

## Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos

### Occurrence, toxicological aspects, analytical methods and control of patulin in food

Juliane Elisa Welke<sup>1\*</sup> Michele Hoeltz<sup>1</sup> Horacio Alberto Dottori<sup>II</sup> Isa Beatriz Noll<sup>I</sup>

### - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

#### RESUMO

A patulina é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys*. Em experimentos com animais, ela 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. Essa 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 dessa micotoxina em alimentos no Brasil. Esta revisão bibliográfica tem como objetivos descrever as principais características da patulina, a ocorrência, os aspectos toxicológicos e os 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 *Byssoschlamys* 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 apple 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 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 e, dentre 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.

<sup>I</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: juliwelke@yahoo.com.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Instituto de Física, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

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 os 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, dentre 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 esse produto a países que possuem limites estabelecidos por legislação para essa 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. Além disso, 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, os aspectos toxicológicos, métodos analíticos e as 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). Ela forma cristais incolores, tem ponto de fusão de  $111^{\circ}\text{C}$ , 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

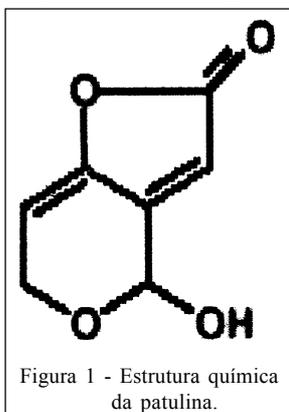


Figura 1 - Estrutura química da patulina.

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 sulfidríla, 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). Esse 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  $5^{\circ}\text{C}$  (NORTHOLT & BULLERMAN, 1982).

O gênero *Byssoschlamys* possui duas espécies economicamente importantes, *B. nivea* e *B. fulva*, sendo que ambas causam deterioração de frutas e produtos processados a partir delas. Esse 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 dessa 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 realizadas acerca da ocorrência de patulina em suco de maçã, em diversos países (Tabela 1). Em todos os países onde foram realizados estudos foram encontradas amostras contaminadas com essa micotoxina. No entanto, os dados ainda são insuficientes para uma conclusão a respeito da incidência de patulina nestes países.

Tabela 1 - Ocorrência de patulina em suco de maçã em alguns países.

País	n*	Amostras positivas (%)	Intervalo patulina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Brasil	30	1 (3)	< 17	SYLOS & RODRIGUEZ-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.

#### 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 dessa 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 que incluem 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 por meio 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. Isso também afeta a transcrição e a tradução, tendo um efeito direto no DNA (RILEY & SHOWKER, 1991). Essa 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 dessa 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 aos 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 casos de distúrbios gastrointestinais, náuseas 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 esses animais é variável de 15 a 35mg kg<sup>-1</sup>, dependendo do modo de administração (CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS, 1998).

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

Células humanas têm sido usadas para avaliar a toxicidade dessa micotoxina, e os 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 a partir da observação de que essa micotoxina reage com o antioxidante celular glutatona (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 à patulina. 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 µg kg<sup>-1</sup> 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 dessa micotoxina (EISELE & GIBSON, 2003; ITO et al., 2004; GÖKMEN et al., 2005). O problema da utilização desses 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

Tabela 2 - Métodos de análise de patulina em suco de maçã empregando extração líquido-líquido ou extração em fase sólida.

Extração	Limpeza	Técnica	LD (µg L <sup>-1</sup> )	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 PLS-2, Aquis PLS-3	-	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 <sub>18</sub>	CLAE-UV	3	91-96	GÖKMEN et al. (2005)
Enzimas	EFS-C <sub>18</sub> , Romer	CLAE-UV	25*	87	BOONZAAIJER et al. (2005)
Acetato de etila	-	CLAE-DAD	3	81,1 – 91,7	IHA & SABINO (2006)
EFS: C <sub>18</sub> 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	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.

exigir equipamentos sofisticados. A detecção e quantificação de patulina nas placas de sílica-gel são feitas pela formação de derivados fluorescentes, por meio do borrifamento de 3-metilbenzotiazolinona hidrazona (MBTH), em que se obtém um limite de detecção (LD) de  $20\mu\text{g L}^{-1}$  (AOAC, 2000), ou por meio 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). Nessa 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  $12\text{ng L}^{-1}$ , 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. Com o uso da cromatografia capilar micelar eletrocínica com detector de fotodiodo a 273nm, TSAO & ZHOU (2000) 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 essa 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-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). GÖKMEN & ACAR (1999), com a utilização de fase móvel de água/acetoneitrila (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 a patulina foram 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 patulina. O hipoclorito de sódio, ao ser usado na lavagem de frutas, não permite a colonização de fungos e a 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, esse 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 ( $500\text{mg kg}^{-1}$ ) 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 necessária a presença de oxigênio e radicais livres. A oxidação do ácido ascórbico na presença de oxigênio e íons metálicos é possível fonte desses 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 esse 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. (2009) estudaram a redução dos níveis de patulina nas fases do processamento do suco de maçã. Os autores concluíram que, após a pasteurização, o tratamento enzimático, a microfiltração e a 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 esse 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 dessa micotoxina por meio 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 dessa 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 dessa 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 essas 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 o transporte dessa 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**. 17.ed. Gaithersburg (MD), 2000. 1170p.
- 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 Schwefeloxid auf die Stabilität von patulin in Apfelsäften und Pufferlösungem. **Ernährung**, v.1, p.15-17, 1994.
- BECCI, 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. **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. 8p.
- 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  $\alpha$ -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, 1997. p.7-28.
- 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. 16p.
- 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/condicaoodevida/pof\\_2002/efault.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof_2002/efault.shtm).
- IBRAF-Instituto Brasileiro de Frutas. **Comparativo das Exportações Brasileiras de Frutas Frescas 2004-2005**. Capturado em: 12 dez. 2007. On line. Disponível na Internet: [http://www.ibraf.org.br/x-es/pdf/CEBFF\\_2004\\_2005.pdf](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.
- MELO, L.M.R. **Produção e Mercado Brasileiro de maçã: comunicado técnico n.50-EMBRAPA-2004**. Capturado em: 12 dez. 2007. On line. Disponível na Internet: <http://www.cnpv.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, 2006. p.13-14.
- THURVANDER, 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**, v.20, p.48-52, 2009.
- 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.