro de uma área (ou diafragma) pré-determinada. Pela simetria das manchas são utilizadas aberturas circulares do tamanho das mesmas (WALLIS & PROVIN, 1994).

1.8 Validação de método

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação. O principal objetivo é demonstrar que o procedimento analítico é adequado para seus propósitos (FDA, 1995).

Órgãos internacionais como: *Association of Official Analytical Chemist International* (AOAC, GARFIELD et al., 2000), *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, THOMPSON et al., 2002), *International Conference on Harmonisation* (ICH, FDA, 1995), *Codex Alimentarius* (CODEX COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING, 2005) publicaram parâmetros que devem ser utilizados para a validação de métodos. No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, BRASIL, 2003) publicaram normas de validação.

1.8.1 Curva padrão / linearidade

A linearidade é definida como a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade está relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão (BRASIL, 2003).

Para a construção da curva padrão o ICH (ICH, 1996) e a ANVISA (BRASIL, 2003) recomendam usar no mínimo 5 pontos dentro da faixa de concentração específica. A linearidade deve ser checada através da construção dessa curva padrão com pontos cobrindo a faixa de concentração esperada. A IUPAC (THOMPSON et al., 2002) recomenda que esse intervalo deve compreender 0-150 ou 50-150% da concentração provável de ser encontrada, dependendo qual destes é mais adequado.

1.8.2 Recuperação

Uma amostra teste original e uma amostra contaminada com uma quantidade conhecida do analito são analisadas pelo método que está sob validação. A diferença entre os resultados das duas análises, proporcional ao analito adicionado é a recuperação do método (THOMPSON, 2002).

1.8.3 Precisão

Precisão é a concordância ou repetitividade entre os resultados de um conjunto de replicatas ou a concordância entre observações repetidas feitas sobre as mesmas condições. A precisão de um método analítico pode ser expresso como o desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; THOMPSON et al., 2002; CODEX COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING, 2005; ICH, 1996).

1.8.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito que pode ser determinada quantitativamente com aceitável nível de exatidão e precisão (GARFIELD et al., 2000). Concentrações abaixo do limite de quantificação não devem ser relatadas, mas podem ser indicadas como presença do analito ou como um número semiquantitativo (BRESSOLLE et al., 1996).

1.8.5 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de uma substância na amostra que pode ser diferenciada de zero (THOMPSON et al., 2002). O *Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling* (2005) define LD como a quantidade ou conteúdo de um analito que corresponde ao menor sinal medido com certa confiança estatística que pode ser interpretada como um indicativo que o analito está presente em uma solução/amostra analítica, mas não necessariamente permite quantificação.

CAPÍTULO 2

Artigo: Fate of apple juice production using apple naturally contaminated with *Penicillium* spp.

Submetido no periódico: Journal of Food Science

**Fate of apple juice production using apple naturally contaminated with
Penicillium spp.**

J.E. Welke¹, M. Hoeltz¹, H.A. Dottori², I.B Noll¹

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91501970, Porto Alegre, Brazil

²Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91501970, Porto Alegre, Brazil

Abstract

The purpose of this study was to determine the predominant fungal species, including toxigenic strains, patulin levels in apples used for juice production and in produced juices. The possibility of use apple highly contaminated with patulin to produce apple juice with lower patulin levels than the limit permitted by Codex Alimentarius was also checked. Sixteen lots of apples and juices were analyzed. The most prevalent fungal population was *Penicillium* spp. (93%) followed by the *Aspergillus* spp. (3.5%) and the *Rhizopus* spp. (3.5%). *P. expansum* was identified as the most frequently isolated specie (66%). Species able to produce patulin were *P. expansum* and *P. griseofulvum*. Patulin levels in apples stored for 4 months at 1°C ranged from 254.6 to 653.4 µg/kg. Apple juice processing caused average reduction of 95% in patulin levels. Patulin levels ranged from 15 to 46.7 µg/L in apple juices. In all samples were found patulin levels lower than the limit of 50 µg/L considered acceptable by the Codex Alimentarius Commission.

Keywords: apple, juice production, Mycological survey, patulin, *Penicillium*

Introduction

Patulin is a mycotoxin produced by species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssochlamys*. *Penicillium expansum* is the most important fungal specie and It is responsible for blue mould rot, the major postharvest disease of apples worldwide (Morales and others 2008). Patulin has been reported as mutagenic (Schumacher and others 2005) and cause neurotoxic, immunotoxic, genotoxic and gastrointestinal effects in animals (Ciegler and others 1976; Speijers and others 1988; Liu and others 2003). Moreover, patulin is reported to be teratogenic (Ciegler and others 1976),

immunosuppressive (Speijers and Speijers 2004) and carcinogenic (Dickens and Jones 1961; Becci and others 1981).

Health risks posed by patulin necessitate its control and removal from apple products. Physical damages on apples surface as bruising and skin breakage provide the entry point for *P. expansum* and other patulin-producers species (Moake and others 2005). In general, fungal growth and patulin production are associated with damaged fruit (Sydenham and others 1995). But patulin can be found in sound tissues (Laidou and others 2001).

Apple juices are the most important source of patulin in human diet (WHO 1995). A maximum of 50 µg/L for patulin in apple juice was considered acceptable by the Codex Alimentarius Commission. The European Union recently adopted the same maximum level of 50 µg/L for apple juice and apple juice ingredients in other beverages and for apple products intended for infants and young children is allowed maximum patulin level of 10 µg/kg (The Commission of the European Communities 2006).

Within the food industry, patulin contamination in apples and their products is a cause of concern. Low quality apples from cold storage rooms are also used for apple juice production. Processing can play an important role in reducing the potential risks of mycotoxin-contaminated food commodities. Thus, it is important to evaluate the effect of processing on patulin to determine if the toxin level can be managed through post-harvest procedures. Information on patulin persistence and transformation during processing would be useful for the development of an effective food safety program.

The objective of this study was a) to investigate the mycoflora of apples used for juice production, b) to evaluate patulin levels in these apples and c) to determinate the effect of apple juice processing have on patulin levels.

Materials and methods

Sampling

In total, 320 apples cultivars Gala and Fuji divided into 16 lots (approximately 1000 apples per lot) from 2006 and 2007 harvesting seasons were obtained from a juice producer industry located in Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil.

Apples randomly sampled from cold storage at 1 °C for about 4 months were immediately analyzed.

Mycological analysis of apples

Isolation of mycoflora

Fungi colonies from apples with visual signs of fungal invasion were scraped and transferred to Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated for 5 days at 25 °C in dark (Pitt and Hocking 1997). Undamaged apples (without visible fungal invasion) were surface-disinfected with 1% sodium hypochlorite solution for 1 min and rinsed three times with sterile distilled water. The dilution plating method was used for fungi isolation. A total of 25 g of fruit were mixed with 225 mL of sterile 0.1% peptone water. Sequential decimal dilutions were carried out in the same diluent and 0.1 mL of 10^{-3} e 10^{-4} dilutions were spread on PDA and incubated at 25°C for 5 days in the dark. All fungi considered to represent different species were isolated to Sabouraud agar and incubated at 25 °C for 7 days in the dark (Samson and others 2002).

Identification of mycoflora

Conidial suspensions were inoculated at three equidistant points on Czapek Yeast Agar (CYA) at 4 °C, 25 °C and 37 °C, Malt Extract Agar (MEA), Creatine Sucrose Neutral Agar (CSN) and 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N) at 25 °C. After 7 days, each strain was identified using macroscopic and microscopic morphological criteria according to Pitt and Hocking (1997). These isolates were maintained in glycerol at 4 °C in Toxicology Laboratory at Food Science and Technology of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Patulin-producing ability

Patulin-producing ability of *Penicillium* and *Aspergillus* isolates were determined according to Labuda and Tancinová (2006). The isolates were grown on Yeast Extract Sucrose Agar (YES) for 7 days at 25 °C. Colony centers were transferred to vials containing the extraction solvent (chloroform:methanol, 2:1, v/v) and mixed in vortex for at least 1 min. Thirty microliter aliquots of extracts and patulin standard (10 µg/mL) were spotted on thin layer chromatography (TLC) plates (SIL G-25HR, Machery-Nagel and Co., Code No. 809033, Germany). The spots were dried and the plates developed in solvent system toluene:ethylacetate:formic acid (5:4:1 v/v/v)

The TLC plates were sprayed with 0.5% aqueous methyl-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate (MBTH) (No. 65875, Fluka, USA) and heated at 130 °C for 15 minutes. Patulin appeared as a yellow spot under visible light for reflection and transparency at the same time and a yellow-orange fluorescence spot under long wavelength UV light (366 nm). The TLC plate was sprayed with water-90% formic acid (98:2, v/v) until the layer appeared wet, and was left at room temperature for 30 min and then observed under 366 nm UV light, which improved the visualization of the yellow-orange fluorescence spots against the background (Martins and others 2002).

Determination of patulin in apples and apple juices

A modified version of the method used by MacDonald and others (2000) was used. Ten grams of apple or apple juice were extracted with 20 mL of ethyl acetate by mixing vigorously for 1 min using a vortex. The extraction was repeated twice using 20 mL portions of ethyl acetate.

Sample Clean-up

The organic phases were combined and extracted with 10 mL of sodium carbonate solution (1.5%, w/v) to remove phenolic acids. The phases were allowed to separate and the aqueous phase was extracted with 10 mL of ethyl acetate, which was combined with the preceding portion. Extracted samples were dried with anhydrous sodium sulfate and transferred to a silica gel column prepared in a glass tube filled with 8 g of silicagel (60, 70-230 mesh, Merck). The toxin was eluted from the column with 10 mL of ethyl acetate. After solvent evaporation, the extract was redissolved in known volume of chloroform. All samples were analyzed in duplicate.

Chromatography

Ten, twenty and thirty microliter aliquots of sample extract and patulin standard solution (10 µg/mL) were spotted 1 cm apart on TLC plates. The spots were dried, and the plates developed in solvent system toluene:ethyl acetate:formic acid (5:4:1 v/v/v) (Labuda and Tancinová 2006). Patulin identification was done according to Martins and others (2002).

CCD Imaging System

Patulin quantification was done following the methodology previously described by Welke and others (2008). The quantification of the fluorescence intensities from UV lamp were recorded by a charge-coupled device (CCD) camera. Images were taken in each experiment and were analyzed using IMSTAT software (image statistics) of IRAF (Image Reduction Astronomical Facility) package.

The recovery of the method was determined by analyzing of three apples and three apple juices. Recovery rates of patulin obtained by spiking apples with 200, 300 and 400 µg/kg in duplicate were 91, 92 and 88% respectively and the relative standard deviation (RSD) for repeatability was 4.3, 6.2 and 4.2, respectively. The recovery of patulin in apple juice spiked at 50, 100 and 200 µg/L was 93, 96 and 96% respectively; the RSD for repeatability was 4.9, 3.6 and 8.7 respectively for these concentrations. The limit of detection (LOD) was 0,005 µg and the limit of quantification (LOQ) was 14 µg/L. Linearity was determined by analyzing six calibration standards within the concentration ranging from 45 to 2100 µg/L which correspond a patulin concentration ranging from 15 to 700 µg/L in samples. The correlation coefficient was 0,996.

Patulin Standard Solution

A stock standard solution of patulin was prepared by dissolving 5 mg of pure crystalline patulin (Sigma, P-2639) in chloroform at concentration of 100 µg/mL. The standard solution was kept frozen (-18°C). The concentration of the patulin stock solution was determined by measuring the UV absorbance at 275 nm and calculated by using the molar extinction coefficient ϵ of 14600. The concentration of working standard solution in chloroform was 10 µg/mL (AOAC 2000).

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was applied to test the effect of processing on patulin levels in apple juices. SPSS, version 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA) for Windows was used for the statistical analysis of data.

Results and Discussion

Mycoflora of apples

Nine species belonging to three genera were isolated as the fungal flora apples. In total of the sixteen lots analyzed, 57 fungal colonies were isolated. The most

prevalent fungal population in investigated fruits was the *Penicillium* spp. (93%) followed by the *Aspergillus* spp. (3.5%) and the *Rhizopus* spp. (3.5%).

P. expansum showed a high level of incidence representing 66% from *Penicillium* species isolated and was isolated from all samples. *P. aurantiogriseum* (5.7%), *P. crustosum* (7.5%) and *P. griseofulvum* (9.4%) were isolated at moderate incidence. *P. glandicola*, *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum* and *P. commune* represented 1.9, 1.9, 3.8 and 3.8, respectively of *Penicillium* species isolated from apples. These results are in accordance with Hasan (2000) who identified *P. expansum* as the most frequently isolated fungi in healthy and rotten apples. Pianzzola and others (2004) working with apples in Uruguay also isolated *P. expansum* with high frequency. In addition, these studies showed the presence of other important fungi (for example *P. solitum*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus flavus*).

Patulin-producing ability

In the present study, 94.4% of 35 *P. expansum* isolates were able to produce patulin under the tested conditions. Moreover, 60% of 5 *P. griseofulvum* isolates were patulin-producers. Other species isolated were not patulin-producers under tested conditions.

As it was previously reported by Dombrink and Blackburn (2005), although *P. expansum* is frequently cited as the most likely source of patulin in apple juice, certain other *Penicillium* species, as *P. griseofulvum*, are capable of producing more patulin than strains of *P. expansum*. The apple juice industry should be alert to the possibility that *Penicillium* species other than *P. expansum* can be responsible for the occurrence of patulin.

Determination of patulin in apples

Patulin levels in the apples stored for 4 months at 1 °C are reported in Figure 1. In all lots of apples used for juice production were detected patulin. All apple samples were contaminated with patulin in levels ranging from 254.6 to 653.4 µg/kg. Patulin levels found in this work are higher than those reported by Piemontese and others (2005) in a survey of 22 apples, in which patulin was detected in 10 samples in levels ranging from 11.10 to 81.7 µg/Kg. In addition Martins and others (2002) analyzing 351 apple samples with rotten spots detected patulin levels ranging from 3.05 to 80.5 mg/kg.

Some juice industries, including the industry where the samples of this study were collected, prior to processing have stored apples in open deck storage for considerable periods of time. In apple juice production, patulin is accumulated before industrial processing begins (Sydenham and others 1995). Although decay proceeds slowly at cold storage temperatures, rapid development occurs when the fruit is transferred to a warm environment. Besides, patulin accumulation occurs quickly at ambient storage (McCallum and others 2002). Thus, this practice can be considered a critical control point since damaged fruits may be infected by *P. expansum* and *P. griseofulvum* and fungal contamination can increase during this period. When apples are infected with fungal spores it is quite difficult to avoid fruit spoilage even if fruits are stored at low temperatures (Jackson and others 2003). In our assay apples with high incidence of patulin were destined to juice production by studied industry.

Several technologies and strategies have been developed to prevent fruit spoilage, like postharvest fungicide treatment, storage at low temperature and controlled atmosphere storage. Morales and others (2007) in the study with apples stored at 1 °C suggest that, although apple decay cannot be totally prevented, patulin is not produced. Apples used for juice production in present study were stored on normal atmosphere cold storage condition, at 1 °C, and patulin was detected in all samples. However, studies have used controlled atmosphere to fruit storage, this practice is becoming common and it is an efficient practice to prevent fungal growth and consequently patulin production (Morales and others 2007; Baert and others 2007).

Determination of patulin in apple juices

In the present study, the possibility of the use of apples highly contaminated to produce apple juices with lower patulin levels than the limit permitted by Codex Alimentarius was checked. The patulin levels ranged from 15 to 46.7 µg/L in 16 lots of apple juices (Figure 1). All samples were found to exceed patulin concentration of 10 µg/L, which is the maximum permitted concentration established for apple products intended for infants and young children by The Commission of the European Communities. But these patulin levels were lower than the limit of 50 µg/L considered acceptable by the Codex Alimentarius Commission. It occurs when fruits decayed by

patulin-producers fungi are processed; patulin can be transferred into the fruit juice due to its solubility.

The results of ANOVA test in Table 1 show the effect of processing and apple lots used for juice production on patulin levels in apple juices. Processing of apple juice is a significant source of variation and explains 70% of total patulin reduction. Different lots of processed apple are also a source of variation, but explain only 20% of total variation. Besides processing and lots, 10% of total variation is explained by other factors. The variation in the levels of patulin between lots is expected because apples with different patulin levels are processed. Thus, a wide variation in the results of initial patulin levels in apples used for juice production between the sixteen lots was observed (Figure 1) illustrating that patulin levels may vary depending of quality of fruits used to juice production.

The results of this study indicate that it is possible to reduce patulin level in apple juices. Apple juice processing, which include seven stages (washing apples, milling, pressing, pasteurization, enzymatic treatment, microfiltration and evaporation) caused average reduction of 95% in patulin levels.

Conclusions

Our results indicate that *P. expansum* is the most important source of patulin in apples used fro juice production. The presence of patulin-producing fungi was frequently accompanied by apples contaminated with patulin. Furthermore, low temperature (1 °C) during the storage of apples for juice production is not enough to totally inhibit the fungal development and the subsequent mycotoxin production.

The frequent occurrence of *P. expansum* in apples, associated with the possibility of patulin production, points out to the importance of quality control at harvest and storage stages in order to avoid the risk toxin ingestion because patulin levels in apple juices depend on the quality of fruits used to processing. The processing can reduce patulin levels in juices produced. It is possible to produce apple juice with lower patulin levels than the limit of 50 µg/L, considered acceptable by Codex Alimentarius, using fruit with high levels of patulin.

References

- AOAC. 2000. Association of Official Analytical Chemist International. Official Methods of Analysis. Methods 974.18 e 995.10. 17th ed. Gaithersburg: MD. 1115 p.
- Baert K, Valero A, Meulenaer B, Samapundo S, Ahmed MM, Bo L, Debevere J, Devlieghere F. 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. Int J Food Microbiol 119:170-81.
- Becci PJ, Hess FG, Johnson WD, Gallo MA, Babish JG, Dailey RE, Parent RA. 1981. Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. J Appl Toxicol 1:256-63.
- Ciegler A, Beckwith AC, Jackson LK. 1976. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. App Environ Microbiol 31(5):664-7.
- Dickens F, Jones HCH. 1961. Carcinogenic activity of a series of related lactones and related substances. Br J Cancer 15:85-9.
- Dombrink-Kurtzman MA, Blackburn JA. 2005. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. Int J Food Microbiol 98:241-8.
- Hasan HA. 2000. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. World J Microbiol Biotechnol 16(7):607-12.
- Jackson LS, Beacham-Bowden T, Keller SE, Adhikai C, Taylor KT, Chirtel SJ, Merker RI. 2003. Apple quality, storage and washing treatments affect patulin levels in apple cider. J Food Protec 66:618-24.
- Labuda R, Tancinová D. 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. Ann Agric Environ Med 13:193-200.
- Laidou IA, Thanassoulpopoulos CC, Liakopoulo-Kyriakides M. 2001. Diffusion of patulin in the flesh pears inoculated with four post-harvest pathogens. J J Phytopathol 149:457-61.
- Liu BH, Yu FY, Wu TS, Li SY, Su MC, Wang MC, Shih SM. 2003. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins patulin and citrinin. Toxicol Appl Pharmacol 191(3):255-63.
- MacDonald S, Long M, Gilbert J, Felgueiras I, Brera C, Jørgensen K, Macho ML, Majerus P, Martins ML, Mevissen L, Michelet JY, Nuotio K, Pittet A, Szymanski L, Tucker N, Viladrich R, Voogt J, Wennemar A. 2000. Liquid chromatographic method

for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. *J AOAC Int* 83:1387-94.

Martins ML, Gimeno A, Martins HM, Bernardo F. 2002. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit Contamin* 19(6):568-74.

McCallum JL, Tsao R, Zhou T. 2002. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *J Food Protec* 65:1937-42.

Moake MM, Padilla-Zakour OI, Worobo RW. 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Com Rev Food Sci Food Safety* 1:8-21.

Morales H, Marin S, Rovira A, Ramos AJ, Sanchis V. 2007. Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical point for patulin accumulation. *International J Food Microbiol* 116:260-5.

Morales H, Sanchis V, Coromines J, Ramos AJ, Marin S. 2008. Inoculum size and interaction affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food Microbiol* 25:378-85.

Pianzola MJ, Moscatelli M, Vero S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Dis* 1:23-8.

Piemontese L, Solfrizzo M, Visconti A. 2005. Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Addit Contamin* 22(5):437-42.

Pitt JI, Hocking AD. 1997. *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic & Professional. 593p.

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvard JC, Filtenborg O. 2002. *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmecultures. 389 p.

Schumacher DM, Metzler M, Lehmann L. 2005. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells and its modulation by intracellular glutathione. *Arch Toxicol* 79(2):110-21.

Speijers GJA, Franken MAM, Van Leeuwen FXR. 1988. Subacute toxicity study of patulin in the rat: effects on the kidney and the gastrointestinal tract. *Food Chem Toxicol* 26:23-30.

Speijers GJA, Speijers MHM. 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol Lett* 151:91-8.

Sydenham EW, Vismer HF, Marasas WFO, Brown N, Schlechter M, Van der Westhuizen I, Rheeder JP. 1995. Reduction of patulin in apple juice samples – influence of initial processing. *Food Control* 6:195-200.

The Commission of the European Communities. 2006 n. 1881/2006 – L364/17. Brussels: Official Journal European Union. 14 p.

Welke JE, Hoeltz M, Dottori HA, Noll IB. 2008. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. *Food Control* doi:10.1016/j.foodcont.2008.02.001. Forthcoming.

WHO. 1995. World Health Organization, 44th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technical Report Series. Geneva: WHO. 38 p.

Acknowledgements

The authors thank the Toxicology Laboratory at the Institute of Food Science and Technology of the Federal University of Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the financial support and Coordenadoria para Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for the graduate scholarships.

Table 1. ANOVA analysis: effect of processing and apple lots used for juice production on patulin levels in apple juices.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-value	p-value
Processing	1019099.282	4	254774.821	104.394	<0.001
Lot	305067.050	15	20337.803	8.333	<0.001
Error	126906.234	52	2440.505		
Corrected total	1467644.906	79			

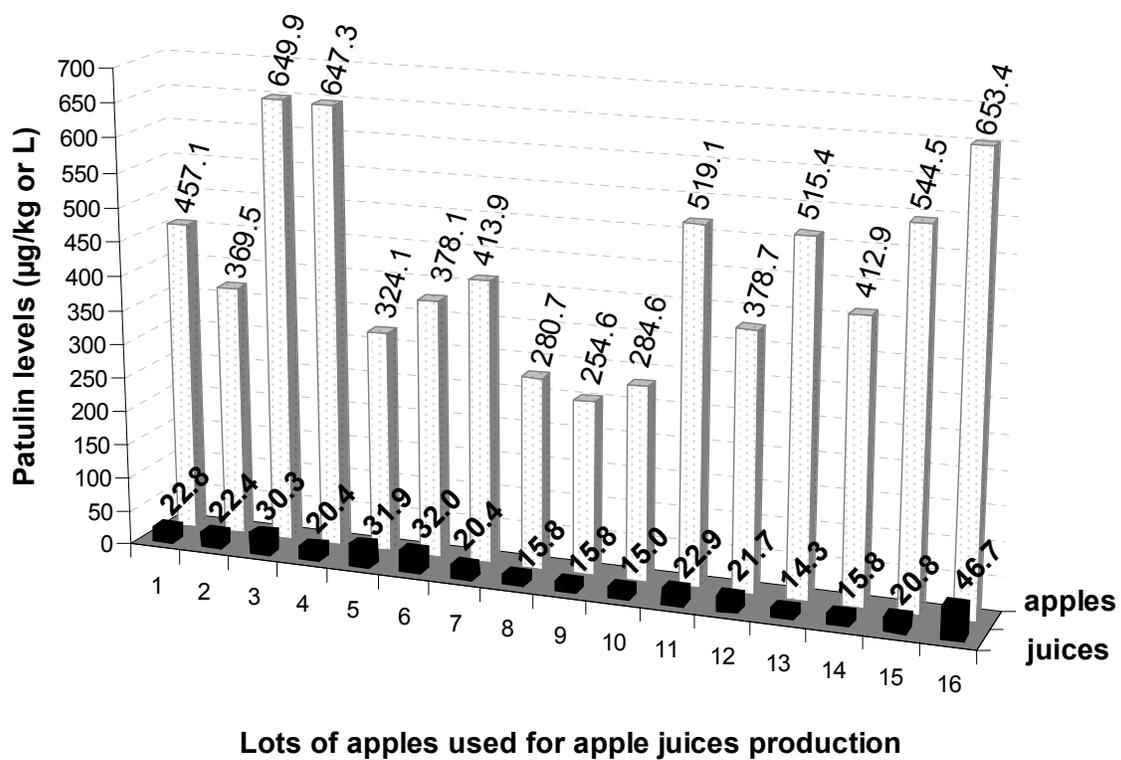


Figure 3. Patulin levels in apple samples stored for 4 months at 1°C and in apple juices produced using these apples.

CAPÍTULO 3

Artigo: Determination of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using charge-coupled device imaging

Submetido no periódico: Food Chemistry

Abbreviated running title: Determination of patulin in apple juice

Determination of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using charge-coupled device imaging

Juliane Elisa Welke^{a,1}, Michele Hoeltz^a, Horacio Alberto Dottori^b, Isa Beatriz Noll^a

^aInstitute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901 Porto Alegre, RS, Brazil

^bInstitute of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901 Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

A method was developed and validated in-house for determination of patulin in apple juice concentrate. The samples were extracted with ethyl acetate and the extracts were cleaned up by extraction with a sodium carbonate solution. The method showed an average recovery of 95%. The quantification and detection limit were 1.4 µg/L and 0.005 µg per spot, respectively. The results of validation confirmed the efficiency of the method, which is sensitive enough to be used in studies required to quantify patulin in apple juice especially in developing countries. The method was applied to the analysis of 16 apple juice concentrate samples and patulin levels ranged from 56.04 to 231.44 µg/L.

Key words: apple juice, charge-coupled device imaging, patulin, thin-layer chromatography

Introduction

Patulin (4-hydroxy-4H-furo[3,2c]pyran,2[6H]-one) is a mycotoxin produced by certain species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssoschlamys* (Sommer, Buchanan & Fortlage, 1974; Rice, Beuchat & Worthington, 1977). *Penicillium expansum* is the most common fungus isolated from decaying apples and causes blue mold rot during storage (Sanderson & Spotts, 1995; Vero et al., 2002).

Patulin is reported to be mutagenic and cause neurotoxic, immunotoxic, genotoxic and gastrointestinal effects in rodents (Hopkins, 1993). Due to its toxicity, the Joint

¹ Corresponding author. Tel.: +55 51 33087242; Fax: +55 51 33087048.

E-mail address: juliwelke@yahoo.com.br (J.E.Welke)

Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA) has established a provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) for patulin of 0.4 µg/kg body weight/day (WHO, 1995). Because of concern for human health and the possibility of using patulin as a quality indicator in foods, the World Health Organization (WHO) has established a maximum recommended concentration of 50 µg/L of patulin in apple juice. In addition, at least 15 European countries have established regulatory limits for patulin in various foods, usually apple and apple products, using the limit of 50 µg/kg (FAO, 1996).

Apple juices are the most important source of patulin in human diet (WHO, 1995). The contamination of apples with patulin is normally associated with spoiled tissue areas and although removing rotten tissue from the fruit can reduce patulin levels, penetration nevertheless occurs up to approximately 1 cm into the surrounding healthy tissue (Taniwaki et al., 1992).

During processing, some steps can reduce patulin content. The removal of decayed or damaged fruit or the trimming of mouldy portions of apples prior to processing can reduce patulin levels. Wash treatments alone cannot ensure that patulin is completely removed (Marín et al., 2006). Although patulin might be reduced in some processing steps, it is important to avoid accumulation of patulin in the apples before processing. It has been reported that no patulin is produced during cold storage (6 weeks) in decayed apples with lesions smaller than 3,5 cm and that patulin is primarily produced when apples are further stored at room temperature (Morales et al., 2007).

Many methods have been developed for measuring patulin in apple juice concentrate including thin layer chromatography (Prieta et al., 1992; Vero et al., 1999), liquid chromatography (MacDonald et al., 2000; Sewram et al., 2000; Ito et al., 2004; Gökmen, Acar & Sarioglu, 2005; Iha & Sabino, 2006; Wu, Hu & Wang, 2007), gas chromatography (GC) (Llovera et al., 2005) and micellar electrokinetic capillary electrophoresis (Tsao & Zhou, 2000). Most of these methods like GC and HPLC have very low detection limits of about 2 ppb of patulin but both GC and HPLC suffer from interferences and need costly equipment and time-consuming work-up procedures.

TLC is a fast, cheap and efficient method of separation and identification of many mycotoxins. Charge-coupled devices (CCDs) are two-dimensional detectors

containing an array of sensors which can image an area in seconds. The output from each sensor pixel on the CCD is a voltage, which is proportional to the intensity of light falling on the sensor and the exposure time. This series of voltages are digitalized and transferred to a computer for storage and data processing (Lancaster et al., 2005).

Imaging TLC using CCDs has been shown to achieve fast and efficient analysis (Hayakawa & Hirai, 2003; Liang et al., 1996; Simonovska et al., 1999, Liang, Simon & Denton, 1999). By coupling CCD detection with TLC, the entire TLC can be imaged in a single exposure yielding rapid quantification at shorter analysis time than of slit scanning densitometers.

In this study, a rapid, simple and economical method using TLC quantification through the fluorescence images from UV lamp recorded by a CCD camera was developed for determination of patulin in apple juice concentrate.

Materials and Methods

Samples

Sixteen apple juice concentrates (69° Brix) were obtained from a juice producer industry located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Sample preparation

Patulin extraction

A modified version of the method used by MacDonald et al. (2000) was used. Ten grams of apple juice were extracted with 20 mL of ethyl acetate by shaking vigorously for 1 min using a vortex mixer. The extraction was repeated twice using 20 mL portions of ethyl acetate.

Sample Clean-up

The organic phases were combined and extracted with 10 mL of sodium carbonate solution (1.5%, w/v) to remove phenolic acids. The phases were allowed to separate and the aqueous phase was extracted with 10 mL of ethyl acetate, which was combined with the preceding portion. Extracted samples were dried with anhydrous sodium sulfate and transferred to a silica gel column prepared in a glass tube filled with 8 g of Silicagel (60, 70-230 mesh, Merck). The toxin was eluted from the column

with 10 mL of ethyl acetate. After solvent evaporation, the extract was redissolved in known concentration of chloroform. All samples were analyzed in duplicates.

Chromatography

Ten, twenty and thirty microliter aliquots of sample extract and patulin standard solution (10 µg/mL) were spotted 1 cm apart on TLC plates (SIL G-25HR, Machery-Nagel and Co., Code No. 809033, Germany). The spots were dried, and the plates developed in solvent system toluene:ethylacetate:formic acid (5:4:1 v/v/v) (Labuda & Tancinová, 2006).

For identification of patulin, the plates were sprayed with 0.5% aqueous methylbenzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate (MBTH) (No. 65875, Fluka, USA) and heated at 130°C for 15 minutes. Patulin appeared as a yellow spot under visible light for reflection and transparency simultaneously and as a yellow-orange fluorescence spot under long wavelength UV light (366 nm). The TLC plate was sprayed with water-90% formic acid (98:2 v/v) until the layer appeared wet and then observed under 366 nm UV light, which improved the visualization of the yellow-orange fluorescence spots against the background (Martins et al., 2002).

CCD Imaging System

The quantification of the fluorescence intensities from UV lamp were recorded by a CCD camera. Five images were taken in each experiment and were analyzed using IMSTAT software (image statistics) of IRAF (Image Reduction Astronomical Facility) package.

Patulin Standard Solution

A stock standard solution of patulin was prepared by dissolving 5 mg of pure crystalline patulin (Sigma, P-2639) in chloroform at concentration of 100 µg/mL. The standard solution was kept frozen (-18°C). The concentration of the PAT stock solution was determined by measuring the UV absorbance at 275 nm and calculated by using the molar extinction coefficient ϵ of 14600. The concentration of working standard solution in chloroform was 10 µg/mL (AOAC 974.18, 2000)

Method validation

Validation of the analytical method was based on the following parameters: recovery percentage, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and precision and repeatability.

Recovery, linearity and precision were determined by analyzing of 3 apple juices samples spiked with 50, 100 and 200 µg/L of patulin. Within-day precision was determined by analyzing 4 replicates of spiked apple juice, and between-day precision was determined by analyzing 4 replicates during 4 days. The precision of the method was calculated from the standard deviation (SD). The LOD was derived from the sample fluorescence with the lowest detectable signals. The LOQ was obtained as the least amount of patulin in samples that can be quantitatively determined with accuracy and precision.

Results and discussion

The procedure used to extract patulin from apple juice was simple and practical. 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and patulin have similar chromatographic properties because of their chemical structures, and therefore, HMF is observed as the main interference in patulin determination. HMF is formed during heat treatment and storage of carbohydrates-rich products such as apple juices (Kadikal, Sebahattin & Poyrazoglu, 2002). The use of a column silica-gel improved the separation of patulin and HMF. The separation efficiency is demonstrated by the chromatogram of Figure 1. Each peak corresponds to one concentration of apple juice extract spotted on TLC plate.

For the extraction, sodium carbonate was added to retain some potentially interfering phenolic compounds in the aqueous phase. These matrix components elute together with patulin and influence the spectrum. Thus, sodium carbonate was effective for removing most of the co-extractives from apple juice.

Representative chromatogram obtained from TLC plate image taken by a CCD camera is shown in Figure 2. The CCD Camera system is sufficiently sensitive to see small changes in fluorescence intensity caused by illumination gradients from the UV light source. The change in fluorescence signal intensity corresponds to the different concentrations of patulin standard.

The validated in-house method showed good linearity. The linear regression coefficient of standard solution curve ($y = 1957.6x + 13793$) for patulin within the concentration range of 5 – 300 $\mu\text{g/L}$ was 0,996. The mean recovery of patulin was 95% with mean standard deviation of 5.7% (Table 1). The LOD value obtained was 0,005 μg per spot and the LOQ was 14 $\mu\text{g/L}$. The results of the within and between-day precision of the assay (Table 2) show that the method has good precision, with RSDs ≤ 11.7 .

Vero et al. (1999) used TLC scanning densitometry to quantitative determination of patulin in apple juice and the correlation coefficient was 0.999, the recovery was 78% and the LOD was 0.03 μg per spot. Prieta et al. (1992) described diphasic dialysis extraction and thin layer chromatography for determination of patulin, the LOQ was 50 $\mu\text{g/L}$ and recovery was 65%. The results of method validation obtained in this work are similar with those reported by Sheu & Shyu (1999) using GC/MS which LOQ was 10 $\mu\text{g/L}$ and the mean recovery was 93%.

The applicability of this method was tested analyzing 16 apple juice concentrate samples. Patulin was detected in all samples at levels ranging from 56.04 to 231.44 $\mu\text{g/L}$ (Table 3). Ito et al. (2004) analyzing 76 apple juice concentrate samples found patulin levels ranging from < 1 to 45.6 $\mu\text{g/L}$.

The method is fast, simple and economical. The CCD imaging system provides good sensitivity, precision and linearity for the quantitative determination of patulin. The results of validation confirmed the efficiency of the method, which is sensitive enough to be used in studies required to quantify patulin in apple juice.

Acknowledgements

The authors thank the Toxicology Laboratory (LabTox) at the Institute of Food Science and Technology of the Federal University of Rio Grande do Sul, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the financial support and Coordenadoria para Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for the graduate scholarships.

References

AOAC. (2000). Official Methods on Analysis of AOAC International. Method 974.18 Patulin in apple juice Thin-Layer Chromatographic Method, Natural Toxins.

- FAO. (1996). Worldwide regulations for mycotoxins. FAO and Nutrition Paper n.64.
- Gökmen, V., Acar, J. & Sarioglu, K. (2005). Liquid Chromatographic method for determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 543(1-2), 64-69.
- Hayakawa, T. & Hirai, M. (2003). An assay of ganglioside using fluorescence image analysis on a thin-layer chromatography plate. *Analytical Chemistry*, 75(23), 6728-6731.
- Hopkins, J. (1993). The toxicological hazards of patulin. *Food and Chemical Toxicology*, 31(6), 455-456.
- Iha, M. H. & Sabino, M. (2006). Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 89(1), 139-143.
- Ito, R., Yamazaki, H., Inoue, K., Yoshimura, Y., Kawaguchi, M. & Nakazawa, H. (2004). Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7464-7468.
- Kadalkal, C., Sebahattin, N. & Poyrazoglu, E. S. (2002). Effect of commercial processing stages of apple juice on patulin, fumaric acid and hydroxymethylfurfural (HMF) levels. *Journal of Food Quality*, 25(4), 359-368.
- Labuda, R. & Tancinová, D. (2006). Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13, 193-200.
- Lancaster, M., Goodall, D. M., Bergström, E. T., McCrossen, S. & Myers, P. (2005). Quantitative measurements on wetted thin layer chromatography plates using a charge coupled device camera. *Journal of Chromatography A*, 1090(1-2), 165-171.
- Li, J., Wu, R., Hu, Q. & Wang, J. (2007). Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food Control*, 18(5), 530-534.
- Liang, Y., Baker, M. E., Yeager, B. T. & Denton, M. B. (1996). Quantitative Analysis of Aflatoxins by High-Performance Thin-Layer Chromatography Utilizing a Scientifically Operated Charge-Coupled Device Detector. *Analytical Chemistry*, 68(22), 3885-3891.

- Liang, Y., Simon, R. E. & Denton, M. B. (1999). Utilization of a scientifically operated charge-coupled device detector for high-performance thin-layer chromatographic analysis of tetracyclines *Analyst*, 124(11), 1577-1582.
- Llovera, M., Bacells, M., Torres, M. & Canela, R. (2005). Parallel Synthesis: A new approach for developing analytical Internal Standards. Application to the Analysis of Patulin by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6643-6648.
- MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J., Felgueiras, I., Brera, C., Jørgensen, K., Macho, M. L., Majerus, P., Martins, M. L., Mevissen, L., Michelet, J. Y., Nuotio, K., Pittet, A., Szymanski, L., Tucker, N., Viladrich, R., Voogt, J. & Wennemar, A. (2000). Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 6, 1387-1394.
- Marín, S., Morales, H., Hasan, H. A. H., Ramos, A. J. & Sanchis, V. (2006). Patulin distribution in the tissue of *Penicillium expansum* – contaminated Fuji and Golden apples. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1316-1322.
- Martins, M. L., Gimeno, A., Martins, H. M., Bernardo, F. (2002). Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 568-574.
- Morales, H., Marín, S., Rovira, A., Ramos, A. J. & Sanchis, V. (2007). Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. *Letters in Applied Microbiology*, 44(1), 30-35.
- Prieta, J., Moreno, M. A., Blanco, J. L., Suárez, G. & Dominguez, L. (1992). Determination of patulin by diphasic dialysis extraction and thin-layer chromatography. *Journal of Food Protection*, 55(12), 1001-1002.
- Rice, S. L., Beuchat, L. R. & Worthington, R. E. (1977). Patulin production by *Byssochlamys* spp. in fruit juices. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(6), 791-796
- Sanderson, P. G. & Spotts, R. A. (1995). Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology*, 85(1), 103-110.
- Sewram, V., Nair J. J., Nieuwoudt, T. W., Leggott, N. L. & Shephard, G. S. (2000). Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatographic-

atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 897(1-2), 365-374.

Sheu, F. & Shyu, Y. T. (1999). Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(7), 2711-2714.

Simonovska, B., Andresek, S., Vovk, I. & Prosek, M. (1999). High-performance thin-layer chromatography method for monitoring norfloxacin residues on pharmaceutical equipment surfaces. *Journal of Chromatography A*, 862(2), 209–215.

Sommer, N. F., Buchana, J. R., & Fortlage, R. J. (1974). Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology*, 28(4), 589-593.

Taniwaki, M. H., Hoenderboom, C. J. M., Vitali, A. A. & Eiroa, M. E. U. (1992). Migration of patulin in apple juice. *Journal of Food Protection*, 55, 902-904.

Tsao, R. & Zhou, T. (2000). Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(11), 5231-5235.

Vero, S., Vásquez, A., Cerdeiras, M. P. & Soubes, M. (1999). A rapid TLC-scanning method for determination of patulin in apple products. *Journal of Planar Chromatography*, 12(3), 172-174.

Vero, S., Mondino, P., Burgueño, J., Soubes, M. & Wisniewski, M. (2002). Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), pp. 91-98.

WHO (1995). World Health Organization, 44th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technical Report Series, 859, 36.

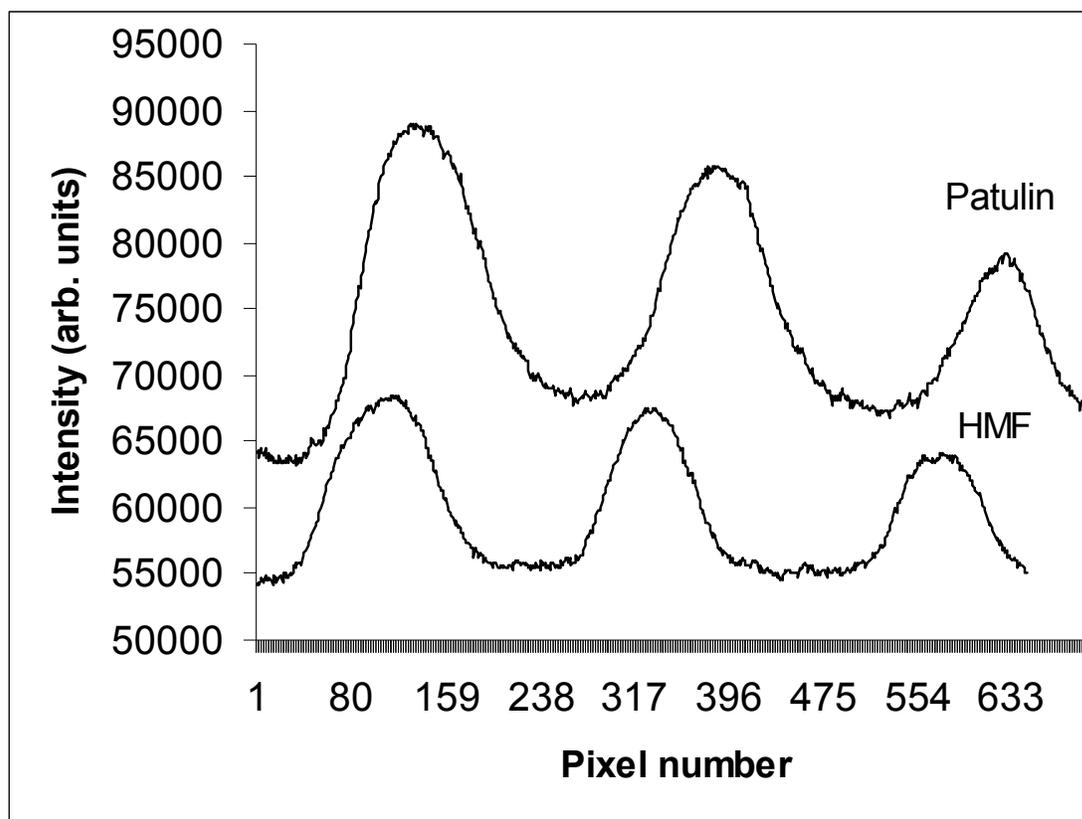


Figure 1. TLC chromatogram of apple juice sample – separation of HMF and patulin

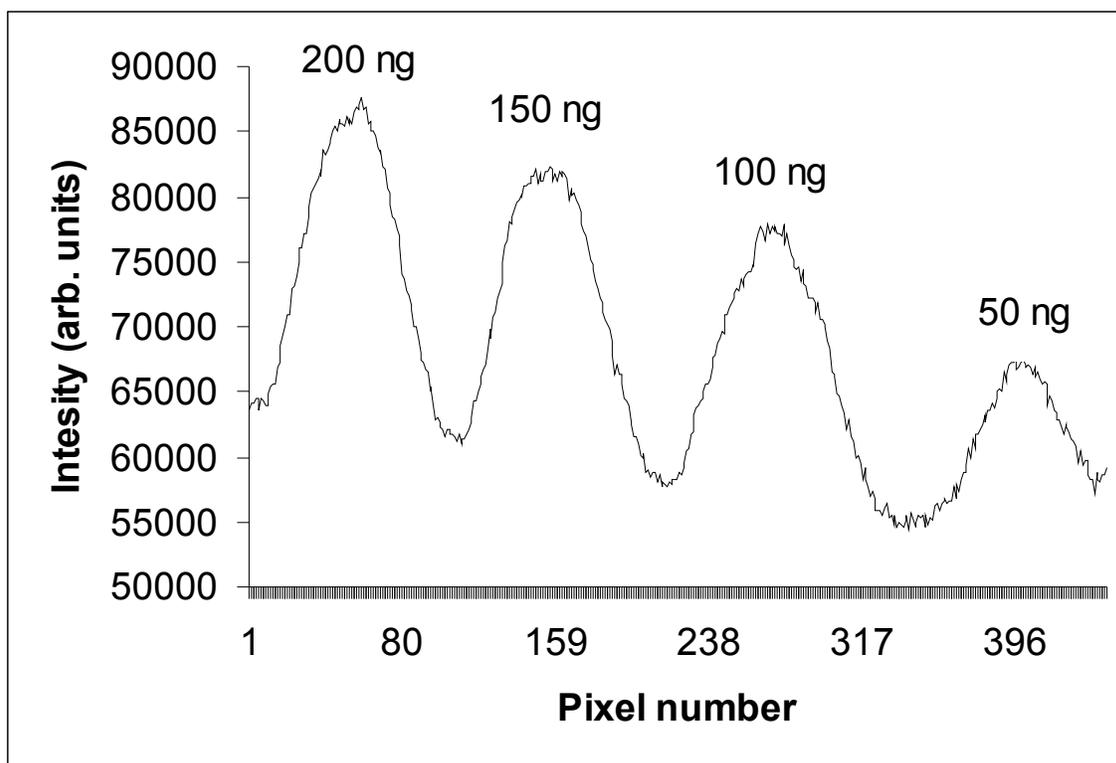


Figure 2. TLC chromatogram obtained from patulin standard solution in different concentrations

Table 1. Recovery results of the method for determination of patulin in apple juice concentrate

Patulin spiked ($\mu\text{g/L}$)	Recovery ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)	RSD (%) ^a
50	46.50	93	4.93
100	96.31	96	3.59
200	192.71	96	8.75

^a RSD = Relative standard deviation

Table 2. Precision of the method for determination of patulin in apple juice

Patulin spiked ($\mu\text{g/L}$)	Within-day		Between-day	
	Recovery ($\mu\text{g/L}$)	RSD ^a (%)	Recovery ($\mu\text{g/L}$)	RSD ^a (%)
50	46.41	4.2	46.64	7.4
100	90.00	6.2	97.05	11.7
200	189.99	9.1	187.58	11.6

^a RSD = Relative standard deviation

Table 3. Analytical results for patulin in apple juice concentrate samples

Sample no.	Patulin ($\mu\text{g/L}$)	RSD ^a (%)
1	108.12	5.4
2	106.54	2.6
3	143.90	7.4
4	96.85	5.3
5	151.35	3.0
6	151.97	1.8
7	97.09	0.9
8	60.95	0.2
9	56.04	1.5
10	64.28	6.6
11	108.98	3.7
12	103.25	9.9
13	67,90	1.1
14	68.78	2.5
15	94.80	5.6
16	231.44	2.0

^a RSD = Relative standard deviation

CAPÍTULO 4

Artigo: Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels

Aceito para publicação no periódico: Food Control

Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels

Juliane Elisa Welke^{a,†}, Michele Hoeltz^a, Horacio Alberto Dottori^b, Isa Beatriz Noll^a

^aInstitute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901 Porto Alegre, RS, Brazil

^bInstitute of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901 Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

The effects of different stages of apple juice concentrate production on patulin levels were investigated. Patulin was detected in all samples analyzed in concentrations ranging from 56 to 653 µg/L. Apple paste resulted from milling process had high levels of patulin. The results of this study indicate that it is possible to reduce patulin level in apple juices. After pasteurization, enzymatic treatment, microfiltration and evaporation processes, the mean loss of patulin was 39.6, 28.3, 20.1 and 28.4%, respectively. When apple juices concentrate were diluted from 69 to 12°Brix to consume, patulin content ranged from 15 to 46 µg/L. Patulin content in all juice samples was lower than the limit of 50 µg/L considered acceptable by the Codex Alimentarius Commission. But if consider the maximum permitted concentration established for apple products intended for infants and young children by The Commission of the European Communities all samples were found to exceed patulin concentration of 10 µg/L.

Key words: Patulin; Apple juice; Processing stages

Introduction

Patulin (4-hydroxy-4H-furo[3,2c]pyran,2[6H]-one) is a mycotoxin produced by certain species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssoschlamys* (Sommer, Buchanan & Fortlage, 1974; Rice, Beuchat & Worthington, 1977). *Penicillium expansum* is the most common fungi isolated from decaying apples and causes blue mold rot during storage (Sanderson & Spotts, 1995; Vero, Mondino, Burgueño, Soubes & Wisniewski, 2002).

Patulin has been reported to be mutagenic and cause neurotoxic, immunotoxic, genotoxic and gastrointestinal effects in rodents (Hopkins, 1993). Due to its toxicity, the

[†] Corresponding author. Tel.: +55 51 33087242; Fax: +55 51 33087048.

E-mail address: juliwelke@yahoo.com.br (J.E.Welke)

Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA) has established a provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) for patulin of 0.4 µg/kg body weight/day (WHO, 1995). Because of concern for human health and the possibility of using patulin as a quality indicator in foods, the World Health Organization (WHO) has established a maximum recommended concentration of 50 µg/L of patulin in apple juice. In addition, at least 15 European countries have established regulatory limits for patulin in various foods, usually apple and apple products, using the same limit of 50 µg/kg (FAO, 1996). In European Union the maximum level allowed for apple products intended for infants and young children is 10 µg/kg (The Commission of the European Communities, 2006).

Apple juices are the most important source of patulin in human diet (WHO, 1995). The juice production requires the use of ripened fruit, which is normally stored at low temperature prior to processing. Even at temperatures below 5°C some species of *Penicillium* are able to grow and produce patulin (Northolt & Bullerman, 1982). The contamination of apples with patulin is normally associated with spoiled tissue areas and although removing rotten tissue from the fruit can reduce patulin levels, penetration nevertheless occurs up to approximately 1 cm into the surrounding healthy tissue (Taniwaki, Hoenderboom, Vitali & Eiroa, 1992).

Processing can play an important role in reducing the potential risks of mycotoxin-contaminated food commodities. Thus, it is important to evaluate the effects of processing on patulin to determine if the toxin level can be managed through post-harvest procedures. Information on patulin persistence and transformation during processing would be useful for the development of an effective food safety program.

The objective of this study was to determine the effect that some stages of apple juice concentrate processing (milling, pasteurization, treatment enzymatic, microfiltration and evaporation) have on patulin levels.

Materials and methods

Samples

Sixteen lots of apple juice production were analyzed. Samples were taken, in duplicate, from five stages of the apple juice production (Figure 1) processed by an industry

located in Rio Grande do Sul state, Brazil. Samples were collected after milling, pasteurization, enzymatic treatment, microfiltration and evaporation.

Sample preparation

Patulin extraction

A modified version of the method used by MacDonald et al. (2000) was used. Ten grams of apple or apple juice were extracted with 20 mL of ethyl acetate by mixing vigorously for 1 min using a vortex mixer. The extraction was repeated twice using 20 mL portions of ethyl acetate.

Sample Clean-up

The organic phases were combined and extracted with 10 mL of sodium carbonate solution (1.5%, w/v) to remove phenolic acids. The phases were allowed to separate and the aqueous phase was extracted with 10 mL of ethyl acetate, which was combined with the preceding portion. Extracted samples were dried with anhydrous sodium sulfate and transferred to a silica gel column prepared in a glass tube filled with 8 g of Silicagel (60, 70-230 mesh, Merck). The toxin was eluted from the column with 10 mL of ethyl acetate. After solvent evaporation, the extract was redissolved in known volume of chloroform. All samples were analyzed in duplicate.

Chromatography

Ten, twenty and thirty microliter aliquots of sample extract and patulin standard solution (10 µg/mL) were spotted 1 cm apart on TLC plates (SIL G-25HR, Machery-Nagel and Co., Code No. 809033, Germany). The spots were dried, and the plates developed in solvent system toluene:ethyl acetate:formic acid (5:4:1 v/v/v) (Labuda & Tancinová, 2006).

For identification of patulin, the plates were sprayed with 0.5% aqueous methylbenzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate (MBTH) (No. 65875, Fluka, USA) and heated at 130°C for 15 minutes. Patulin appeared as a yellow spot under visible light for reflection and transparency simultaneously and as a yellow-orange fluorescence spot under long wavelength UV light (366 nm). The TLC plate was sprayed with water-90% formic acid (98:2 v/v) until the layer appeared wet and then observed under 366 nm UV light, which improved the visualization of the yellow-orange

fluorescence spots against the background (Martins, Gimeno, Martins & Bernardo, 2002).

CCD Imaging System

The quantification of the fluorescence intensities from UV lamp were recorded by a CCD camera. Images were taken in each experiment and were analyzed using IMSTAT software (image statistics) of IRAF (Image Reduction Astronomical Facility) package.

Patulin Standard Solution

A stock standard solution of patulin was prepared by dissolving 5 mg of pure crystalline patulin (Sigma, P-2639) in chloroform at concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. The standard solution was kept frozen (-18°C). The concentration of the patulin stock solution was determined by measuring the UV absorbance at 275 nm and calculated by using the molar extinction coefficient ϵ of 14600. The concentration of working standard solution in chloroform was 10 $\mu\text{g/mL}$ (AOAC 974.18, 2000)

Statistical analysis

Box plot and ANOVA were applied to test the effect of each stage of apple juice production on patulin levels. SPSS, version 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA) for Windows was used for the statistical analysis of data.

Results and discussion

The method used for patulin determination was efficient. 5-hydroxymethylfurfural (HMF) is formed during heat treatment and storage of carbohydrates-rich products such as apple juices (Kadikal, Sebahattin & Poyrazoglu, 2002). HMF is observed as the main interference in patulin determination. The separation of these two compounds is required to reliable patulin quantification. A clean-up step using a silica-gel column removed the interference. Patulin and HMF appeared as two different spots which were distinguished when compared with standards on TLC plate. The recovery of the method was determined by analyzing of 3 apple pastes (from milling stage) and 3 apple juices concentrate (last stage). Recovery rates of patulin obtained by spiking the apple paste with 200, 300 and 400 $\mu\text{g/kg}$ in duplicate were 91, 92 and 88% respectively and the relative standard deviation (RSD) for repeatability was 4.3, 6.2 and 4.2, respectively. The recovery of patulin in apple juice concentrate spiked at 50, 100 and 200 $\mu\text{g/L}$ was 93, 96 and 96% respectively; the RSD for repeatability was 4.9, 3.6 and 8.7 respectively

for these concentrations. The limit of detection (LOD) was 0,005 µg/spot and the limit of quantification (LOQ) was 14 µg/L. Linearity was determined by analyzing six calibration standards within the concentration ranging from 45 to 2100 µg/L which correspond a patulin concentration ranging from 15 to 700 µg/L in samples. The correlation coefficient was 0,996.

Patulin was detected in all samples analyzed in concentrations ranging from 56 to 653 µg/L. In Figure 2, the box plots for all samples analyzed show the inter-quartile range of each stage of apple juice production (box), the median (line inside the box) and minimum and maximum values (the bar hedges outside the box); the bold line shows the mean patulin content at each stage of apple juice production. These results show that the patulin levels can be considerable reduced through processing stages. Apple paste resulted from milling process had high levels of patulin. It occurs when fruits decayed by *P. expansum* are processed; patulin can be transferred into the fruit juice due to its solubility. The patulin content in each stage of apple juice production of sixteen lots analyzed ranged from 255 to 653 µg/kg in milling process, 131 to 406 µg/L after pasteurization, 91 to 244 µg/L after enzymatic treatment, 76 to 314 µg/L after microfiltration and from 56 to 231 µg/L after evaporation.

The results of ANOVA test in Table 1 show the influence of processing stages of apple juice production and apple lots processed. Processing stages of apple juice are a significant source of variation and explain 70% of total patulin reduction. Different lots of processed apple juices are also a source of variation, but explain only 20% of total variation. Besides stages and lots, 10% of total variation is explained by other factors. The variation in the levels of patulin between lots is expected because apples with different patulin levels are processed. Thus, a wide variation in the results of initial patulin levels (after milling process) between the sixteen lots was observed (Figure 2), illustrating that patulin levels may vary depending of quality of fruits used to juice production.

A summary of the ANOVA applied to all samples is showed in Table 2, with data grouped on the basis of each stage of apple juice production. The results of patulin levels were obtained by the mean of patulin of each stage in 16 lots analyzed. The results of ANOVA show that all stages contributed to patulin reduction, but

pasteurization and enzymatic treatment resulted in significantly reduction on patulin content. The post hoc test of Tukey separates the stage of milling and pasteurization from the others, while the enzymatic treatment and microfiltration are in the same subset, like microfiltration and evaporation.

After pasteurization process the mean loss of patulin was 39.6%. The juice was pasteurized for 30 s at 90°C. These results showed that patulin is relatively stable to thermal degradation.

The patulin reduction achieved after enzymatic treatment using pectinase was 28.3%. Bissessur, Permaul and Odhav (2001) reported patulin reduction of only 4.5%. The enzymatic treatment seems to cause low decrease of patulin content.

Microfiltration has been replacing conventional fining and filtration methods for clarifying apple juices because include reduction on enzyme consumption and production with continuous simplified process. Microfiltration is able to eliminate particles in suspension (Fukumoto, Delaquis and Girard, 1998). After microfiltration process the mean loss of patulin was 20.1%. This reduction on patulin levels can be attributed to the binding of the patulin to solid substrates that are removed with the microfiltration.

The evaporation process was done at 96°C for 30 s. The mean of patulin reduction achieved by evaporation was 28.4%. This result was higher that Kadakal and Nas (2003) reported in apple juice, with reduction in patulin level of 14.1% at 80°C after 20 min.

The overall loss of patulin through processing from apple to apple juice was 75.2%. Pasteurization was the stage of apple juice production that further contributed to reduction of patulin levels. Thus, the presence of patulin in fruit products, such as juices, may be used as an indicator of the quality of the product.

When apple juices concentrate were diluted to consume, from 69 to 12°Brix with dilution factor of 4.75, the mean patulin concentration was found to be 21 ± 9.1 µg/L, ranging from 15 to 46 µg/L. All samples were found to exceed patulin concentration of 10 µg/L, which is the maximum permitted concentration established for apple products intended for infants and young children by The Commission of the European Communities. But these patulin levels were lower than the limit of 50 µg/L considered acceptable by the Codex Alimentarius Commission.

The results of this study indicate that it is possible to reduce patulin level in apple juices. All stages of apple juice production contributed to patulin reduction. Apple selection is a preventive measure to control safety hazards and good manufacturing practices in apple juice production can effectively reduce contamination.

REFERENCES

- AOAC. (2000). Official Methods on Analysis of AOAC International. Method 974.18 Patulin in apple juice Thin-Layer Chromatographic Method, Natural Toxins.
- Bissessur, J., Permaul, K., & Odhav, B. (2001). Reduction of patulin during apple juice clarification. *Journal of Food Protection*, 64(8), 1216-1219.
- FAO. (1996). Worldwide regulations for mycotoxins. FAO and Nutrition Paper n.64.
- Fukumoto, L.R., Delaquis, P., & Girard, B. (1998). Microfiltration and ultrafiltration ceramic membranes for apple juice clarification. *Journal of Food Science*, 63(5), 845-850.
- Hopkins, J. (1993). The toxicological hazards of patulin. *Food and Chemical Toxicology*, 31(6), 455-456.
- Kadalkal, C., Sebahattin, N., & Poyrazoglu, E. S. (2002). Effect of commercial processing stages of apple juice on patulin, fumaric acid and hydroxymethylfurfural (HMF) levels. *Journal of Food Quality*, 25(4), 359-368.
- Kadalkal, C., & Nas, S. (2003). Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(9), 987-990.
- Labuda, R., & Tancinová, D. (2006). Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13, 193-200.
- MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J., Felgueiras, I., Brera, C., Jørgensen, K., Macho, M. L., Majerus, P., Martins, M. L., Mevissen, L., Michelet, J. Y., Nuotio, K., Pittet, A., Szymanski, L., Tucker, N., Viladrich, R., Voogt, J., & Wennemar, A. (2000). Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 83(6), 1387-1394.

- Martins, M. L., Gimeno, A., Martins, H. M., & Bernardo, F. (2002). Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 568-574.
- Northold, M. D., Bullerman, L. B. (1982). Prevention of mold growth and toxic production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection*, 45, 519-526.
- Rice, S. L., Beuchat, L. R., & Worthington, R. E. (1977). Patulin production by *Byssoschlamys* spp. in fruit juices. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(6), 791-796.
- Sanderson, P. G., & Spotts, R. A. (1995). Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology*, 85(1), 103-110.
- Sommer, N. F., Buchana, J. R., & Fortlage, R. J. (1974). Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology*, 28(4), 589-593.
- Taniwaki, M. H., Hoenderboom, C. J. M., Vitali, A. A., & Eiroa, M. E. U. (1992). Migration of patulin in apple juice. *Journal of Food Protection*, 55, 902-904.
- The Commission of the European Communities. (2006) n. 1881/2006 – L364/17. *Official Journal European Union*, 13-14.
- Vero, S., Mondino, P., Burgueño, J., Soubes, M., & Wisniewski, M. (2002). Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), 91-98.
- WHO (1995). World Health Organization, 44th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Technical Report Series, 859, 36.

Figure Captions

Figure 1. Flow chart of apple juice concentrate production.

Figure 2. Trend of patulin from milling process to evaporation. The box plot represents the median (line inside the box), the upper and lower quartiles (the hedges of the box), the minimum and maximum (the bar hedges outside the box) of patulin for each apple juice step. The hold curve is the average trend of patulin.

Figure 1.

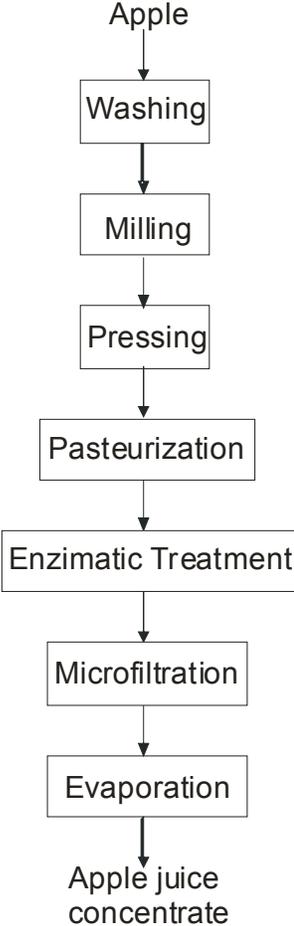


Figure 2.

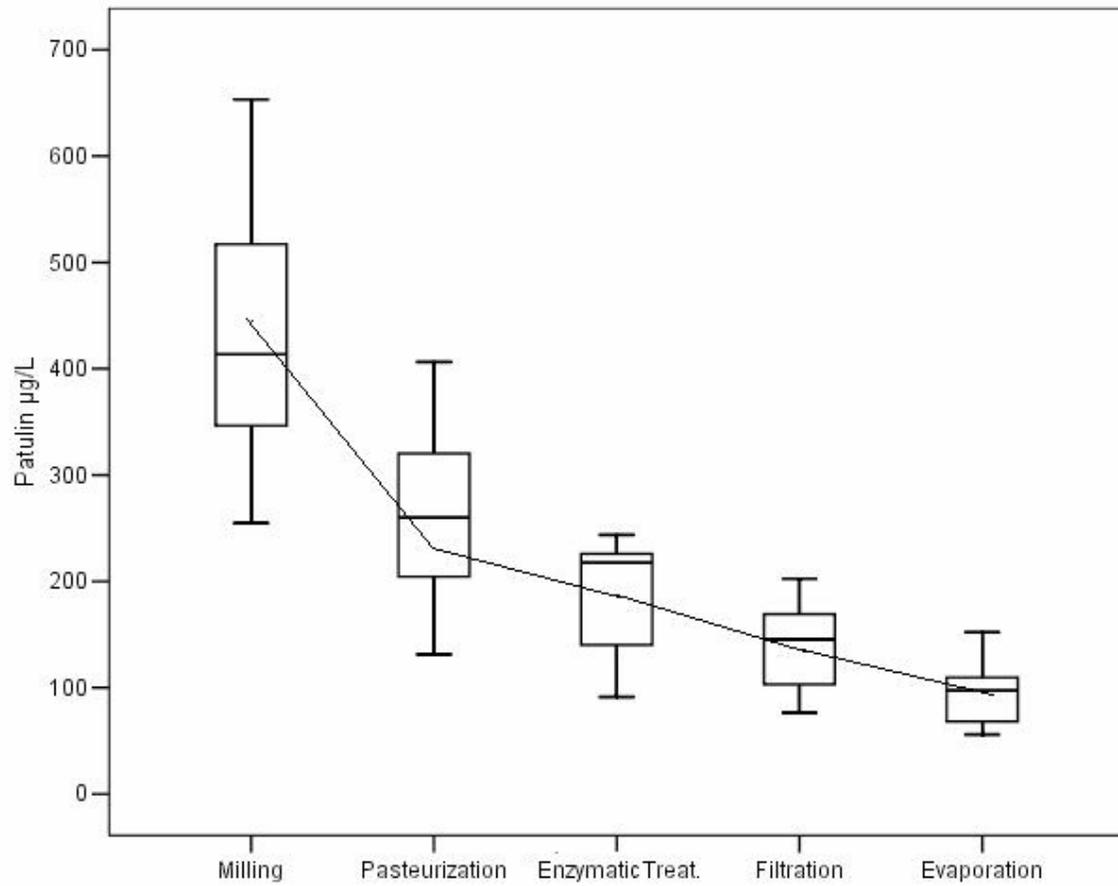


Table 1. ANOVA analysis

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-value	p-value
Stage	1019099.282	4	254774.821	104.394	<0.001
Lot	305067.050	15	20337.803	8.333	<0.001
Error	126906.234	52	2440.505		
Corrected total	1467644.906	79			

Table 2. One-way analysis of variance applied to data on patulin content in samples collected in some apple juice production steps

Stage of apple juice production	Patulin ($\mu\text{g/L}$)
Milling	433a
Pasteurization	262b
Enzymatic Treatment	188c
Microfiltration	150c,d
Evaporation	107d

Mean followed by same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 5

Artigo: Revisão bibliográfica: Patulina – revisão sobre ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle

Submetido no periódico: Ciência Rural

Patulina – revisão sobre ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle

Patulin – review about occurrence, toxicological aspects, analytical methods and control

Juliane Elisa Welke^{1,‡}, Michele Hoeltz¹, Horacio Alberto Dottori^{II}, Isa Beatriz Noll^I

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Patulina é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*. Em experimentos com animais demonstrou ter atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica. Tem sido freqüentemente encontrada em maçãs e derivados. A patulina é facilmente transferida da maçã para o suco durante o processamento devido a sua alta solubilidade em água. Esta micotoxina é muito estável ao aquecimento em meio ácido como no suco de maçã. Assim, a presença de patulina em suco de maçã é um indicador da qualidade das maçãs utilizadas no processamento. Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a determinação da patulina, principalmente baseados na extração líquido-líquido com acetato de etila e determinação por CLAE. É importante evidenciar a necessidade de legislação que regulamente limites desta micotoxina em alimentos no Brasil. Esta revisão bibliográfica tem como objetivos descrever as principais características da patulina, ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos desenvolvidos para sua detecção e controle durante os estágios da produção da maçã e suco.

Palavras-chave: patulina, toxicidade, métodos analíticos, ocorrência, controle.

ABSTRACT

Patulin is a mycotoxin produced by several *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssochlamys* species. Patulin is a highly toxic compound which has shown to be mutagenic, carcinogenic and teratogenic in experiments with animals. It has often been found in apples and by-products. Patulin is easily transferred into apple juice during processing due to its high solubility in water. This mycotoxin is very stable to heat in acidic medium as in apple juice. Thus, patulin content of apple juice is an indicator of the quality of the apples used to juice production. Many methods have been developed for

^I Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{II} Instituto de Física, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

[‡] E-mail: juliwelke@yahoo.com.br. Autor para correspondência

the patulin determination mainly based on liquid-liquid extraction with ethyl acetate and use of HPLC for detection. It is important to show the need of legislation that imposes patulin limits in foods in Brazil. The objectives of this review are to describe the main patulin characteristics, occurrence, toxicological aspects, methods developed for patulin detection and control during the stages of apple and juice production.

Key words: patulin, toxicity, analytical methods, occurrence, control.

INTRODUÇÃO

O suco e os demais derivados da maçã são elaborados, principalmente, a partir de frutas que não alcançam o padrão exigido para consumo, por defeitos diversos, como picadas de insetos, injúrias mecânicas, cicatrizes na epiderme, má formação do fruto e problemas fitossanitários (MELO, 2004). Essas frutas podem estar contaminadas com fungos, causadores de deterioração e produtores de metabólitos tóxicos, as micotoxinas, entre essas, a patulina (CIEGLER, 1976).

A patulina vem sendo empregada como indicador da qualidade nos frutos e produtos de maçã (MOSS, 1996). Essa micotoxina tem demonstrado potencial carcinogênico (BECCI et al., 1981), mutagênico (SCHUMACHER et al., 2005) e teratogênico (CIEGLER, 1976) em animais.

No Brasil, o comércio interno de sucos de frutas é pequeno, em torno de cinco a sete litros anuais por habitante (IBGE, 2003). A produção e comercialização de sucos no Brasil são insignificantes quando comparadas com a Europa e aos Estados Unidos, onde o consumo de sucos de frutas alcança 30 litros anuais por habitante, destacando-se o suco de maçã, considerado como o mais popular e que entre os sucos de frutas ocupa a segunda posição em consumo no mundo (IBRAF, 2005). Uma das principais preocupações em relação à contaminação do suco de maçã com a patulina é o fato de que o Brasil exporta este produto a países que possuem limites estabelecidos por legislação para esta micotoxina em sucos.

A Organização Mundial da Saúde recomenda um nível máximo aceitável de $50\mu\text{g L}^{-1}$ de patulina em suco de maçã (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 1997). A União Européia adotou recentemente este mesmo limite e também $25\mu\text{g kg}^{-1}$ em produtos sólidos incluindo compota e purê de maçã e ainda o limite máximo de $10\mu\text{g kg}^{-1}$ é proposto para produtos de maçã

destinados às crianças (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2006). No Brasil ainda não existe legislação que estabelece o limite de patulina em alimentos.

O objetivo desta revisão bibliográfica é apresentar os principais aspectos relacionados à patulina, incluindo a ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e formas de controle.

Características gerais da patulina

Quimicamente, a patulina é uma lactona (4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona) e seu peso molecular é de 150,12 (Figura 1). Forma cristais incolores, tem ponto de fusão de 111°C, é solúvel em água, etanol, acetona, acetato de etila, éter e clorofórmio, mas é insolúvel em benzeno e éter de petróleo. Sua quantidade em suco de maçã é reduzida por estocagem prolongada, ação de sulfito e alta temperatura, adição de ácido ascórbico, fermentação alcoólica e tratamento com carvão ativo. A patulina perde sua atividade biológica em meio alcalino e em presença de moléculas contendo grupo sulfidrilais tais como cisteína e glutatona (CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS, 1998).

Fungos produtores de patulina

A patulina é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys*. As espécies de *Penicillium* que já foram identificadas como produtoras de patulina são: *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* e *P. vulpinum* (FRISVAD et al., 2004).

O *P. expansum* é um fungo psicotrófico e já foi encontrado em maçãs (VERO et al., 2002), cerejas (LARSEN et al., 1998), pêssego (KARABULUT & BAYKAL, 2002), nectarinas (KARABULUT et al., 2002) e pêras (MORTIMER et al., 1985). Este fungo é o principal produtor de patulina (GÖKMEN & ACAR, 1998), sendo reportado como responsável por 70 a 80% da deterioração de frutas armazenadas e em especial de maçãs (LEGGOTT & SHEPHARD, 2001). Como consequência, maçãs e produtos derivados de maçã são a principal fonte de patulina na dieta humana. O armazenamento das frutas a baixas temperaturas não é suficiente para prevenir a

formação de micotoxinas, pois o *P. expansum* é capaz de crescer e produzir patulina em temperaturas menores que 5°C (NORTHOLT & BULLERMAN, 1982).

O gênero *Byssochlamys* possui duas espécies economicamente importantes, *B. nivea* e *B. fulva*, sendo que ambas causam deterioração de frutas e produtos processados a partir das mesmas. Este gênero fúngico é o principal causador da deterioração pós-tratamento térmico em derivados de frutas (TOURNAS, 1994).

Ocorrência de patulina

A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas do fruto, sendo que, a intensidade de difusão desta micotoxina é de 1cm em direção ao tecido sadio (TANIWAKI et al., 1992). Entretanto, RYCHLIK & SCHIEBERLE (2001) encontraram patulina a 2cm além do tecido deteriorado de maçãs.

Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido focadas na ocorrência de patulina em suco de maçã em diversos países (Tabela 1), e em todos aqueles onde foram realizados estudos se encontrou amostras contaminadas com essa micotoxina. No entanto, os dados ainda são insuficientes para uma conclusão a respeito da incidência de patulina nestes países.

Aspectos toxicológicos da patulina

Desde 1941, a patulina tem sido objeto de estudo, primeiramente por sua ação como antibiótico e depois por suas propriedades fitotóxicas e carcinogênicas. Foi reportada como sendo tóxica para ratos (BROOM et al., 1944), teratogênica para embriões de galinha (CIEGLER, 1976) e imunossupressora em camundongos e coelhos (ESCOULA et al., 1988).

Em 1986, a Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer (IARC, 1986), concluiu que não há evidências suficientes sobre a carcinogenicidade da patulina em animais e que não se pode fazer qualquer afirmação sobre a carcinogenicidade em humanos. Entretanto, nos últimos anos, inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de evidenciar a toxicidade desta micotoxina (FLIEGE & METZLER, 2000; MAHFOUD et al., 2002; WICHMANN et al., 2003; RYCHLIK et al., 2004; SCHUMACHER et al., 2005; WU et al., 2005; SCHUMACHER et al., 2006; LIU et al., 2006).

Ao nível celular, a patulina tem mostrado efeitos incluindo rompimento da membrana de células plasmáticas (MAHFOUD et al., 2002) e inibição da síntese de DNA (WICHMANN et al., 2003). Segundo ARAFAT & MUSA (1995), a toxina inibe o crescimento e a síntese de proteína em cultura de tecido hepático e isso se deve ao bloqueio da captação dos aminoácidos através da membrana e também à sua incorporação na proteína.

Em estudo *in vitro*, a patulina se mostrou capaz de inativar várias enzimas incluindo as polimerases de ácido ribonucléico e de ácido desoxirribonucléico. Isto também afeta a transcrição e a tradução, tendo um efeito direto no DNA (RILEY & SHOWKER, 1991). Esta propriedade de inativar enzimas ocorre principalmente como uma consequência da formação de ligações covalentes com células essenciais contendo grupos sulfidril ou tiol (SH) (ARAFAT & MUSA, 1995; FLIEGE & METZLER, 1999). A afinidade pelos grupos SH também é responsável, em termos de mecanismos bioquímicos, pelos efeitos tóxicos da patulina em várias células (LIU et al., 2006; MAHFOUD et al., 2002). O conhecimento sobre a reatividade da micotoxina poderá ajudar a caracterizar os mecanismos de citotoxicidade e efeitos genéticos desta toxina na molécula base, e possivelmente, facilitar o desenvolvimento de biomonitoração da patulina, com base nas estruturas químicas formadas (FLIEGE & METZLER, 2000).

A patulina causou danos ao fígado e rins de ratos (IMAIDA et al., 1982; SPEIJERS et al., 1988), além de revelar toxicidade ao sistema imunológico (BONDY & PETSTKA, 2000). Em humanos, os efeitos tóxicos da patulina ainda não são conclusivos, mas já foram relatados náuseas, distúrbios gastrintestinais e vômito em decorrência do consumo de derivados de maçã contaminados com essa micotoxina (LAI et al., 2000).

A patulina mostrou genotoxicidade e possível atividade mutagênica em células mamárias de ratos em estudo *in vitro* (SCHUMACHER et al., 2006). SCHUMACHER et al. (2005) mostraram que a patulina é uma genotoxina ao estudar sua mutagenicidade em células V79 de pulmão de hamster chinês. Após vários estudos em ratos, determinou-se que a dose letal (DL 50) da patulina para estes animais é variável de 15 a 35mg kg⁻¹, dependendo do modo de administração (CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS, 1998).

Esta toxina tem mostrado efeitos sobre a tireóide, testículos e níveis hormonais de ratos machos em fase de crescimento, mas não afeta o crescimento dos mesmos (SELMANOGLU & KOÇKAYA, 2004). Além disso, afeta a morfologia do esperma de ratos machos, diminui a quantidade de esperma e causa mudanças histopatológicas no epidídimo e próstata (SELMANOGLU, 2006).

Células humanas têm sido usadas para avaliar a toxicidade desta micotoxina e danos no DNA têm sido observados ao se expor culturas de células embrionárias de rim a diferentes concentrações de patulina (WU et al., 2005). A indução do dano oxidativo do DNA é discutido baseando-se na observação de que esta micotoxina reage com o antioxidante celular glutathione (FLIEGE & METZLER, 2000) e poderia diminuir sua capacidade antioxidante (LIU et al., 2003).

Estudos indicam que a patulina está associada à danos no trato gastrointestinal, incluindo úlceras e inflamação do estômago e intestino. Para caracterizar o mecanismo envolvido nos danos intestinais, MAHFOUD et al. (2002) expuseram dois tipos de células epiteliais humanas à esta micotoxina. O resultado do estudo sugeriu que a micotoxina reage com a cadeia lateral do resíduo de cisteína na proteína fosfatase de células epiteliais intestinais, resultando na perda da atividade da fosfatase, que é responsável pelo decréscimo da resistência transepitelial.

Em 1995, o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) estabeleceu como ingestão diária tolerável máxima provisória (PMTDI) a dose de $0,4\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001). Embora as avaliações revelem que a exposição da população europeia está bem abaixo da PMTDI, grupos específicos de consumidores, especialmente os recém nascidos, estão mais expostos, pois eles tendem a consumir mais produtos derivados de maçã (DRUSCH et al., 2007).

Métodos Analíticos para determinação de patulina em alimentos

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de patulina (Tabela 2), incluindo cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC). A maioria dos métodos utiliza, na etapa de preparação de amostras, a extração líquido-líquido (ELL) (VERO et al., 1999; SEWRAM et al., 2000; AKTAS et al., 2004; IHA & SABINO, 2006; LI et al., 2007). A ELL se baseia na partição da amostra entre duas fases imiscíveis,

orgânica e aquosa, sendo que a eficiência da separação está relacionada à afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (SHEPHARD & LEGGOTT, 2000). No entanto, a extração em fase sólida (EFS) também tem sido usada para extração desta micotoxina (EISELE & GIBSON, 2003, ITO et al., 2004; GÖKMEN et al., 2005). O problema da utilização destes métodos é o custo alto das colunas de extração em relação à ELL. Metodologias de baixo custo e menor tempo de análise, com o emprego de quantidades reduzidas de solventes orgânicos e conseqüentemente, menor geração de resíduos tóxicos têm sido desenvolvidas (TSAO & ZHOU, 2000; IHA & SABINO, 2006).

A CCD foi um dos primeiros métodos desenvolvidos para determinação de patulina, caracterizado por ser simples, de baixo custo e não exigir equipamentos sofisticados. A detecção e quantificação de patulina nas placas de sílica-gel são feitas pela formação de derivados fluorescentes, através do borramento de 3-metilbenzotiazolinona hidrazona (MBTH), em que se obtém um limite de detecção (LD) de $20\mu\text{g L}^{-1}$ (AOAC, 2000), ou através da exposição das placas de CCD a vapores de amônia e quantificação por fluorodensitometria com LD de $100\mu\text{g L}^{-1}$ (DURAKOVIC et al., 1993).

A diálise bifásica foi utilizada para extração de patulina e a determinação da concentração da micotoxina foi feita por CCD (PRIETA et al., 1992) e CLAE (PRIETA et al., 1993). Nesta técnica, a membrana contendo o solvente orgânico é agitada na matriz aquosa até que os analitos de interesse, que possuem baixo peso molecular, passem através da membrana, enquanto que as demais substâncias de maior peso molecular ficam retidas na fase aquosa. A diálise bifásica caracteriza-se como um processo simples de preparação da amostra, com economia de mão de obra e solventes (SHEU & SHYU, 1999).

RYCHLIK & SCHIEBERLE (1999) desenvolveram dois métodos usando patulina com carbono marcado (C13). A quantificação ocorreu no primeiro método por cromatografia líquida acoplada a detector por espectrometria de massa (CL-EM) sem derivatização e no segundo método por cromatografia gasosa acoplada a detector por espectrometria de massa (CG-EM). O método CG-EM mostrou melhor reprodutibilidade

cujo coeficiente de variação foi de 9%, obteve-se recuperação de 96% e LD de 12ng L^{-1} , que foi 100 vezes mais baixo que o LD do procedimento padrão (CLAE-UV).

A EC foi uma técnica desenvolvida para rápida análise de patulina com simples preparação da amostra e baixo custo. TSAO & ZHOU (2000), com o uso da cromatografia capilar micelar eletrocínética com detector de fotodiodo a 273nm obtiveram recuperação de 98% e o LD foi de $3,8\mu\text{g L}^{-1}$.

A CLAE-UV é um método comumente usado para determinação e quantificação de patulina, visto que esta toxina é relativamente polar e exibe amplo espectro de absorção (GÖKMEN & ACAR, 1999; YURDUM et al., 2001; GÖKMEN et al., 2005). A extração é feita com acetato de etila e a limpeza é realizada com solução de carbonato de sódio 1,5%. O extrato de acetato de etila é seco com sulfato de sódio anidro, evaporado e o resíduo seco é dissolvido em água/ácido acético (pH 4) (AOAC, 2000).

O 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) é o interferente mais encontrado durante a análise de patulina por cromatografia líquida, pois apresenta propriedades cromatográficas similares devido a sua estrutura química ser semelhante a da patulina (SEWRAM et al., 2000). GÖKMEN & ACAR (1999), com a utilização de fase móvel de água/acetonitrila (99:1, v/v), coluna de C18 e determinação por CLAE com detector de fotodiodo, separaram completamente o HMF da patulina. A recuperação do HMF variou de 86 a 100% e a recuperação da patulina variou de 94 a 125%. O LD do HMF e patulina foi de $<0,01\text{mg L}^{-1}$ e $<5\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Estratégias e controle dos níveis de patulina em maçã e suco de maçã

Uma das formas de evitar a contaminação por patulina é a eliminação do fungo produtor da mesma. O hipoclorito de sódio, ao ser usado na lavagem de frutas, não permite a colonização de fungos e conseqüente produção de patulina (HASAN, 2000). Da mesma maneira, o peróxido de hidrogênio também tem se mostrado como inibidor do crescimento de *P. expansum* (VENTURINI et al., 2002).

A diminuição da contaminação de maçãs pelo *P. expansum* pode ser feita utilizando-se a oxidação eletrolisada da água. Porém, este processo apresenta o inconveniente do custo alto do equipamento e o consumo de energia elétrica (OKULL & LABORDE, 2004).

No suco de maçã, a adição de ácido ascórbico (500mg kg^{-1}) reduziu em 50% os níveis de patulina (AYTAÇ & ACAR, 1994). Segundo DRUSCH et al. (2007), para uma rápida degradação da patulina pelo ácido ascórbico, é necessário a presença de oxigênio e radicais livres. A oxidação do ácido ascórbico na presença de oxigênio e íons metálicos é possível fonte destes radicais. Devido ao baixo conteúdo de oxigênio no *headspace* das embalagens de sucos, a adição de ácido ascórbico antes do enchimento das embalagens não é uma estratégia eficiente de descontaminação.

O carvão ativado devido às suas propriedades adsorventes, foi usado para reduzir os níveis de patulina em suco de maçã. No entanto, sabe-se que a aparência e o sabor do suco podem ser afetados pelo tratamento com este composto (LEGGOTT et al. 2001). O uso de três gramas de carvão ativado por litro de suco de maçã, com tempo de contato de cinco minutos resultou em redução de $62,3$ para $30,8\mu\text{g kg}^{-1}$ nos níveis de patulina (KADAKAL & NAS, 2002).

A redução da quantidade de patulina durante o processo de clarificação do suco foi relatada por vários autores. BISSESSUR et al. (2001) estudaram alguns tipos de clarificação e constataram ser a centrifugação o método mais efetivo, com redução de 20,5% do total da toxina. Ao comparar a clarificação utilizando filtro rotatório a vácuo e ultrafiltração, ACAR et al. (1998) concluíram que o filtro rotatório foi mais eficaz na redução da patulina, com redução de 39% nos níveis da micotoxina, sendo que a ultrafiltração possibilitou 25% de redução dos níveis de patulina. WELKE et al. (2008) estudaram a redução dos níveis de patulina nas fases do processamento do suco de maçã. Os autores concluíram que após a pasteurização, tratamento enzimático, microfiltração e evaporação a redução do conteúdo de patulina foi de 40, 28, 20 e 28%, respectivamente.

O uso de leveduras com o objetivo de degradar a patulina foi demonstrado por MOSS & LONG (2002). Os níveis da toxina foram reduzidos na presença de ***Saccharomyces cerevisiae***, sob condições fermentativas, o que não ocorreu quando a levedura foi cultivada em condições aeróbias. Os autores confirmaram que a degradação da micotoxina tem como produtos (Z)-ascladiol e (E)-ascladiol, sendo este último o metabólito de maior incidência.

CONCLUSÕES

Os estudos em animais têm demonstrado que a patulina é uma micotoxina com potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico. Por isso, alertas para os possíveis riscos à saúde vinculados à ingestão diária desta micotoxina através do consumo de maçãs e seus produtos derivados têm sido feitos. A presença da patulina em alimentos também reflete em perdas econômicas, principalmente às indústrias que exportam seus produtos a países que controlam os níveis desta micotoxina. Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a determinação da patulina empregando metodologias de baixo custo e tempo de análise, com quantidades reduzidas de solventes orgânicos e menor geração de resíduos tóxicos. A seleção das maçãs usadas para a produção de suco é uma prática positiva no sentido de diminuir os níveis desta micotoxina no suco. Por outro lado, as frutas que são destinadas ao processamento industrial são aquelas que não atingem o padrão exigido para o consumo *in natura* e o processamento caracteriza-se como uma forma de aproveitar estas frutas que seriam descartadas. A melhor alternativa seria prevenir os danos que ocorrem na superfície das maçãs e a conseqüente colonização de fungos, que por sua vez, podem produzir micotoxinas. Boas práticas durante a colheita e transporte desta fruta são importantes no que diz respeito à prevenção da infecção fúngica, bem como o armazenamento sob condições adequadas. Pesquisas sobre a ocorrência da patulina em alimentos nos diversos países do mundo, inclusive no Brasil, fazem-se necessárias devido a divergências nos resultados obtidos até então.

REFERÊNCIAS

- ACAR, J. et al. The effect of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. **Food Research and Technology**, v. 207, p. 328-331, 1998.
- AKTAS, A.H. et al. Determination of patulin in apple juice produced in Isparta, Turkey by HPLC with diode array detection. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.12, n.3, p.228-231, 2004.
- AOAC-Association of Official Analytical Chemist International. **Official Methods of Analysis**, 17th ed, Gaithersburg (MD): Methods 974.18 e 995.10, 2000.

- ARAFAT, W.; MUSA, M.N. Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v.87, n.2, p.177-186, 1995.
- AYTAÇ, S.A.; ACAR, J. Einfluss von L-Ascorbinsäure und Schwefelioxid auf die Stabilität von Patulin in Apfelsäften und Pufferlösungen. **Ernährung**, v.1, p.15-17, 1994.
- BECCHI, P.J. et al. Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. **Journal of Applied Toxicology**, v.1, p.256-263, 1981.
- BISSESSUR, J. et al. Reduction of patulin during apple juice clarification. **Journal of Food Protection**, v.64, n.8, p.1216-1219, 2001.
- BONDY, G.S.; PETSTKA, J.J. Immunomodulation by fungal toxins. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v.3, n.2, p.109-143, 2000.
- BOONZAAIJER, G. et al. Analysis of patulin in Dutch food, an evaluation of a SPE based method. **Food Control**, v.16, n.7, p.587-591, 2005.
- BROOM, W.A. et al. The pharmacology of patulin. **The British Journal of Experimental Pathology**, v.25, p.195-207, 1944.
- CHERAGHALI, M.A. et al. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. **Food Control**, v.16, n.2, p.165-167, 2005.
- CIEGLER, A. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.31, n.5, p.664-667, 1976.
- CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. **Position paper on patulin**. The Hague: WHO/FAO, 1998.
- DRUSCH, S. et al. Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, v.100, n.1, p.192-197, 2007.
- DURAKOVIC, S. et al. The determination of patulin in apple juice. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v.44, n.3, p.263-268, 1993.
- EISELE, T.A.; GIBSON, M.Z. Syringe-cartridge solid-phase extraction method for patulin in apple juice. **Journal of AOAC International**, v.86, n.6, p.1160-1163, 2003.
- ESCOULA, L. et al. Patulin immunotoxicology: Effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. **International Journal of Immunopharmacology**, v.10, n.8, p.983-989, 1988.

- FERNANDEZ, T.E.O. et al. Presence of patulin in fruit purees and juices. **Alimentaria**, v.321, p.133-135, 2001.
- FLIEGE, R.; METZLER, M. The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and α -amino groups. **Chemico-Biological Interactions**, v.123, n.2, p.85-103, 1999.
- FLIEGE, R.; METZLER, M. Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts. **Chemical Research in Toxicology**, v.13, n.5, p.373-381, 2000.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins 1995**. Rome: FAO, p.7-28, 1997.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for FDA components and industry apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products: adulteration with Patulin**. Gaithersburg: AOAC International, 2001.
- FRISVAD, J.C. et al. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v.49, p.201-241, 2004.
- GÖKMEN, V.; ACAR, J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. **Journal of Chromatography A**, v.815, n.1, p.99-102, 1998.
- GÖKMEN, V.; ACAR, J. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.847, n.1-2, p.69-74, 1999.
- GÖKMEN, V.; ACAR, J. Long-term survey of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.11, p.933-936, 2000.
- GÖKMEN, V. et al. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction . **Analytica Chimica Acta**, v.543, n.1-2, p.64-69, 2005.
- HASAN, H.A. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, n.7, p.607-612, 2000.
- IARC-International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans**, v.40, p. 83-98, 1986.
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003**. Capturado em: 12 dez. 2007. On line. Disponível na Internet: www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof_2002/efault.shtm.

IBRAF-Instituto Brasileiro de Frutas. **Comparativo das Exportações Brasileiras de Frutas Frescas 2004-2005**. Capturado em: 12 dez. 2007. Disponível na Internet: http://www.ibraf.org.br/x-es/pdf/CEBFF_2004_2005.pdf.

IHA, M.H.; SABINO, M. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v.89, n.1, p.139-143, 2006.

IHA, M.H.; SABINO, M. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. **Food Control**, v.19, n.4, p.417-422, 2008.

IMAIDA, K. et al. Quantitative analysis of initiating and promoting activities of five mycotoxins in liver carcinogenesis in rats. **Cancer Letters**, v.16, p.137-143, 1982.

ITO, R. et al. Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination in Japan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.25, p.7464-7468, 2004.

KADAKAL, C.; NAS, S. Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid and some other properties of apple juice. **Nahrung-Food**, v.46, n.1, p.31-33, 2002.

KARABULUT, O.A.; BAYKAL, N. Evaluation of the use of microwave power for the control of postharvest diseases of peaches. **Postharvest Biology and Technology**, v.26, n.2, p.237-240, 2002.

KARABULUT, O.A. et al. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. **Postharvest Biology and Technology**, v.24, n.2, p.103-111, 2002.

LAI, C.L. et al. Detection of Mycotoxin Patulin in Apple Juice. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.8, n.2, p.85-96, 2000.

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

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

LEGGOTT, N.L. et al. The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon. **Food Additives and Contaminants**, v.18, n.9, p.825-829, 2001.

LI, J.K. et al. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. **Food Control**, v.18, n.5, p.530-534, 2007.

- LIU, B.H. et al. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.191, n.3, p.255-263, 2003.
- LIU, B.H. et al. Mycotoxin patulin activates the p38 kinase and JNK signaling pathways in human embryonic kidney cells. **Toxicological Sciences**, v.89, n.2, p.423-430, 2006.
- MAHFOUD, R. et al. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: Mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.181, n.3, p.209-218, 2002.
- MARTINS, M.L. et al. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.6, p.568-574, 2002.
- MELLO, L.M.R. **Produção e Mercado Brasileiro de maçã: comunicado técnico n.50-EMBRAPA-2004**. Capturado em: 12 dez. 2007. Disponível na Internet:<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicad/.pdf>.
- MORTIMER, D.N. et al. A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin. **Food Additives and Contaminants**, v.2, p.165-170, 1985.
- MOSS, M. Mycotoxins. **Mycological Research**, v.100, n. 5, p.513 - 523, 1996.
- MOSS, M.; LONG, M.T. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.4, p.387-399, 2002.
- NORTHOLT, .M.D., BULLERMAN, L.B. Prevention of mold growth and toxic production through control of environmental conditions. **Journal of Food Protection**, v.45, p.519-526, 1982.
- OKULL, D.O.; LABORDE, L.F. Activity of electrolyzed oxidizing water against *Penicillium expansum* in suspension and on wounded apples. **Journal of Food Science**, v.69, n.1, p.FMS23-FMS27, 2004.
- PIEMONTESE, L. et al. Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.5, p.437-442, 2005.
- PRADO, G. et al. Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.59, n.1-2, p.21-25, 2000.
- PRIETA, J. et al. Determination of patulin by diphasic dialysis extraction and thin-layer chromatography. **Journal of Food Protection**, v.55, n.12, p.1001-1002, 1992.

- PRIETA, J. et al. Determination of patulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with extraction by diphasic dialysis. **Analyst**, v.118, n.2, p.171-173, 1993.
- RILEY, R.T.; SHOWKER, J.L. The mechanism of patulin cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 109, p.108-126, 1991.
- RITIENI, A. Patulin in Italian commercial apple products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.20, p.6086-6090, 2003.
- RYCHLIK M.; SCHIEBERLE P. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.9, p.3749-3755, 1999.
- RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research and Technology**, v.212, p.274-278, 2001.
- RYCHLIK, M. et al. Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.729-735, 2004.
- SCHUMACHER, D.M. et al. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. **Archives of Toxicology**, v.79, n.2, p.110-121, 2005.
- SCHUMACHER, D.M. et al. DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. **Toxicology Letters**, v.166, n.3, p.268-275, 2006.
- SELMANOGLU, G.; KOÇKAYA, E.A. Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n.5, p.721-727, 2004.
- SELMANOGLU, G. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, n.12, p.2019-2024, 2006.
- SEWRAM, V. et al. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.897, n.1-2, p.365-374, 2000.

- SHEPHARD, G.S.; LEGGOTT, N.L. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. **Journal of Chromatographic A**, v.882, n.1–2, p.17–22, 2000.
- SHEU, F.; SHYU, Y.T. Analysis of patulin in apple juice by dysphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.7, p.2711-2714, 1999.
- SPEIJERS, G.J. et al. Subacute toxicity study of patulin in the rat: Effects on the kidney and the gastro-intestinal tract. **Food Chemistry and Toxicology**, v.25, p.23-30, 1988.
- SYLOS, C.M.; RODRIGUEZ AMAYA, D.B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v.16, n.2, p.71-74, 1999.
- TANGNI, E.K. et al. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. **Food Additives & Contaminants**, v.20, n.5, p. 482-489, 2003.
- TANIWAKI, M.H. et al. Migration of patulin in apples. **Journal of Food Protection**, v.55, n.8, p.902-904, 1992.
- THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission Regulation (EC) No. 1881/2006–303-L364/17**. Brussels: Official Journal European Union, p.13-14, 2006.
- THUVANDER, A. et al. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. **Food additives and Contaminants**, v.18, n.8, p.696-706, 2001.
- TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.
- TRUCKSESS, M.W.; TANG, Y. Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. **Journal of AOAC International**, v.82, n.5, p.1109-1113, 1999.
- TSAO, R.; ZHOU, T. Micellar eletrokinetic eletrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.11, p.5231-5235, 2000.

- VENTURINI, M.E. et al. In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. **Journal of Food Protection**, v.65, n.5, p.834-839, 2002.
- VERO, S. et al. A rapid TLC-scanning method for the determination of patulin in apple products. **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, v.12, n.3, p.172-174, 1999.
- VERO, S. et al. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.26, n.1, p.91-98, 2002.
- WELKE, J.E. et al. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. **Food Control**, doi:10.1016/j.foodcont.2008.02.001, 2008.
- WICHMANN, G. et al. The effect of gliotoxin and patulin on human T cell function. **Indoor and Built Environment**, v.12, n.4, p.255-258, 2003.
- WU, T. et al. Activation of ERK mitogen-activated protein kinase in human cells by the mycotoxin patulin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, n.2, p.103-111, 2005.
- YURDUN, T. et al. Incidence of patulin in apple juices markets in Turkey. **Journal of Food Protection**, v.64, n.11, p.1851-1853, 2001.

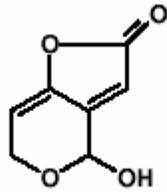


Figura 1: Estrutura da patulina

Tabela 1 - Ocorrência de patulina em suco de maçã.

País	n*	Amostras positivas (%)	Intervalo patulina (µg/L)	Referência
Brasil	30	1 (3)	< 17	SYLOS & RODRIGUES-AMAYA (1999)
EUA	10	2 (20)	80 – 110	TRUCKSESS & TANG (1999)
Turquia	482	162 (34)	50 – 376	GÖKMEN & ACAR (2000)
Brasil	13	1 (8)	< 10	PRADO et al. (2000)
África do Sul	20	6 (23)	5 – 45	LEGGOTT & SHEPHARD (2001)
Cuba	20	1 (5)	<1,72	FERNANDEZ et al (2001)
Suécia	39	5 (13)	2 – 50	THURVANDER et al. (2001)
Turquia	45	27 (60)	19,1 – 732,8	YURDUN et al. (2001)
Itália	21	5 (24)	5,8 – 56,4	RITIENI (2003)
Bélgica	43	35 (81)	0,7 – 17,3	TANGNI et al. (2003)
Japão	76	15 (20)	1,4 – 45,6	ITO et al. (2004)
Irã	23	18 (78)	15 – 149	CHERAGHALI et al. (2005)
Itália	67	28 (42)	0,07 – 69,3	PIEMONTESE et al. (2005)
Brasil	27	3 (11)	3 – 7	IHA & SABINO (2008)

* número de amostras analisadas

Tabela 2 - Métodos de análise de patulina em suco de maçã.

Extração	Limpeza	Técnica	LD (µg/L)	Recuperação (%)	Referência
Acetonitrila-4%KCl	-	CCD	0,01/ ponto	90-95	MARTINS et al. (2002)
EFS: Oasis HLB, Waters	Bicarbonato de sódio, Ácido acético	CLAE-UV	10	92	EISELE & GIBSON (2003)
EFS: Oasis HLB, GL-Pak	-	CLAE-EM	-	>95	ITO et al. (2004)
Acetato de etila	Carbonato de sódio	CLAE-DAD	-	74-105	AKTAS et al. (2004)
EFS: PVPP	EFS-C ₁₈	CLAE-UV	3	91-96	GÖKMEN et al. (2005)
Enzimas	EFS-C18, Romer	CLAE-UV	25*	87	BOONZAA IJER et al. (2005)
Acetato de etila	-	CLAE-DAD	3	81,1 – 91,7	IHA & SABINO (2006)
EFS: C ₁₈ ou ELL: acetato de etila	- Carbonato de sódio	CLAE-UV	5	96,4 – 114,1	LI et al. (2007)
		CLAE-UV	5	75,2 – 89,2	LI et al. (2007)

LD: limite de detecção; CCD: cromatografia em camada delgada; EFS: extração em fase sólida; CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta; CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por espectrometria de massa; CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos; ELL: extração líquido-líquido, *limite de quantificação

CAPÍTULO 6

6. DISCUSSÃO GERAL

6.1 Pesquisa da microbiota fúngica das maçãs

As maçãs utilizadas para a produção de suco pela indústria estudada eram provenientes de câmaras frias de diversas cidades da Serra Gaúcha, onde estavam armazenadas a 1°C por período de tempo indeterminado. A primeira etapa deste trabalho foi isolar as colônias de fungos das maçãs. O gênero e a espécie de cada cepa isolada foram identificados segundo metodologia proposta por Pitt e Hocking (1997), com base nas características macroscópicas e microscópicas das colônias desenvolvidas nos meios de cultura CYA (*Czapeck Yeast extract Agar*), MEA (*Malt Extract Agar*), CSN (*Creatine Sucrose Neutral*) e G25N (*Glycerol Nitrate Agar*). Nas imagens da figura 3 observa-se a mesma cepa de *Penicillium expansum* em diferentes meios de cultura a 25°C/7dias e na figura 4 observa-se três espécies de *Penicillium* visualizadas em microscópio óptico.



Figura 3. *Penicillium expansum* em diferentes meios usados para a identificação.

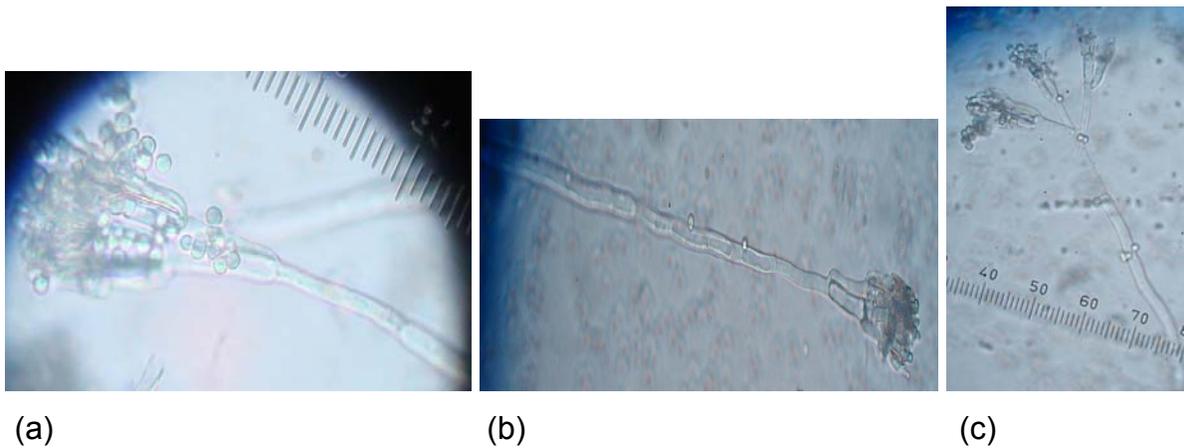


Figura 4. Imagem de Conidióforo de (a) *Penicillium commune*, (b) *P. expansum* e (c) *P. aurantiogriseum* em microscopia com aumento de 400x.

Algumas espécies do gênero *Penicillium* apresentaram características muito semelhantes no que se refere à produção de exudato, tamanho e cor da colônia, o que dificultou a identificação. Nestes casos aplicou-se o teste de Ehrlich. Uma tira de papel filtro foi mergulhada no reagente de Ehrlich (2 g de 4-dimetilaminobenzaldeído, 85 mL de etanol 96% e 15 mL de HCl 10 N) e sobre esta foi colocada um pedaço da colônia desenvolvida no meio de cultura CYA a 25°C por 7-14 dias. Este conjunto foi exposto a fumaça proveniente da queima de madeira. A resposta positiva para este teste ocorre com o aparecimento de coloração roxa após 2 min de exposição a fumaça (PITT & HOCKING, 1997). Espécies para as quais este teste é positivo são: *P. camemberti*, *P. commune*, *P. expansum* e *P. roqueforti*. Apenas *P. crustosum* produz coloração amarela visível no papel filtro (LUND, 1995). Estas reações de cor ocorrem devido à metabólitos secundários produzidos por determinadas espécies de *Penicillium*. Este procedimento foi útil para diferenciar *P. commune* de *P. crustosum*.

As maçãs utilizadas para a produção de suco concentrado apresentavam vários tipos de defeitos, como não uniformidade de tamanho e distribuição de coloração na casca; algumas maçãs apresentavam deterioração e desenvolvimento de estruturas do fungo visíveis na sua superfície. Dos 16 lotes de maçãs analisados, foram isoladas 57 colônias de fungos pertencentes a três gêneros (Figura 5). Oito espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Penicillium* foram identificadas (Figura 6).

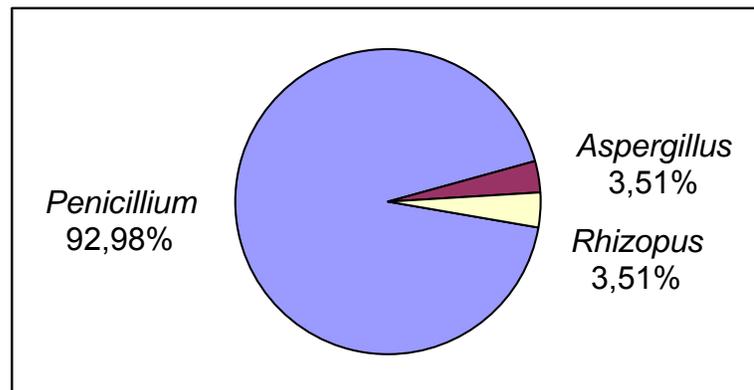


Figura 5. Gêneros de fungos isolados das maçãs provenientes de câmaras frias e destinadas à produção de suco.

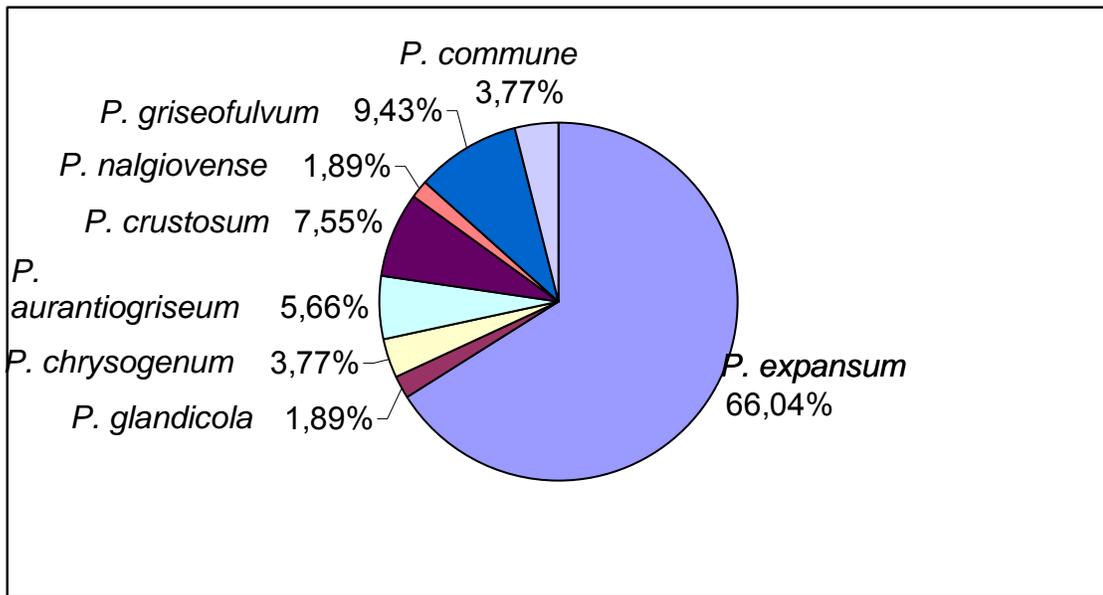


Figura 6. Espécies de *Penicillium* isoladas das maçãs destinadas à produção de suco.

P. expansum foi a espécie predominante (66,04% do total de espécies de *Penicillium* identificadas). Das 35 colônias fúngicas isoladas pertencentes a esta espécie, 94,44% se mostraram produtoras de patulina nas condições testadas. Estes resultados estão de acordo com Hansan (2000) que também identificou *P. expansum* como a espécie predominantemente isolada de maçãs. Pianzzolla et al. (2004) trabalhando com maçãs no Uruguai constataram de 79% do total de isolados eram de *P. expansum* e 21% eram da espécie *P. solitum*.

P. griseofulvum, outra espécie produtora de patulina, foi isolada das maçãs destinadas à produção de suco pela indústria, sendo que 80% das cepas pertencentes a esta espécie se mostraram produtoras de patulina nas condições testadas. Dombrink-Kurtzman e Blackburn (2005) avaliaram diferentes espécies de *Penicillium* (*P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. clavigerum* e *P. coprobium*) para identificar qual a espécie que apresentava maior potencial para produzir patulina. O isolado de *P. griseofulvum* foi o que apresentou maior produção da micotoxina em 96 horas. Assim, embora o *P. expansum* seja o mais freqüentemente citado como produtor de patulina em suco de maçã, outras espécies de *Penicillium* são capazes de produzir maior quantidade de patulina.

Em todos os lotes de maçãs provenientes de câmaras frias foram isoladas cepas produtoras de patulina. Estes resultados indicam que uso de temperatura baixa, que no caso das maçãs analisadas foi de 1°C, durante o armazenamento não é suficiente para inibir o desenvolvimento de fungos, bem como a produção de patulina.

6.2 Otimização do processo de extração da patulina da maçã e suco de maçã

Várias metodologias foram testadas para extração da patulina da maçã e suco de maçã, envolvendo vários tipos de solventes de extração e etapas de limpeza para a obtenção de um extrato com o máximo de recuperação e o mínimo de compostos interferentes. A patulina é uma molécula polar e de baixo peso molecular, o que a torna de difícil extração da matriz aquosa com solventes orgânicos.

O método utilizado para a extração foi modificado a partir da metodologia proposta por Macdonald et al. (2000). O método original envolvia três extrações com acetato de etila, limpeza com solução de carbonato de sódio e adição de sulfato de sódio para secar o extrato. Esta metodologia apresentava algumas limitações, como a não separação do 5-hidroximetilfurfural (HMF) da patulina, pois nas placas de CCD observou-se a sobreposição da fluorescência destes dois compostos. A Figura 7 apresenta a seqüência do procedimento de extração da patulina após otimização.

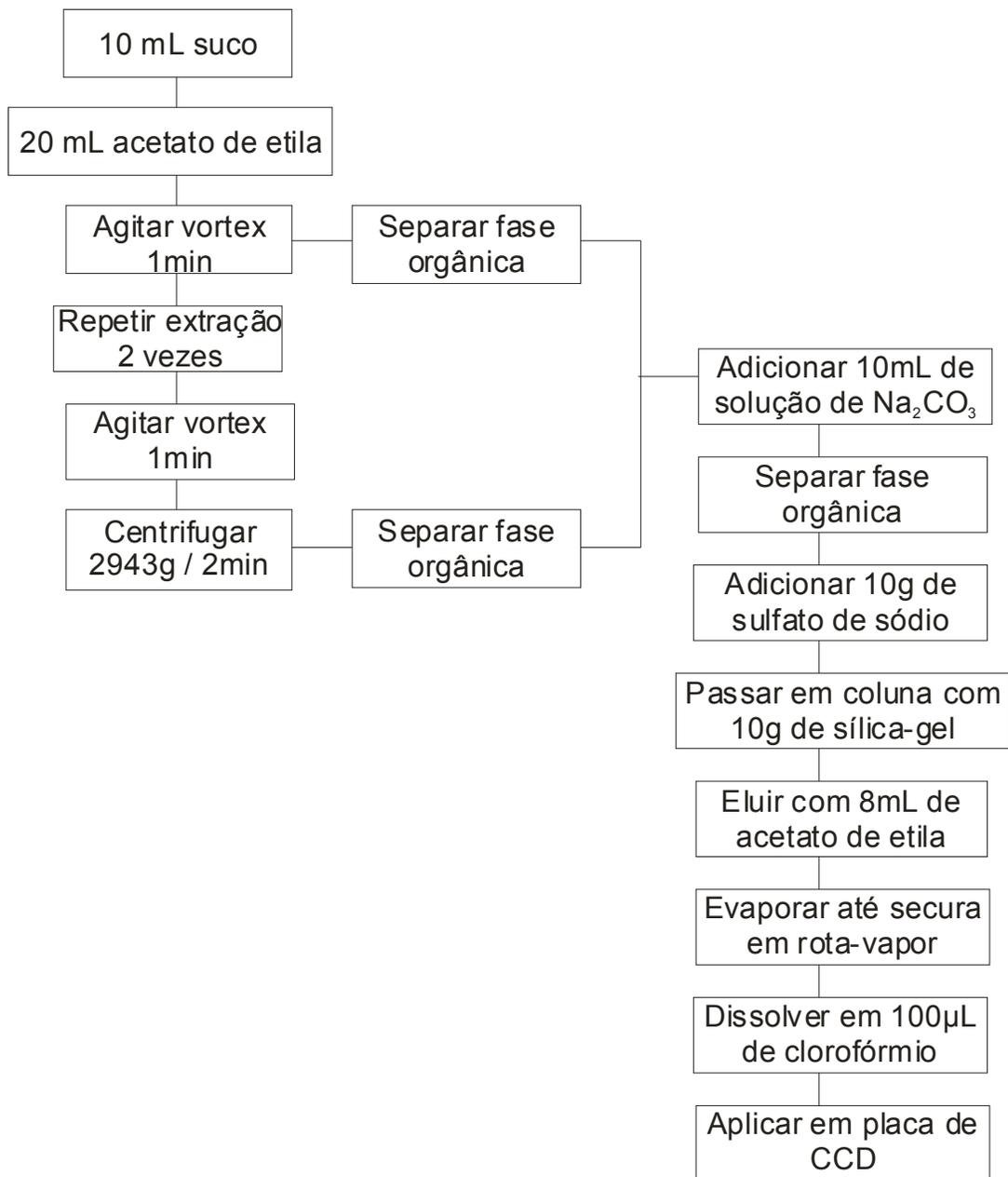


Figura 7. Fluxograma de extração da patulina de maçã e suco de maçã.

A extração da micotoxina da maçã (resultante da moagem: primeira fase do processamento do suco de maçã) e do suco de maçã concentrado foi dificultada pela formação de emulsões. Além disso, o suco concentrado apresentava-se turvo e com partículas em suspensão, que podem causar perdas do analito. Existem métodos que utilizam a enzima pectinase para clarificar o suco e não ocorrer formação de emulsão (KAWASHIMA, SOARES & MASSAGUER, 2002; BOONZAAIJER, BOBELDIJK &

OSENBRUGGEN, 2005). Porém este processo é demorado quando realizado em temperatura ambiente, levando uma noite para a enzima atuar e clarificar o suco, ou cerca de 2 horas a 55°C, o que pode destruir parte da concentração de patulina.

No método de extração foi testado o sulfato de amônio como um clarificante químico, porém o uso do mesmo não apresentou bom resultado. Processos físicos também foram testados como a filtração e centrifugação. A filtração em papel filtro caracterizou-se como um processo demorado, mesmo sob vácuo, o que tornou inviável a sua utilização. A melhor alternativa foi o uso da centrifugação a 2943 g por 2 min; dessa maneira a emulsão formada pelo suco e solvente orgânico é desfeita.

A solução de Na₂CO₃ (carbonato de sódio) adicionada ao extrato tem como objetivo reter compostos fenólicos naturais da maçã na fase aquosa. Estes compostos interferem na análise cromatográfica. A solução de Na₂CO₃ tem pH básico e a patulina é instável neste tipo de solução. Em virtude disso o tempo de contato do extrato orgânico com a solução de Na₂CO₃ foi de no máximo 2 minutos para que não houvesse degradação da micotoxina.

O sulfato de sódio anidro é adicionado ao extrato orgânico para remover água do extrato. A ausência de água é importante para que no momento de aplicação não houvesse o espalhamento da mancha na placa de CCD, o que dificultaria a corrida uniforme da mancha pelo sistema de solventes e conseqüentemente a quantificação da micotoxina.

O emprego adicional de uma coluna de sílica-gel (Figura 8) na metodologia de extração permitiu a separação do HMF e patulina. Com as fluorescências destes dois compostos separadas na placa de CCD (Figura 9) foi possível a quantificação da micotoxina. Para a eluição da patulina da coluna testou-se clorofórmio, clorofórmio:metanol 2:1 (v/v), acetonitrila:KCl 4% 9:1 (v/v) e acetato de etila. O melhor resultado foi obtido ao usar o acetato de etila no volume 8 mL.



Figura 8. Coluna de sílica-gel utilizada para eluição do extrato orgânico e que auxiliou a separação do 5-hidroximetilfurfural da patulina.

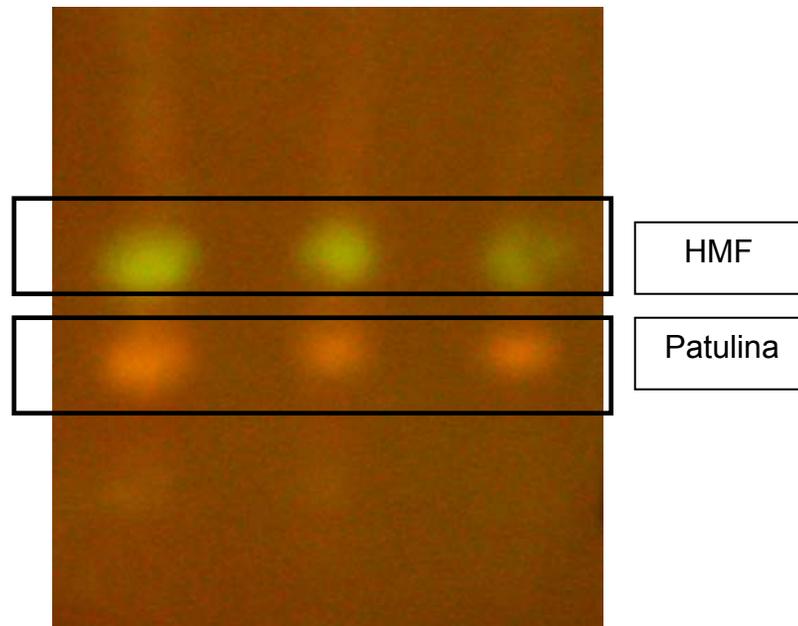


Figura 9. Placa de CCD com 3 concentrações de extrato de suco de maçã demonstrando a separação do HMF e patulina.

Segundo a literatura, a patulina é instável como um filme seco, por isso, após a evaporação do solvente orgânico, tomou-se o cuidado de que o extrato fosse imediatamente redissolvido em concentração conhecida de clorofórmio para evitar a perda da micotoxina.

O método otimizado para extração da patulina foi eficiente para os três tipos de matrizes presentes durante o processamento do suco de maçã: maçã, suco diluído e suco concentrado.

6.3 Otimização das condições cromatográficas

A identificação da patulina na placa de CCD foi feita segundo Martins et al. (2002) com algumas modificações. Após a placa ter sido desenvolvida no sistema de solventes tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:1, v/v/v), borrifou-se uma solução de 3-metilbenzotiazolinona hidrazona 0,5% (MBTH). Esta solução é instável e foi usada somente até 24 horas após seu preparo, pois depois desse período ocorria a formação de um precipitado, o que prejudicava a nebulização. A placa de CCD foi aquecida por 7 min a 130°C e observada sob luz visível. A patulina aparece como ponto amarelo fluorescente.

A fluorescência emitida pela micotoxina, presente na mancha do extrato de uma amostra é comparada com a mancha do padrão de patulina em uma mesma placa de CCD (Figura 10). Além disso, o valor do Rf (relação entre as distâncias percorridas pela micotoxina e pelo solvente de desenvolvimento) também foi utilizado para identificação da patulina. Tanto o padrão patulina quanto a patulina das amostras de maçã e suco tiveram valor de Rf de 0,7.

A CCD é um método rápido, de baixo custo e eficiente para separação e identificação de várias micotoxinas. Neste estudo um método de quantificação da patulina utilizando a CCD foi desenvolvido. Para melhorar a visualização da micotoxina e, conseqüentemente, a quantificação, após borrifar a solução de MBTH e aquecimento, a placa de CCD foi borrifada com solução de ácido fórmico (ácido fórmico

90%:água, 2:98, v/v). A patulina aparece como fluorescência amarelo-laranja sob luz UV.

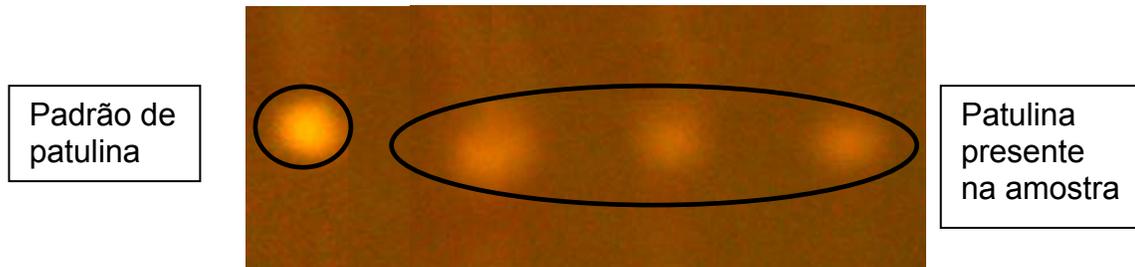


Figura 10. Placa de CCD com padrão de patulina e 3 concentrações de patulina de amostra de suco de maçã.

O aparelho tradicionalmente usado no laboratório de toxicologia do ICTA/UFRGS apresentava forte gradiente de iluminação, sendo que atingia diferenças de até 50% na área da placa de CCD. Assim, ao se observar as placas sob luz UV, amostras iguais eram desigualmente iluminadas, o que resultava em erros no processo de quantificação. Esse problema já havia sido relatado por Zhang e Lin (2006). Erros desse tipo foram superados com o desenvolvimento, em parceria com o Instituto de Física/UFRGS, de um fotômetro. Esse aparelho foi construído de forma que as lâmpadas UV foram distribuídas adequadamente para que a luz UV incidisse uniformemente sob as placas de CCD. Desta maneira, o fotômetro desenvolvido para obtenção das imagens resolveu a principal limitação da quantificação realizada a olho nu, através da comparação da intensidade das fluorescências do analito com quantidades conhecidas de padrão.

A aquisição da imagem da fluorescência da patulina obtida sob luz UV foi feita através de uma câmera com detector DCA (Detector de Carga Acoplada). A intensidade da fluorescência, que corresponde à determinada concentração da micotoxina (Figura 11), foi analisada através do *software* Imstat do pacote Iraf.

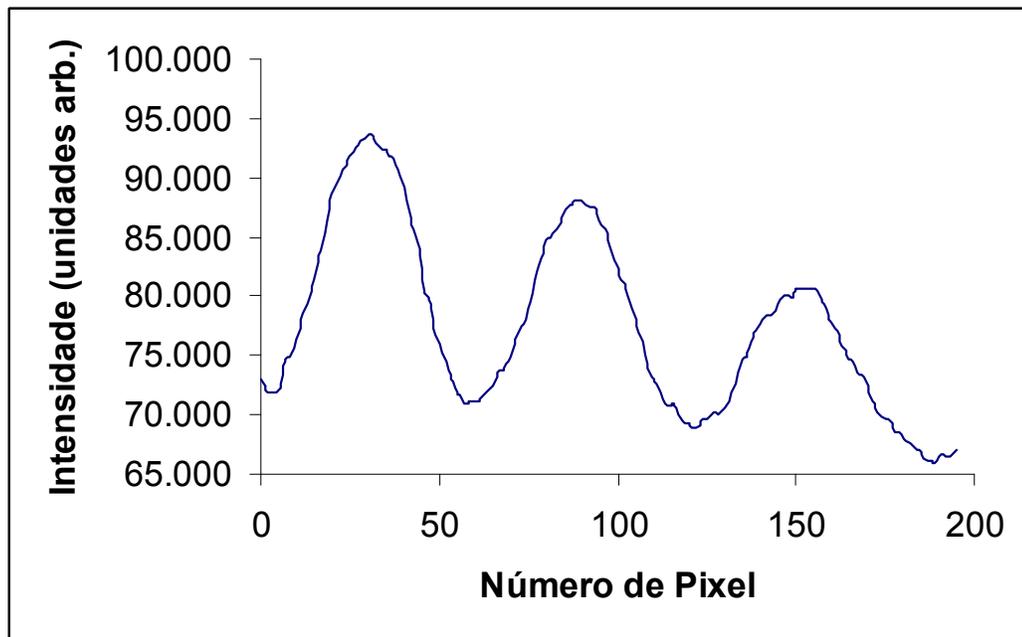


Figura 11. Cromatograma referente à patulina nas concentrações de 5,10 e 20 $\mu\text{g/L}$ de solução padrão.

O procedimento de aquisição e tratamento das imagens usando o software é rápido e utiliza equipamentos simples, o que facilita seu uso. Uma das vantagens do método desenvolvido em relação à quantificação utilizando CCD e densitômetro é o menor tempo de análise.

Para a quantificação precisa da patulina necessita-se que o fundo das imagens seja uniforme (Figura 12), pois mudanças ou gradientes na superfície da placa afetam na medida da intensidade da fluorescência do analito. Na figura 14 se observa na imagem 3D da placa CCD a uniformidade do fundo da placa.

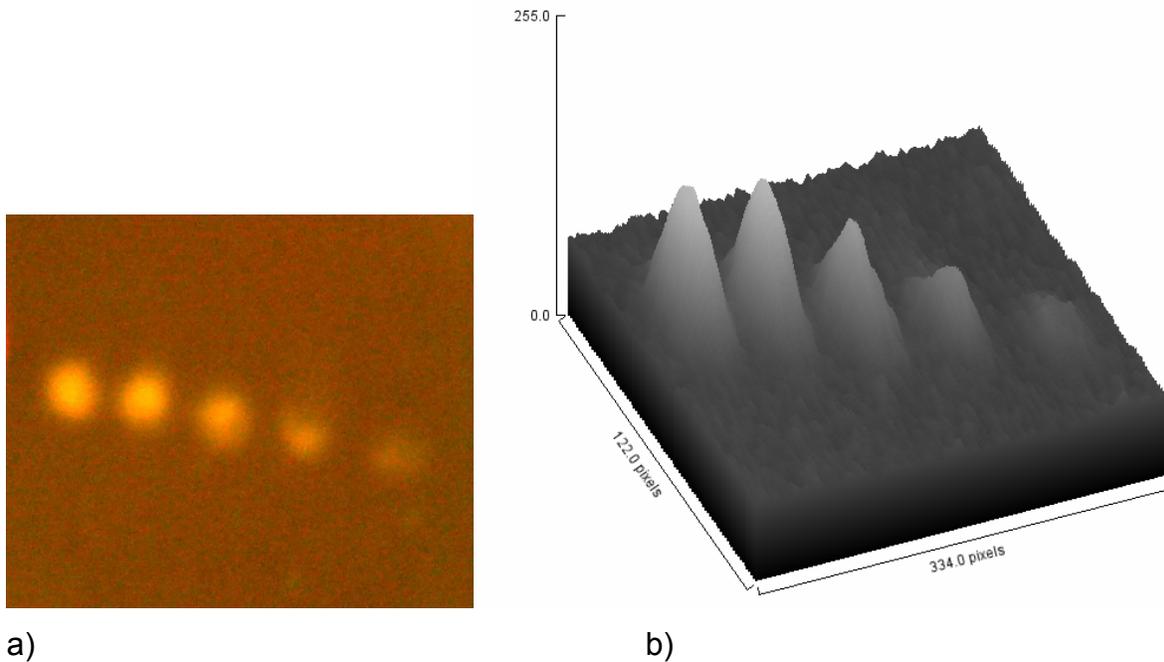


Figura 12. Imagem de placa de CCD obtida pelo DCA: a) imagem original e b) imagem 3D.

Liang et al. (1996) utilizaram o sistema CCD-DCA para determinar aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. O método desenvolvido foi eficiente para a separação e quantificação das aflatoxinas. Os autores concluíram que este sistema apresenta sensibilidade, precisão e linearidade excelentes para ser usado na determinação de aflatoxinas com LD de 5 pg.

6.4 Validação do método

Para validação intralaboratorial do método desenvolvido foram avaliados: linearidade, recuperação, precisão, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

A validação do método mostrou boa linearidade, cujo coeficiente de correlação foi $R^2 = 0,996$ (Figura 13). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, BRASIL, 2003) o valor mínimo aceitável é 0,99.

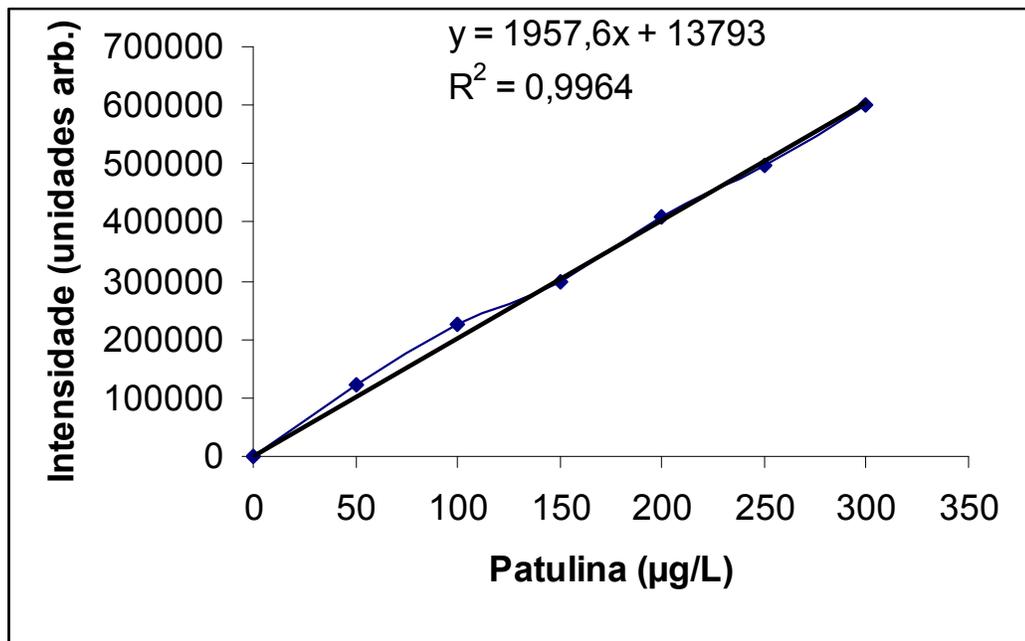


Figura 13. Curva padrão demonstrando a linearidade do método.

O uso do detector DCA melhorou a visualização da patulina e diminuiu o limite de detecção de 50 (obtido pela visualização da fluorescência a olho nu) para 5 ng por ponto de aplicação na placa de CCD (Figura 14).

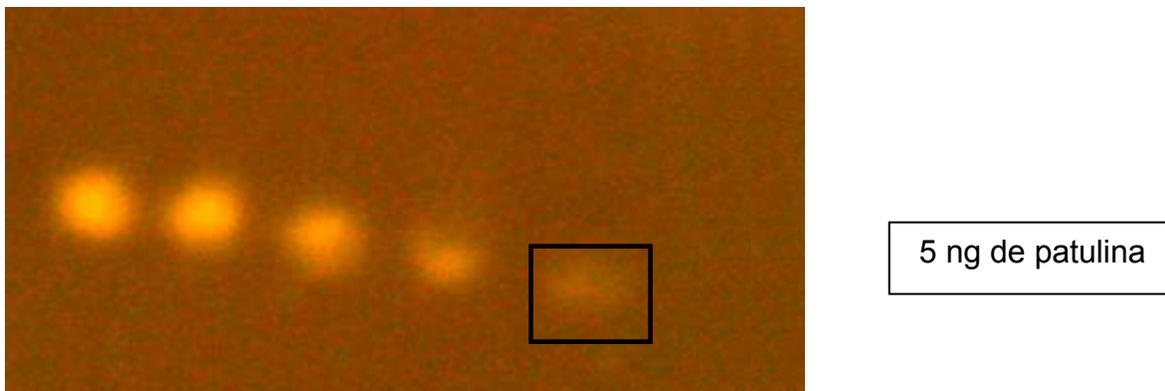


Figura 14. Placa de CCD com diferentes concentrações de padrão de patulina.

O procedimento de recuperação foi realizado para as três matrizes presentes nas etapas de produção do suco de maçã (Tabelas 6, 7 e 8). Na etapa de moagem, a média de recuperação foi de 90%, no suco diluído foi de 92% e no suco concentrado a média de recuperação foi de 95%.

Tabela 6. Recuperação do método de análise de patulina em maçã.

Patulina adicionada $\mu\text{g/L}$	Recuperação ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	CV (%)
200	182,4	91,2	4,3
300	277,5	92,5	6,2
400	354,4	88,6	4,2

CV = Coeficiente de variação

Tabela 7. Recuperação do método de análise de patulina em suco de maçã diluído.

Patulina adicionada $\mu\text{g/L}$	Recuperação ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	CV (%)
50	46,1	92,2	5,3
100	92,3	92,3	6,9
200	188,8	94,4	4,8

CV = Coeficiente de variação

Tabela 8. Recuperação do método de análise de patulina em suco de maçã concentrado.

Patulina adicionada ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	CV (%)
50	46,5	93,0	4,9
100	96,3	96,3	3,6
200	192,7	96,4	8,7

CV = Coeficiente de variação

A tabela 9 mostra a precisão do método, onde se observa que nos três níveis de concentração os valores dos coeficientes de variação foram menores que 10%, comprovando a boa precisão do método.

Tabela 9. Precisão do método para análise de patulina em suco de maçã.

Patulina adicionada (µg/L)	Intra-ensaio (n=4)		Inter-ensaios (n=4)	
	Recuperação (µg/L)	CV (%)	Recuperação (µg/L)	CV (%)
50	46,41	4,2	46,64	7,4
100	90,00	6,2	97,05	5,7
200	189,99	9,1	187,58	5,6

CV = Coeficiente de variação

O LD e LQ obtidos foram de 0,005 µg e 14 µg/L, respectivamente. Na tabela 10 observa-se que o coeficiente de variação e a recuperação garantem a precisão e a exatidão necessárias para que o limite de quantificação seja considerado aceitável. O valor de LQ é adequado para atender ao limite máximo de 50 µg/L de patulina em alimentos, recomendado pelo *Codex Alimentarius*.

Tabela 10. Limite de quantificação da patulina utilizando CCD com detector DCA.

Patulina adicionada (µg/L)	Patulina recuperada (µg/L)	N	Recuperação (%)	CV (%)
14	12,5	3	89,2	6,9

N= número de determinações; CV = Coeficiente de variação

O sistema CCD-DCA desenvolvido neste estudo obteve melhores parâmetros de validação que outros métodos que utilizaram cromatografia em camada delgada. Vero et al. (1999) utilizaram a CCD, acetato de etila como solvente de extração, carbonato de sódio para limpeza e 3-metilbenzotiazolinona hidrazona como reagente revelador e densitômetro para quantificar a patulina. A recuperação foi de 78% para quantidades entre 50 e 150 µg/L, o LD e o LQ relatado pelos autores foi de 30 ng e 50 µg/L, respectivamente. Prieta et al. (1992) utilizaram a diálise bifásica para preparação de amostra e a quantificação foi feita nas placas de CCD com comparação visual da patulina das amostras com quantidades conhecidas de padrão. O LD e o LQ foi de 56 ng e 50 µg/L, respectivamente e a recuperação foi de 65%.

Os resultados da validação obtidos neste estudo para análise de patulina em suco de maçã foram semelhantes aos resultados de Eisele e Gibson (2003). Os autores utilizaram extração em fase sólida, bicarbonato de sódio para a limpeza e CLAE-UV obtiveram LD de 1 µg/L, LQ de 10 µg/L e recuperação de 92%. Sheu e Shyu (1999) utilizaram CG-EM e relataram LD de 10 µg/L e recuperação de 77-109%.

Muitos métodos que têm sido pesquisados nos últimos anos exigem equipamentos sofisticados, caros e de difícil manutenção, solventes de elevado grau de pureza e alto custo, o que dificulta sua aplicação. O método utilizado neste estudo mostrou-se eficiente e econômico. Os resultados da validação confirmaram que o método é sensível para ser usado para quantificar patulina em suco de maçã.

6.2 Determinação da presença de patulina nas maçãs e no suco

A prevalência de fungos produtores de patulina refletiu em altas concentrações desta micotoxina nas maçãs, variando de 254,62 a 653,37 µg/kg (Figura 15) e nos sucos concentrados produzidos a partir destas maçãs, variando de 56,04 a 231,44 µg/L (Figura 16). O acentuado intervalo de variação observado nos níveis de patulina das maçãs e também nos sucos ilustra que os níveis da micotoxina podem variar dependendo da qualidade das frutas usadas para a produção de suco.

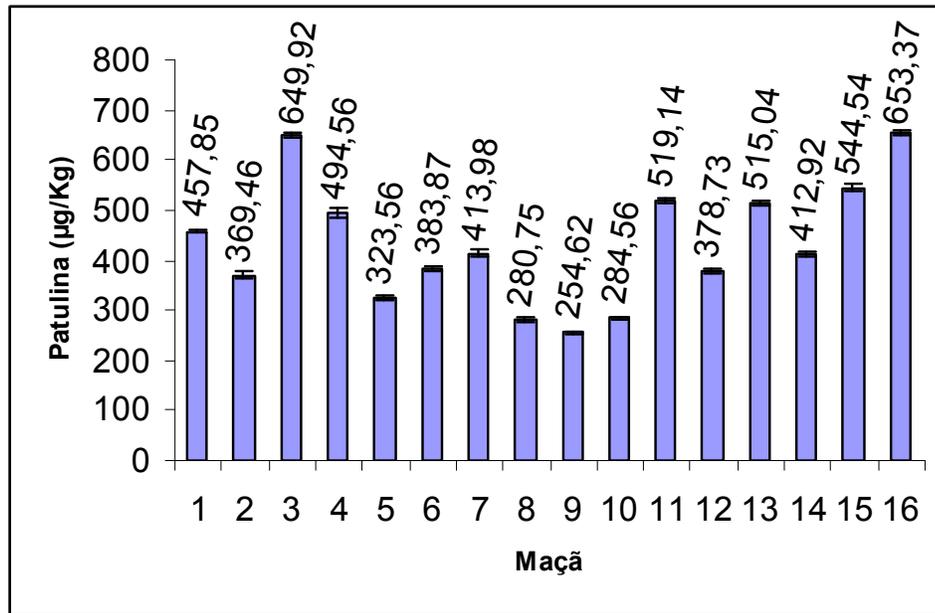


Figura 15. Níveis de patulina em 16 lotes de maçãs provenientes de câmaras frias de diferentes cidades da Serra Gaúcha.

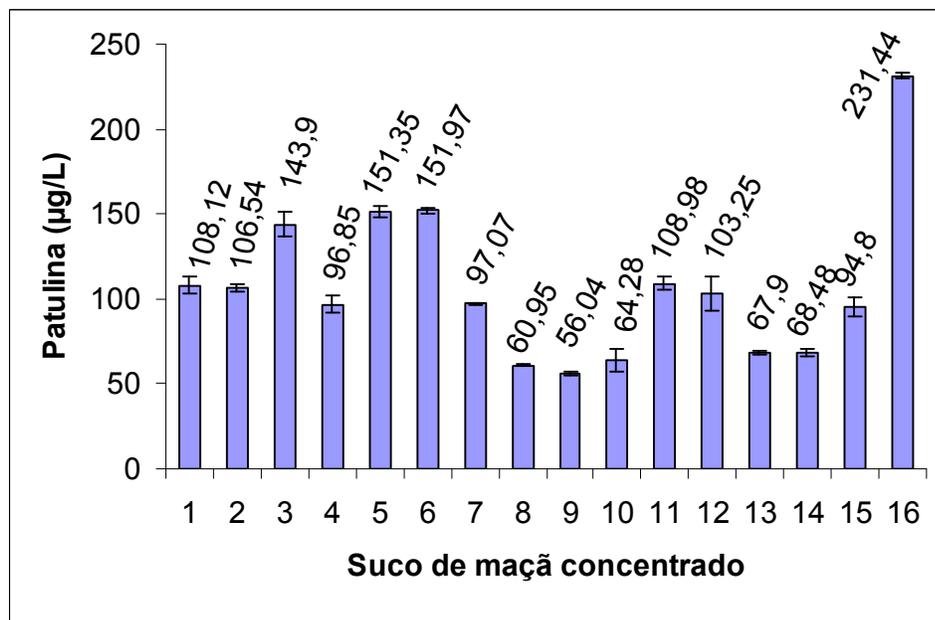


Figura 16. Níveis de patulina do suco de maçã concentrado obtido a partir de maçã armazenadas em câmaras frias a 1°C em diversas cidades da Serra Gaúcha.

Piemontese et al. (2005) avaliaram 22 amostras de maçãs, nas quais a patulina foi detectada em 10 amostras em níveis variando de 11,10 a 81,7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Martins et al. (2002) analisaram 351 maçãs com áreas deterioradas e encontraram patulina com concentração bastante elevada, variando de 3,05 a 80,5 mg/Kg . Beretta et al. (2000) encontraram patulina em 81% das amostras de maçãs que apresentavam áreas deterioradas, sendo que a maior concentração encontrada desta micotoxina foi de 1170 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

O suco concentrado (69°Brix), obtido na última etapa da produção pela indústria foi diluído para 11°Brix. Os níveis de patulina dos sucos diluídos variaram de 14,3 a 46,7 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Figura 17). A patulina foi encontrada em todas as amostras analisadas, mas em nenhuma das amostras foram detectados níveis de patulina acima do limite máximo de 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ que é recomendado pelo *Codex Alimentarius*. Em uma das amostras a concentração de patulina encontrada foi próxima deste limite. Considerando a ingestão diária máxima tolerável provisória de 0,43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo/dia estabelecida pelo JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001), uma pessoa de 60 kg que consumisse cerca de 600 mL de suco de maçã com concentração de patulina igual a 46,7 $\mu\text{g}/\text{L}$ estaria ultrapassando esta ingestão diária máxima tolerável provisória.

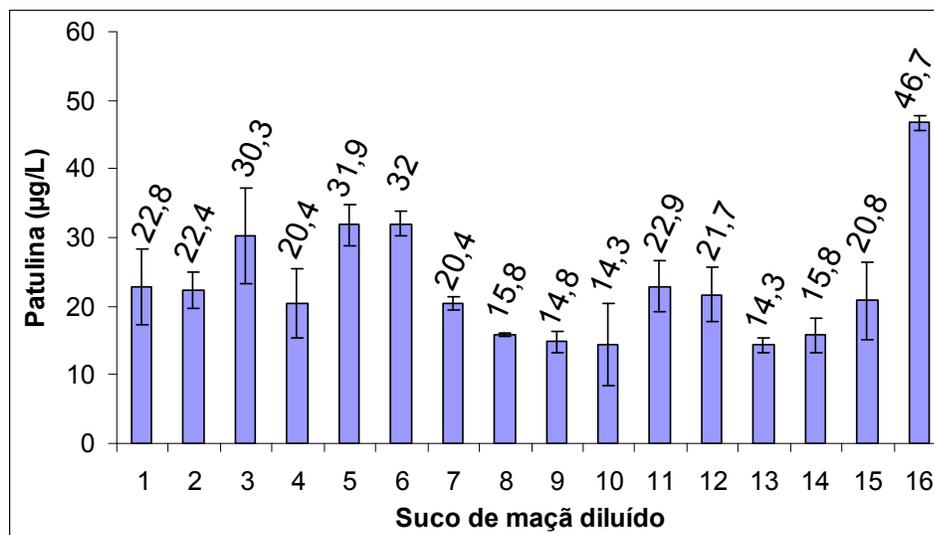


Figura 17. Níveis de patulina do suco de maçã diluído obtido a partir de maçã armazenadas em câmaras frias a 1°C em diversas cidades da Serra Gaúcha.

6.6 Avaliação dos níveis de patulina durante as fases de produção do suco concentrado

Na análise de patulina nas etapas de produção do suco de maçã, observou-se redução nos níveis da micotoxina, desde a moagem até o produto final, o suco concentrado. Os níveis mais elevados de patulina foram encontrados após o processo de moagem, pois como foi detectado na análise micológica das frutas, estas apresentavam alta incidência de fungos produtores de patulina, bem como da micotoxina. Assim, devido a sua solubilidade, a patulina é transferida das maçãs para o suco. A figura 18 mostra a redução média dos níveis de patulina nas fases do processamento do suco dos 16 lotes analisados.

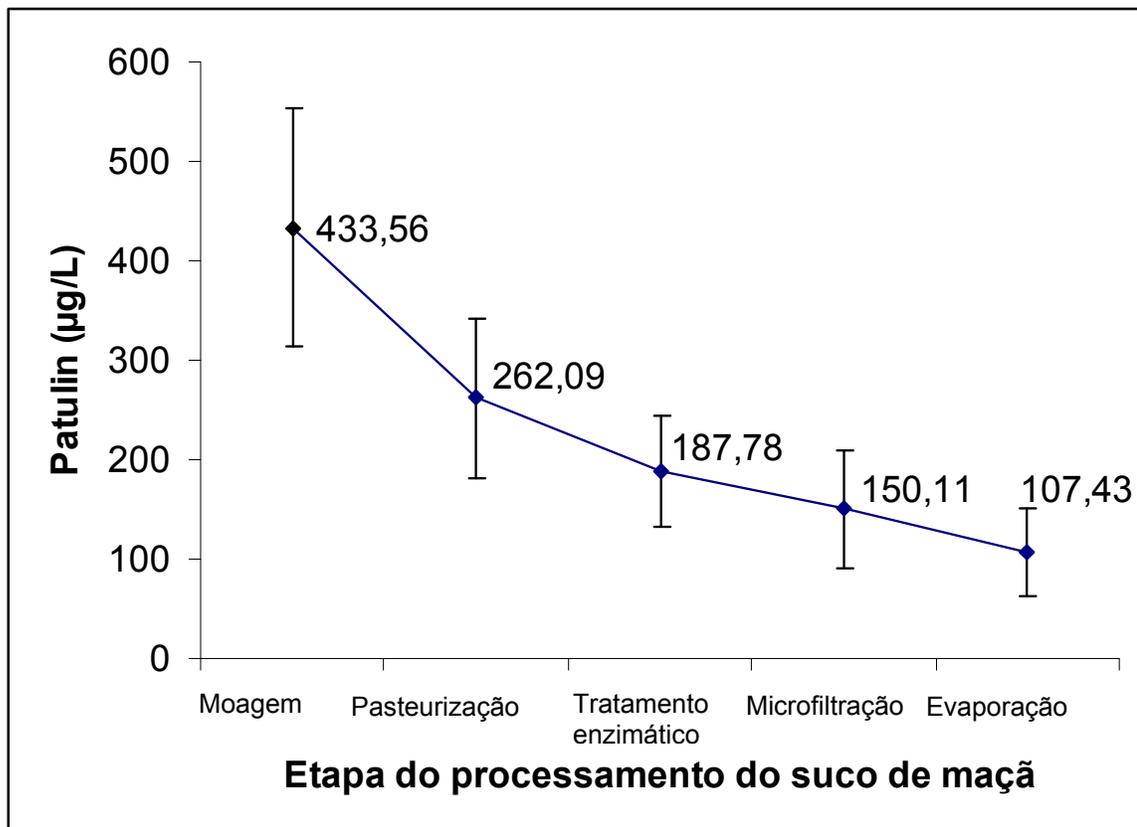


Figura 18. Redução da concentração de patulina nas fases do processamento de 16 lotes de maçãs provenientes de câmaras frias que foram utilizadas para produção de suco concentrado.

A ANOVA (Tabela 11) aplicada para verificar o efeito de cada etapa da produção do suco de maçã nos níveis de patulina. Os resultados da ANOVA mostraram que todas as etapas contribuíram para a redução dos níveis de patulina, sendo que a pasteurização e tratamento enzimático resultaram em redução significativa. O teste post hoc de Tukey separou as etapas de moagem e pasteurização das demais etapas, bem como o tratamento enzimático e a microfiltração em outro grupo, e por fim, a microfiltração e a evaporação em um terceiro grupo.

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) aplicada aos níveis de patulina nas etapas da produção do suco.

Etapa da produção do suco	Patulina ($\mu\text{g/L}$)
Moagem	433.56a
Pasteurização	262.09b
Tratamento enzimático	187.78c
Microfiltração	150.11c,d
Evaporação	107.43d

Médias seguidas de mesma letra não são diferentes significativamente ($p < 0.05$).

Os processos que empregam calor, utilizados na produção do suco causaram reduções moderadas nos níveis de patulina. O processo de pasteurização ocorreu a 90°C por 30 s e a evaporação foi feita a 96°C por 30s. Após a pasteurização e evaporação a média de redução de patulina foi de 39% e 28%, respectivamente.

Os resultados deste trabalho mostraram que a patulina é relativamente estável à degradação térmica. O mesmo foi observado por Taniwaki et al. (1989) que submetem amostras de suco de maçã contaminadas com patulina a tratamento térmico, 2 min a 90°C , seguido de enchimento a quente e tratamento térmico final por 5 min em água em ebulição. Os autores observaram redução de 60% na concentração da micotoxina.

Na microfiltração a redução média de patulina foi de 20,1%. Esta redução pode ser atribuída ao fato da patulina se ligar a partículas sólidas que são removidas com a microfiltração.

Ao considerar todo o processo de produção do suco de maçã a redução da concentração de patulina foi de 75,2%. A pasteurização foi a etapa que mais contribuiu para a redução do nível de patulina. Estes resultados indicaram que, embora o processamento do suco de maçã não elimine a patulina, é possível reduzir os níveis desta micotoxina.

6.7 Pesquisa de fungos termorresistentes

A pesquisa de fungos termorresistentes foi feita nas amostras de suco concentrado. A metodologia proposta por Pitt e Hocking (1997) foi utilizada para o isolamento. O suco concentrado com aproximadamente 69°Brix foi diluído até 11°Brix. Duas porções de 50 mL de suco foram aquecidas a 75°C por 30 min para eliminar microrganismos sensíveis ao calor e posteriormente foram esfriadas rapidamente em água com gelo. Este procedimento de choque térmico é necessário para ativar os esporos que estão injuriados para que possam germinar. Igual volume de Ágar Batata Dextrosado (BDA) em dupla concentração foi misturado ao suco e distribuiu-se o volume total obtido em placas Petri. As placas foram incubadas por 30 dias a 30°C.

Das 16 amostras de suco analisadas, em 4 amostras foram isoladas colônias fúngicas pertencentes ao gênero *Byssochlamys*. A identificação das cepas isoladas foi feita de acordo com Pitt e Hocking (1997), com base nas características microscópicas e macroscópicas das colônias desenvolvidas em meios de cultura (Figuras 19 e 20). Três cepas foram identificadas como *B. fulva* e uma cepa como *B. nivea*.

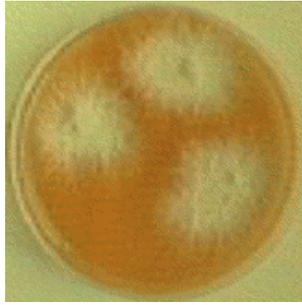


Figura 19. *B. nivea* desenvolvido em CYA 25°C/7dias



Figura 20. *B. fulva* desenvolvido em CYA 25°C/7dias

O potencial toxigênico das cepas foi detectado realizando a extração com clorofórmio/metanol (2:1, v/v) das colônias desenvolvidas em ágar YES. Os extratos juntamente com o padrão da micotoxina foram aplicados em placa de CCD que foi visualizada sob luz UV. A patulina aparece com coloração amarelo-laranja na mesma altura do padrão. Apenas a cepa pertencente à espécie *B. nivea* se mostrou produtora de patulina nas condições testadas. Este fato implicaria em possível produção de patulina no suco durante seu armazenamento antes de ser consumido.

B. nivea, além de produzir patulina pode produzir dióxido de carbono quando cresce sob condições de baixo teor de oxigênio. O estufamento das embalagens de sucos, bem como deteriorações visualmente percebidas em recipientes transparentes, ou ainda deterioração de frutas enlatadas ou engarrafadas ocorrem quando fungos do gênero *Byssochlamys* estão presentes nos alimentos (TANIWAKI & SILVA, 2001).

CONCLUSÕES

1. *Penicillium expansum* foi a espécie fúngica predominantemente isolada das maçãs que estavam armazenadas a 1°C em câmaras frias; 94,44% dos isolados se mostraram produtoras de patulina nas condições testadas;
2. A alta incidência de cepas de *P. expansum* produtoras de patulina nas maçãs refletiu em altas concentrações desta micotoxina nos sucos produzidos a partir destas frutas, variando entre 254,62 e 653,37 µg/kg.
3. O método desenvolvido utilizando cromatografia em camada delgada e detector de carga acoplada mostrou ser apropriado para quantificação de patulina;
4. Os resultados da validação do método são adequados para a análise de patulina em maçã e suco de maçã, com boa linearidade, recuperação e precisão. O limite de detecção de 5 ng e o de quantificação de 14 µg/L são apropriados para analisar pequenas quantidades de patulina e estão abaixo do limite máximo de 50 µg/L recomendado pelo *Codex Alimentarius* para esta toxina;
5. A patulina não é totalmente eliminada durante a produção do suco;
6. O processamento do suco de maçã mostrou significativa redução dos níveis de patulina desde a matéria-prima até o produto final, o suco concentrado. Todas as etapas analisadas da produção do suco contribuíram para esta redução;
7. Os processos que empregam calor utilizados na produção do suco, como a pasteurização e evaporação, causaram reduções moderadas nos níveis de patulina.
8. A presença de *Byssochlamys nivea*, fungo termorresistente e produtor de patulina, no suco indicam que esta micotoxina poderia ser produzida durante o armazenamento.

Os fungos produtores de patulina se desenvolvem nas partes danificadas das frutas. A seleção das maçãs usadas para a produção de suco seria uma prática positiva no sentido de diminuir os níveis desta micotoxina no suco. Por outro lado, as frutas que são destinadas para o processamento industrial são aquelas que não atingem o padrão exigido para o consumo *in natura*. Então, o processamento caracteriza-se como uma forma de aproveitar estas frutas que seriam descartadas.

A melhor alternativa para a produção de suco de maçã com níveis de patulina inferiores ao limite máximo de 50 µg/L recomendado pelo *Codex Alimentarius* é

prevenir os danos que ocorrem na superfície das maçãs e desta forma a colonização de fungos, que por sua vez podem produzir micotoxinas. Boas práticas durante a colheita e transporte desta fruta são importantes no que diz respeito à prevenção da infecção fúngica, bem como o armazenamento sob condições adequadas. Estudos sobre patulina são importantes para que se estabeleça limites desta micotoxina em alimentos comercializados no Brasil, a exemplo de vários países que já os possuem.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L.; BRAGULAT M.R, CASTELLÁ G.; ACCENSI, F.; CABAÑES, F.J. Hongos productores de micotoxinas emergentes. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v.17, n.1, p.63-68, 2001.
- ABDEL-SATER, M.A.; ZOHRI, A.A.; ISMAIL, M.A. Natural contamination of some Egyptian fruit juices and beverages by mycoflora and mycotoxins. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.4, p.407-411, 2001.
- ACAR, J.; GOKMEN, V.; TAYDAS, E.E. The effect of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.207, p.328-331, 1998.
- AKTAS, A.H.; YILMAZER, M., DEMIRCI, A. Determination of patulin in apple juice produced in Isparta, Turkey by HPLC with diode array detection. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.12, n.3, p.228-231, 2004.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemist International. **Official Methods of Analysis**. Methods 974.18 e 995.10. 17.ed. Gaithersburg: MD, 2000. 1115 p.
- ARAFAT, W.; MUSA, M.N. Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.87, n.2, p.177-186, 1995.
- AYTAÇ, S.A.; ACAR, J. Einfluss von L-Ascorbinsäure und Schwefelioxid auf die Stabilität von Patulin in Apfelsäften und Pufferlösungem. **Ernährung**, Berlin, v.1, p. 15-17, 1994.
- BARTOLOMÉ, B.; BENGOCHEA, M.L.; PEREZ-ILZARBE, F.J.; HERNANDEZ, T.; ESTRELLA, I.; GOMEZ-CORDOVES, C. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.664, n.1, p.39-43, 1994.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.16, n.3, p.497-516, 2003.

BERETTA, B.; GAIASCHI, A.; GALLI, C.L.; RESTANI P. Patulin in apple-based Foods: occurrence and safety evaluation. **Food Additives and Contaminants**, London, v.17, n.5, p.399-406, 2000.

BISSESSUR, J.; PERMAUL, K.; ODHAV, B. Reduction of patulin during apple juice clarification. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.8, p.1216-1219, 2001.

BLESA, J.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Concentration of ochratoxin a in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, n.1054, v.1-2, p.397-401, 2004.

BONDY, G.S.; PETSTKA, J.J. Immunomodulation by fungal toxins. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, Washington, v.3, n.2, p.109-143, 2000.

BOONZAAIJER, G.; BOBELDIJK, I.; VAN OSENBRUGGEN, W.A. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. **Food Control**, Guildford, v.16, n.7, p.587-591, 2005.

BRACKMANN, A.; MAZARO, S.M.; LUNARDI, R. Armazenamento da maçã cv. Golden Delicious em atmosfera controlada com altas concentrações de CO₂ e ultra-baixas de O₂. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.2, p.215-219, 1998.

BRACKETT, R.E MARTH, E.H. Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.11, p.864-866, 1979.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n.º 1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova os regulamentos técnicos para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpas e sucos de frutas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p.54-58.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Agricultura Brasileira em números – Anuário de 2005. Brasília, DF, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n.º 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e

bioanalíticos. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.phd>>. Acesso em: 20 set. 2007.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.686, p.3-10, 1996.

BROOM, W.A.; BULBRING, E.; CHAPMAN, C.J.; HAMPTON, J.W.F.; THOMSON, A.F.; UNGAR, J., WIEN, R.; WOOLFE, G. The pharmacology of patulin. **The British Journal of Experimental Pathology**, Leicester, v.25, p.195-207, 1944.

BULLERMAN, L.B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.42, p.65-86, 1979.

BURDA, K. Incidence of patulin in apple, pear and mixed fruit products marketed in New South Wales. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.10, p.796-798, 1992.

CHERAGHELI, A.M.; MOHAMMADI, H.R.; AMIRAHMADI, M.; YAZDANPANA, H., ABOUHOSSAIN G.; ZAMANIAN F.; KHANSARI, G.; AFSHAR, M. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. **Food Control**, Guildford, v.16, n.2, p.165-167, 2005.

CHULZE, S.N.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.111, p.S5-S9, 2006.

CIEGLER, A. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.31, n.5, p.664-667, 1976.

CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. **Position paper on patulin**. 30th Session of Codex Committee of Food Additives and Contaminants, p.1-4. Joint FAO/WHO Food Standards Programme (Food and Agricultural Organization Rome), Codex Alimentarius Commission, 1998.

CODEX COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING. **Review of the analytical terminology for Codex use in the procedural manual**. Budapest: WHO/FAO, 2005.

CZELUSNIAK, C.; OLIVEIRA, M.C.S.; NOGUEIRA, A., SILVA, N.C.C.; WOSIACKI, G. Qualidade de Maçãs Comerciais Produzidas no Brasil: Aspectos Físico-Químicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.6, n.1, p.25-31, 2003.

DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. Mycotoxins. In: BEUCHAT, L.R (Ed.). **Food and beverage mycology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987. Cap.6, p.517-570.

DE KOE, W.; SAMSON, R.A.; VAN EGMOND, H.P.; GILBERT, J.; SABINO, M. **Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium**. Amsterdam: Ponsen & Looyen, 2001.

DELGADO, T.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.815, n.1, p.93-97, 1998.

DICKENS, F.; JONES, H.E.E. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v.15, p.85, 1961.

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; BLACKBURN, J.A. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.98, p.241-248, 2005.

DOTTORI, H. A. **Curso de Astronomia**. Porto Alegre, 1998. Disponível em: <<http://www.if.ufrgs.br/tiodottori>>. Acesso em: 25 ago. 2007.

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

DRUSCH, S.; KOPKA, S.; KAEDING, J. Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, London, v.100, n.1, p.192-197, 2007.

DURAKOVIC, S.; RADIC, B.; GOLEM, F.V.; DURAKOVIC, Z.; BERITIC, T., LALIC LI., M. The determination of patulin in apple juice. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v.44, n.3, p.263-268, 1993.

EISELE, T.A.; GIBSON, M.Z. Syringe-cartridge solid-phase extraction method for patulin in apple juice. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.86, n.6, p.1160-1163, 2003.

ESCOULA, L.; THOMSEN, M.; BOURDIOL, D.; PIPY, B.; PEURIERE, S.; ROUBINET, F. Patulin immunotoxicology: Effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v.10, n.8, p.983-989, 1988.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistical Databases**. Rome, 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products**. Washington, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/patubck2.html>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

FDA. International Conference On Harmonization. **Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Validation of analytical procedures: methodology**. Rockville: ICH, 1995. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 19 out. 2007.

FERNANDEZ, T.E.O.; ARIAS-VERDES J.A.; SERSA-ESPINOSA, R. Presence of patulin in fruit purees and juices. **Alimentaria**, Madrid, v.321, p.133-135, 2001.

FLIEGE, R.; METZLER, M. The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and α -amino groups. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v.123, n.2, p.85-103, 1999.

FLIEGE, R.; METZLER, M. Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v.13, n.5, p.373-381, 2000.

FONCESA, H. **Micotoxinas on line**. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em: 27 dez. 2007.

FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T.O.; SAMSON, R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, Amsterdam, v.49, p.201-241, 2004.

GARFIELD, F.M.; KLESTA, E.; HIRSCH, J. **Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories**. Gaithersburg (MD): AOAC International, 2000.

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

GÖKMEN, V.; ACAR, J. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.730, n.1-2, p.53-58, 1996.

GÖKMEN, V.; ACAR, J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.815, n.1, p.99-102, 1998.

GÖKMEN, V.; ACAR, J. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.847, n.1-2, p.69-74, 1999.

GÖKMEN, V.; ACAR, J. Long-term survey of patulin in apple juices concentrates produced in Turkey. **Food Additives and Contaminants**, London, v.17, n.11, p.933-936, 2000.

GÖKMEN, V.; ARTÝK, N.; ACAR, J.; KAHRAMAN, N.; POYRAZOGÇLU, E. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.213, n.3, p.194-199, 2001.

GÖKMEN, V.; ACAR, J.; SARIOĞLU, K. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.543, n.1-2, p.64-69, 2005.

HASAN, H.A. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.16, n.7, p.607-612, 2000.

HARRISON, M.A. Presence and stability of patulin in apple products: a review. **Journal of Food Safety**, Westport, v.9, n.3, p.147-153, 1989.

HARWIG, J.; CHEN, Y.K.; KENNEDY, B.P.C.; SCOTT, P.M. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. **Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology**, v.6, n.1, p.22-25, 1973.

HEFNAWY, M.A.; & ABOU-ZEID, A.M. Differential adaptation of membranes of two osmotolerant fungi, *Aspergillus chevalieri* and *Penicillium expansum* to high sucrose concentrations. **Acta Microbiologica Polonica**, Warszawa, v.52, n.1, p.53-64, 2003.

HIROS, M.; IMAIDA, K.; IT, N.; KURAT, Y.; OGIS, T. Quantitative analysis of initiating and promoting activities of five mycotoxins in liver carcinogenesis in rats. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.16, p.137-143, 1982.

HUEBNER, H.J.; MAYURA, K.; PALLARONI, L.; AKE, C.L.; LEMKE, S.L.; HERRERA, P.; PHILLIPS, T.D. Development and characterization of a carbon-based composite material for reducing patulin levels in apple juice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.1, p.106-110, 2000.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v.167, n. 2, p.101-134, 2001.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans**, Lyon, v.40, p.83-98, 1986.

IBGE (Brasil). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 dez. 2007.

IBRAF (Brasil). **Comparativo das Exportações Brasileiras de Frutas Frescas**. Fraiburgo: IBRAF, 2007. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>> Acesso em: 20 nov. 2007.

IHA, M.H.; SABINO, M. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.89, n.1, p.139-143, 2006.

IHA, M.H.; SABINO, M. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. **Food Control**, Guildford, v.19, n.4, p.417-422, 2008.

INMETRO (Brasil). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Brasília, 2003. Disponível em:<<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2007.

ITO, R.; YAMAZAKI, H.; INOUE, K.; YOSHIMURA, Y.; KAWAGUCHI, M.; NAKAZAW, H. Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination in Japan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, n.25, p.7464-7468, 2004.

JELINEK, C.F.; PHOLAND, A.E.; WOOD, E.E. Worldwide occurrence of mycotoxins on foods and feeds-an update. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.72, n.2, p.223-230, 1989.

KADAKAL, C.; NAS, S. Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid and some other properties of apple juice. **Nahrung – Food**, Berlin, v.46, n.1, p.31-33, 2002.

KARABULUT, O.A.; BAYKAL, N. Evaluation of the use of microwave power for the control of postharvest diseases of peaches. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.26, n.2, p.237-240, 2002.

KARABULUT, O.A.; COHEN, L.; WIESS, B.; DAUS, A.; LURIE, S.; & DROBY, S. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.24, n.2, p.103-111, 2002.

KARLOVSKY, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. **Natural Toxins**, New York, v.7, n.1, p.1-23, 1999.

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.

KING, J.A.D.; MICHENER, H.D.; ITO, K.A. Control of *Byssosclamyces* and related heat-resistant fungi in grape products. **Applied Microbiology**, Washington, v.18, p.166-173, 1969.

LAI, C.; FUH, Y.; SHIH, D.Y. Detection of mycotoxin patulin. in apple juice. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taiwan,. v.8, n.2, p.85-96, 2000.

LAI DOU, I.A.; THANASSOULOPOULOS, C.C.; LIAKOPOULOU-KYARIKIDES, M. Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four postharvest pathogens. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, n.7-8, p.457-461, 2001.

LANCASTER, M.; GOODALL, D.M.; BERGSTROM, E.T.; MCCROSSEN, S.; MYERS, P. Quantitative measurements on wetted thin layer chromatography plates using a charge coupled device camera. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1090, n.1-2, p.165-171, 2005.

LANCASTER, M.; GOODALL, D.M.; BERGSTROM, E.T.; MCCROSSEN, S.; MYERS, P. Real-time image acquisition for absorbance detection and quantification in thin-layer chromatography. **Analytical Chemistry**, Washington, v.78, n.3, p.905-911, 2006.

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

LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G. S.; STOCKENSTRÖM, S.; STAAL, E.; VAN SCHALKWYK, D. J. The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon. **Food Additives and Contaminants**, London, v.18, n.9, p.825-829, 2001.

LI, J.K.; WU, R.N.; HU, Q.H.; WANG, J.H. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. **Food Control**, Guildford, v.18, n.5, p.530-534, 2007.

LIANG, Y.; BAKER, M. E.; YEAGER, B. T.; DENTON, M. B. Quantitative Analysis of Aflatoxins by High-Performance Thin-Layer Chromatography Utilizing a Scientifically Operated Charge-Coupled Device Detector. **Analytical Chemistry**, Washington, v.68, n.22, p.3885-3891, 1996.

LIANG, Y.; SIMON, R. E.; DENTON, M. B. Utilization of a scientifically operated charge-coupled device detector for high-performance thin-layer chromatographic analysis of tetracyclines. **Analyst**, London, v.124, n.11, p.1577-1582, 1999.

LIN, L.; ZHANG, J.; WANG, P.; WANG, Y.; CHEN, J. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.815, n.1, p.3-20, 1998.

LIU, B.H.; LIU, B.H.; YU, F.Y.; WU, T.S.; LI, S.Y.; SU, M.C.; WANG, M.C.; SHIH, S.M. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.191, n.3, p.255-263, 2003.

LIU, B.H.; WU, T.S.; YU, F.Y.; WANG, C.H.. Mycotoxin patulin activates the p38 kinase and JNK signaling pathways in human embryonic kidney cells. **Toxicological Sciences**, Orlando, v.89, n.2, p.423-430, 2006.

LUND, F. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using filter paper method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.20, p.228-231, 1995.

MACDONALD, S.; LONG, M.; GILBERT, J.; FELGUEIRAS, I., BRERA, C.; JØRGENSEN, K.; MACHO, M. L.; MAJERUS, P.; MARTINS, M. L.; MEVISSSEN, L.; MICHELET, J. Y.; NUOTIO, K.; PITTET, A.; SZYMANSKI, L.; TUCKER, N.; VILADRICH, R.; VOOGT, J.; WENNEMAR, A. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.6, p.1387-1394, 2000.

MAHFOUD, R., MARESCA, M.; GARMY, N.; FANTINI, J. The mycotoxin patulina alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effect of glutathione. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.181, n.3, p.209-218, 2002.

MALMAURET, L.; PARENT-MASSIN, D.; HARDY, J.-L.; VERGER, P. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. **Food Additives and Contaminants**, London, v.19, n.6, p.524-532, 2002.

MARTINS, M.L.; GIMENO, A.; MARTINS, H.M.; BERNARDO, F. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. **Food Additives and Contaminants**, London, v.19, n.6, p.568-574, 2002.

MCKENZIE, K.S.; SARR, A.B.; MAYURA, K.; BAILEY, R.H.; MILLER, D.R.; ROGERS, T.D.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A.; PLATTNER, R.D.; KUBENA, L.F.; PHILLIPS, T.D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.35, n.8, p.807-820, 1997.

MELLO, L.M.R. **Produção e Mercado Brasileiro de maçã: comunicado técnico n.50**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2004. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot050.pdf>> Acesso em: 07 dez. 2007.

MOSS, M.; LONG, M.T. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Additives and Contaminants**, London, v.19, n.4, p.387-399, 2002.

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

OKULL, D.O.; LABORDE, L.F. Activity of electrolyzed oxidizing water against *Penicillium expansum* in suspension and on wounded apples. **Journal of Food Science**, Chicago, v.69, n.1, p.FMS23-FMS27, 2004.

OLLIVER, M.; RENDLE, T. A new problem in fruit preservation, studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of the Society Chemical Industry**, Beijing, v.53, p.166-172, 1934.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, Zagreb, v.77, n.9, 1999.

PHILLIPS, T.D. Dietary clay in the Chemoprevention of aflatoxin-induced disease. **Toxicological Sciences**, Orlando, v.52, p.118-126, 1999.

PIANZZOLA, M.J.; MOSCATELLI, M.; VERO, S. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. **Plant Disease**, Saint Paul, v.1, p.23-28, 2004.

PIEMONTESE, L.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI A. Occurrence of patulin in conventional e organic fruit producing in Italy and subsequent exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v.22, n.5, p.437-442, 2005.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593p.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; CUNHA, M. R.; GOMIDES, M. F.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; SOARES, T. V.; BARROSO, R. E. S. Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.59, n.1-2, p.21-25, 2000.

PRIETA, J.; MORENO, M. A.; BLANCO, J. L.; SUÁREZ, G.; DOMINGUEZ, L. Determination of patulin by diphasic dialysis extraction and thin-layer chromatography. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, n.12, p.1001-1002, 1992.

PRIETA, J.; MORENO, M.A.; BAYO, J.; DIAZ, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Determination of patulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with extraction by diphasic dialysis. **Analyst**, London, v.118, n.2, p.171-173, 1993.

RITIENI, A. Patulin in Italian commercial apple products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, n.20, p.6086-6090, 2003.

RODRIGUES-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p.1-11, 2000.

ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R. Influence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.47, p.205-207, 1984.

ROSS, G. **Patulina: parâmetros que influem na produção, detoxicação e considerações sobre microbiota fúngica em maçã (*Malus domestica* Borkhausen)**. Londrina, 1995. 108f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.

RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.47, n.9, p.3749-3755, 1999.

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

RYCHLIK, M.; KIRCHER, F.; SCHUSDZIARRA, V.; LIPPL, F. Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.42, p.729-735, 2004.

SABATER-VILAR, M., MAAS, R.F.M.; BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R., FINK-GREMMELS J. Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. **Mycopathologia**, Den Haag, v.158, p.419-426, 2004.

SANDERSON, P.G.; SPOTTS, R.A. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, n.1, p.103-110, 1995.

SCHUMACHER, D.M.; WAGNER, J.; LEHMANN, L.; METZLER, M. Assessment of the genotoxic and mutagenic potential of patulin in cultured mouse lymphoma cells. **Archives of Pharmacology**, Berlin, v.369, p.R127, 2004.

SCHUMACHER, D.M.; METZLER, M.; LEHMANN, L. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. **Archives of Toxicology**, New York, v.79, n.2, p.110-121, 2005.

SCOTT, P. M. Effects of food processing on mycotoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n.6, p. 489-499, 1984.

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

SELMANOGLU, G.; KOÇKAYA, E.A. Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.42, n.5, p.721-727, 2004.

SELMANOGLU, G. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.44, n.12, p.2019-2024, 2006.

SEWRAM, V.; NAIR, J. J.; NIEUWOUDT, T. W.; LEGGOTT, N. L.; SHEPHARD, G. S. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.897, n.1-2, p.365-374, 2000.

SHEPHARD, G.S.; LEGGOTT, N.L. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. **Journal of Chromatographic A**, Amsterdam, v.882, n.1-2, p.17-22, 2000.

SHEPHARD, G.S.; FABIANI, A.; STOCKENSTROM, S.; MSHICILELI, N., SEWRAM, V. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, n.4, p.1102-1106, 2003.

SHEU, F.; SHYU, Y.T. Analysis of patulin in apple juice by diphasis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.47, n.7, p.2711-2714, 1999.

SHUNDO, L., DE ALMEIDA, A.P., ALABURDA, J., RUVIERI, V., NAVAS, S.A., LAMARDO, L.C.A., SABINO, M. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Campinas, v.37, n.4, p.533-537, 2006.

SIMON, R.E.; WALTON, L.K.; LIANG, Y.; DENTON, M.B. Fluorescence quenching high-performance thin-layer chromatographic analysis utilizing a scientifically operated charge-coupled device detector. **Analyst**, London, v.126, n.4, p.446-450, 2001.

SIMONOVSKA, B.; ANDRENESEK, S.; VOVK, I.; PROSEK, M. High-performance thin-layer chromatography method for monitoring norfloxacin residues on pharmaceutical equipment surfaces. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.862, n.2, p.209-215, 1999.

SPADARO, D.; CIAVORELLA, A.; FRATI, S.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. **Food Control**, Guildford, v.18, n.9, p.1098-1102, 2007.

SPEIJERS, G.J.; FRANKEN, M.A.; VAN LEEUWEN, F.X. Subacute toxicity study of patulin in the rat: Effects on the kidney and the gastro-intestinal tract. **Food Chemistry and Toxicology**, Amsterdam, v.25, p.23-30, 1988.

STEIMAN, R.; EIGLE, M.L.S.; KRIVOBOK, S. Production of patulin by micromycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v.105, p.129-133, 1989.

STINSON, E.E.; OSMAN, S.F.; HUHTANEN, C.N.; BILLS, D.D. Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p.620-622, 1978.

STINSON, E.E.; OSMAN, S.F.; HEISLER, E.G.; SICILIANO, J.; BILLS, D.D. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.28, n.5, p.960-963, 1980.

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

SUMBU, Z.; THONART, P.; BECHET, J. Action of patulin on yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n.1, p.110-115, 1983.

SYDENHAM, E.W.; VISMER, H.F.; MARASAS, W.F.O.; BROWN, N.L.; SCHLECHTER, M.; VAN DER WESTHUIZEN, L. Reduction of patulin in apple juice samples- influence of initial processing. **Food Control**, Guildford, v.6, p.195-200, 1995.

SYDENHAM, E.W.; VISMER, H.F.; MARASAS, W.F.O.; BROWN, N.L.; SCHLECHTER, M.; RHEEDER, J.P. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. **Food Additives and Contaminants**, London, v.14, n.5, p.429-434, 1997.

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

TANGNI, E.K.; THEYS, R.; MINGNOLET, E.; MAUDOUX M.; MICHELET J.Y.; LANRONDELLE Y. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v.20, n.5, p.482-489, 2003.

TANIWAKI, M.H.; BLEINROTH, E.W.; DE MARTIN, Z.J. Bolores produtores de patulina em maçã e suco industrializado. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.19, n.1, p.42-49, 1989.

TANIWAKI, M.H.; HOENDERBOOM, C.J.M.; VITALI, A.; EIROA, U. Migration of patulin in apples. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, n.8, p.902-904, 1992.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. **Fungos em Alimentos, ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL: Núcleo de Microbiologia, 2001.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical report). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v.74, n.5, p.835-855, 2002.

THURVANDER, A.; MÖLLER, T.; BARBIERI, H.E.; JANSSON, A.; SALOMONSSON, A.C.; OLSEN, M. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. **Food additives and Contaminants**, London, v.18, n.8, p.696-706, 2001.

TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

TRUCKSESS, M.W.; TANG, Y. Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.82, n.5, p.1109-1113, 1999.

TSAO, R.; ZHOU, T. Micellar eletrokinetic eletrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.48, n.11, p.5231-5235, 2000.

VENTURINI, M.E.; BLANCO, D.; ORIA, R. In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, n.5, p.834-839, 2002.

VERO, S.; VÁZQUEZ, A.; CERDEIRAS, M. P.; SOUBES, M. A rapid TLC-scanning method for the determination of patulin in apple products. **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, Heidelberg, v.12, n.3, p.172-174, 1999.

VERO, S.; MONDINO, P.; BURGUENO, J.; SOUBES, M.; WISNIEWSKI, M. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.26, n.1, p.91-98, 2002.

VIÑAS, I.; VALLVERDU, N.; MONLLAO, S.; USALL, J.; SANCHIS, V. Imazalil resistant *Penicillium* isolates from Spanish apple packinghouses. **Mycopathologia**, Den Haag, v.123, n.1, p.27-33, 1993.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.127, p.213-222, 1995.

WALKER, E.N. **CCD photometry**. London: Britch Astromical Association, 2004. Disponível em: <[http:// www.britastro.org](http://www.britastro.org)> Acesso em 24 fev. 2007.

WALLIS, B.D.; PROVIN, R.W. **A manual of advanced celestial photography**. Cambridge University Press: CUP, 1994.

WICHMANN, G.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon- γ rather than interleukin-4 production in human blood cells. **Environmental Toxicology**, New York, v.17, n.3, p.211-218, 2002.

WICHMANN, G.; KRUMM, B.; DRÖBLER, K.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I. The effect of gliotoxin and patulin on human T cell function. **Indoor and Built Environment**, Basel, v.12, n.4, p.255-258, 2003.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C.; DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation in Santa Catarina-Brazil. **Fruit Process**, Schönborn, v.12, p.12-28, 2002.

WU, T.S.; YU, F.Y.; SU, C.C.; KAN, J.C.; CHUNG, C.P.; LIU, B.H. Activation of ERK mitogen-activated protein kinase in human cells by the mycotoxin patulin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.207, n.2, p.103-111, 2005.

YURDUN, T.; OMURTAG, G.Z.; ERSOY, Ö. Incidence of patulin in apple juices market in Turkey. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.11, p.1851-1853, 2001.

ZHANG, L.; LIN, X. Quantitative evaluation of thin-layer chromatography with image background estimation based on charge-coupled device imaging. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1109, n.2, p.273-278, 2006.