



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos
Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

MARCOS GIOVANI CELLI

**DEGRADAÇÃO DE PATULINA POR COMPOSTO BIOATIVO OBTIDO DE
LEVEDURA**

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2010**

Celli, Marcos Giovanni Celli

Degradação de patulina por composto bioativo obtido de levedura /
Marcos Giovanni Celli - São José do Rio Preto: [s.n.], 2010.

104 f. : 17. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz

Co-orientador: Maurício Boscolo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Biodegradação. 3. Composto bioativo.
4. Patulina. 5. Levedos. 6. Detoxificação. 6. *Saccharomyces cerevisiae*.
I. Garcia Cruz, Crispin Humberto. II. Celli, Marcos Giovanni. III.
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas. IV. Título

CDU - 664

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

ATESTAMOS que **MARCOS GIOVANI CELLI**, RG 7.312.156-6 SSP-PR, defendeu, no dia 02/02/2010, a tese intitulada "Degradação de patulina por compostos bioativos obtidos de levedura visando aplicação em produtos derivados de maçã", junto ao Programa de Pós-graduação em ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, tendo sido "APROVADO".

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

São José do Rio Preto, 2.de fevereiro de 2010.



HELEN REGINA BOZELLO
Diretor Técnico Acadêmico

MARCOS GIOVANI CELLI

DEGRADAÇÃO DE PATULINA POR COMPOSTO BIOATIVO OBTIDO DE LEVEDURA

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Ciência de Alimentos junto ao Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
Livre Docente
Universidade Estadual Paulista
Orientador

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Professor Doutor
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof^a. Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono
Professora Doutora
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
Professor Doutor
Universidade Estadual Paulista

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
Livre Docente
Universidade Estadual Paulista

São José do Rio Preto, 02 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pelas oportunidades oferecidas;

Ao meu orientador Professor Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz, pela incansável orientação, dedicação, incentivo, paciência e amizade, sem os quais este trabalho não seria possível;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Mauricio Boscolo, pela orientação, atenção e apoio no desenvolvimento deste trabalho, e utilização do HPLC no laboratório do Departamento de Química e Ciências Ambientais;

Aos membros titulares Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, Dra. Eleni Gomes e suplentes da banca examinadora, pelas valiosas sugestões, que contribuíram para o aprimoramento desta Tese;

À Universidade Estadual Paulista, e aos professores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do Curso de Doutorado, onde pude contar com a colaboração de todos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela Bolsa de Doutorado;

Ao Dr. Alexandre Rodrigo Coelho pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho e, sobretudo pela amizade, eternamente grato;

Aos Professores Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e Dra. Eleni Gomes pela colaboração, apoio no desenvolvimento deste trabalho e utilização do laboratório para análises de eletroforese;

À Dra. Patrícia Peres Polizelli e às Doutorandas Rejane Yuriko Ouchi e Natália Martin pelo auxílio nas análises de eletroforese;

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela colaboração, apoio no desenvolvimento deste trabalho e utilização do laboratório no Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, UEL;

À técnica Tânia Maria Vinturim Gonçalves do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos por sempre me ajudar quando precisava;

Às amigas do Curso de Pós-Graduação Adriana, Aline, Catharina, Crislene, Daniele, Fernanda, Gisele, Juliana, Luana, Michelle e Vidiany pela alegria, companheirismo e amizade;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho;

Às amigas Carmen Ligia, Caroline Calliari e aos irmãos Angela e Rodrigo pelo apoio constante nos momentos mais difíceis, muito obrigado;

Aos meus pais Norberto e Mary Dalva, por todo o carinho, exemplo, amor e esforços realizados para a minha formação profissional.

RESUMO

A patulina, toxina com potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico produzida por *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Byssoclamys* spp., pode ser encontrada em maçãs, sucos comerciais e outros produtos não fermentados constituindo-se num problema neste setor agroindustrial. Em bebidas fermentadas, porém, não é detectável mesmo que a matéria-prima esteja visivelmente contaminada. O presente trabalho visou quantificar a patulina tanto no tecido deteriorado de maçãs *in natura* quanto na parte sadia ao redor da lesão, monitorar a degradação no processo fermentativo típico utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e degradar a toxina presente em produtos derivados de maçã pela ação do composto bioativo produzido pela levedura. A micotoxina foi quantificada por CLAE em sistema isocrático de fase reversa e detector UV a 275 nm. O grau de recuperação alcançado foi de 86,24% e os limites de detecção e de quantificação foram 4,3 µg/L e 8,6 µg/L, respectivamente. Foram analisados 35 frutos de maçã *in natura* cultivar Fuji, tendo sido constatada a presença de patulina em 32 amostras, em concentrações que variaram de 1,01 a 120,4 mg/Kg de tecido na porção deteriorada e de 0,02 a 5,02 mg/Kg de tecido, na sadia. Para avaliação da cinética de degradação de patulina, suco de maçã contendo 5,0 µg de patulina/mL foi inoculado com 0,25g de células de levedura seca ativa/L, sendo observada uma maior redução no teor de toxina de 81,6% nas primeiras 48 horas de fermentação. Este tempo foi utilizado como parâmetro para obtenção do extrato bruto contendo o composto bioativo capaz de degradar a toxina. Na cinética de degradação de patulina pelo extrato bruto estéril inoculado com 3,0 µg de patulina/mL, foi obtida a maior taxa de degradação (50%) da toxina nas primeiras 48 horas, seguido de uma degradação mais lenta de apenas 5,7% nas 48 horas restantes de análise. Na cinética de degradação de patulina pelo extrato dialisado inoculado com 3,0 µg de patulina/mL, foi obtida total eliminação da toxina em 24 horas, sendo que no controle a concentração de toxina permaneceu em 98,3% neste mesmo tempo. A diálise empregando membrana dialisadora com limite de exclusão de 8000-10000 Da reteve o composto bioativo. Na cinética de degradação de patulina pelo extrato ultrafiltrado inoculado com 3,0 µg de patulina/mL, foi obtida redução de 51% em 16 horas de análise, 74% em 24 horas e níveis não detectáveis em 32 horas. No controle a concentração de toxina permaneceu em 96,6% neste mesmo tempo. A ultrafiltração empregando membrana de celulose regenerada com limite de exclusão de 10000 Da reteve o composto bioativo. Para caracterização bioquímica do composto bioativo, foi estimada sua massa molecular por meio de ensaios de eletroforese

após sua separação por eletroforese não desnaturante, ponto isoelétrico por eletroforese 2D, presença de carboidratos, estabilidade térmica e pH e temperatura de máxima atividade. A massa molecular estimada para este composto foi de 22,07 kDa e ponto isoelétrico inferior a 3. Apresentou baixa estabilidade térmica, perdendo sua atividade após tratamento a 80°C por 20 minutos, que pode ser devido a ausência de glicosilações, as quais não foram detectáveis pela metodologia utilizada (Método fenol sulfúrico). O pH e temperatura de máxima atividade degradadora encontrados estavam entre 4 - 5 e 30 - 35°C, respectivamente. O composto bioativo demonstrou eficiente degradação de patulina podendo ser utilizado na degradação da toxina pela adição deste em produtos derivados de maçã, antes ou após sua pasteurização.

Palavras-chave: patulina, maçã, fermentado, *Saccharomyces cerevisiae*, detoxificação.

ABSTRACT

Patulin, a toxin with potential carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects produced by *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. and *Byssoclamys* sp., can be found in apples, juices and other commercial non-fermented products making up a problem in the agribusiness sector. However, patulin is not detectable in fermented beverages even if the raw material is visibly contaminated. This paper aimed to quantify patulin in both the tissue deteriorated fresh apples and at the sound around the lesion, to monitor the degradation in typical fermentation process using *Saccharomyces cerevisiae* and degrade the toxin present in products derived from apple by the action of the bioactive compound produced by yeast. The mycotoxin was quantified by HPLC in isocratic system of reversed phase and UV detection at 275 nm. The degree of recovery achieved was 86.24% and the limits of detection and quantification were 4.3 µg/L and 8.6 µg/L, respectively. Thirty five fresh apple fruits Fuji were analyzed and it was, found the presence of patulin in 32 samples in concentrations that ranged from 1.01 to 120,4 mg/Kg of tissue in the damaged portion and 0.02 to 5, 02 mg/Kg of tissue in sound. To evaluate the kinetics of degradation of patulina, apple juice with 5.0 µg patulin/mL was inoculated with 0.25 g of cells active dry yeast/L, being observed a greater reduction in the toxin content of 81.6% in the first 48 hours of fermentation. This time was used as a parameter to obtain the crude extracts containing bioactive compound capable of degrading the toxin. The kinetics of patulin degradation by the crude extract inoculated with 3.0 µg patulin/mL showed the highest rate of the toxin degradation (50%) in the first 48 hours, followed by only 5.7% degradation after the remaining 48 hours of analysis. The kinetics of degradation of patulin by the extract dialysate inoculated with 3.0 µg patulin/mL showed total elimination of the toxin after 24 hours. Dialysis using a dialyzing membrane with a cutoff of 8000-10000 Da retained the bioactive compound. The kinetics of degradation of patulin by the extract ultrafiltered inoculated with 3.0 µg patulin/mL, showed a reduction of 51% in 16 hours of analysis, 74% at 24 hours and undetectable levels in 32 hours. In the control treatment the concentration of toxin remained at 96.6% in the same time. The ultrafiltration using regenerated cellulose membrane with a cutoff of 10000 Da retained the bioactive compound. For biochemical characterization of the bioactive compound it was estimated by its molecular tests electrophoresis after their separation by non-denaturing electrophoresis, isoelectric point in 2D electrophoresis, the presence of carbohydrates, thermal stability, pH and temperature of maximum activity. The molecular weight estimated for this compound was 22.07 kDa and

possessed an isoelectric point less than 3. Bioactive compound showed low thermal stability, losing its activity after treatment at 80°C for 20 minutes, which may be due to lack of glycosilations, which were not detectable by the method (phenol-sulfuric acid method). The pH and temperature of maximum degrading activity were found between 4 - 5 and 30 - 35°C, respectively. The bioactive compound showed efficient degradation of patulin, indicating the it can be used in the degradation of the toxin by the addition of products derived from apple, before or after the pasteurization.

Keywords: patulin, apples, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, detoxification.

LISTA DE SIGLAS

ABMP - Associação Brasileira dos Produtores de Maçã

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

CCD - Cromatografia de Camada Delgada

CG - Cromatografia Gasosa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EM - Espectrometria de Massa

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FDA - *Food and Drug Administration*

FSA - *Food Standards Agency*

IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAFF - *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MECC - Cromatografia Eletrocínética Capilar Micelar

NMWL - *Nominal Molecular Weight Limit*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAGE – *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

pI - Ponto Isoelétrico

Rf - *Retention Factor* (fator de retenção)

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

UV - Ultravioleta

YES - *Yeast Extract Saccharose*

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Países que possuem legislação para patulina e o limite máximo permitido	22
Tabela 02.	Ocorrência de patulina em sucos de maçã e derivados em alguns países	42
Tabela 03.	Taxa de recuperação de patulina adicionada em suco de maçã	68
Tabela 04.	Concentração de patulina em podridões e áreas não afetadas de maçãs	70
Tabela 05.	Determinação da cinética de degradação de patulina em suco de maçã inoculado com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
Tabela 06.	Determinação da cinética de degradação de patulina no extrato bruto estéril	75
Tabela 07.	Determinação da cinética de degradação de patulina no extrato dialisado estéril quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV	77
Tabela 08.	Determinação da cinética de degradação de patulina no extrato ultrafiltrado estéril quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV	79
Tabela 09.	Determinação da cinética de degradação de patulina nos extratos bruto, dialisado e ultrafiltrado estéreis quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV	81
Tabela 10.	Atividade degradadora de patulina pelos compostos protéicos separados por eletroforese quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV	83
Tabela 11.	Determinação do pH de máxima atividade do composto bioativo presente no ultrafiltrado estéril em 24hs, quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV	86
Tabela 12.	Determinação da temperatura de máxima atividade do composto bioativo presente no ultrafiltrado estéril em 16hs, quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Estrutura molecular da patulina	23
Figura 02 –	Metabolismo secundário e formação da patulina	24
Figura 03 –	Via de formação da patulina Produtos da degradação da patulina.	25
Figura 04 –	Produtos da degradação da patulina	47
Figura 05A –	Curva de calibração de patulina	67
Figura 05B –	Cromatograma de uma amostra	67
Figura 06 –	Curvas de tendências de patulina nas maçãs deterioradas	71
Figura 07 –	Cinética de degradação de patulina por <i>S. cerevisiae</i>	73
Figura 08 –	Cinética de degradação de patulina no extrato bruto estéril	76
Figura 09 –	Cinética de degradação de patulina no extrato dialisado estéril	78
Figura 10 –	Cinética de degradação de patulina no extrato ultrafiltrado estéril	80
Figura 11 –	Cinética de degradação de patulina nos extratos bruto, dialisado e ultrafiltrado estéreis	81
Figura 12 –	Bandas protéicas visualizadas em gel de poliacrilamida	82
Figura 13 –	Atividade degradadora de patulina dos compostos protéicos separados por eletroforese	83
Figura 14 –	Eletroforese SDS-PAGE para avaliação do composto bioativo e determinação de sua massa molecular.	84
Figura 15 –	Curva padrão obtida pela plotagem do log da massa molecular dos padrões versus Rf da migração relativa de cada padrão	85
Figura 16 –	Degradação de patulina pelo composto bioativo presente no extrato ultrafiltrado estéril em pHs 2, 3, 4, 5 e 6	87
Figura 17 –	Degradação de patulina pelo composto bioativo presente no extrato ultrafiltrado estéril à diferentes temperaturas.	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	PRODUÇÃO DE FRUTAS NO PAÍS	17
2.1.1	Maçã	17
2.1.1.1	Colheita e armazenagem	18
2.1.1.2	Produção de maçãs no Brasil e no Mundo	19
2.1.2	Suco de maçã	19
2.1.2.1	Produção e consumo de suco de maçã	20
2.1.2.2	Qualidade e legislação de suco de maçã	21
2.1.3	Propriedades estruturais e funcionais de patulina	22
2.1.3.1	Principais microrganismos produtores de patulina	27
2.1.3.2	Controle de fungos	32
2.1.3.3	Incidência de patulina em alimentos	34
2.1.3.4	Estratégias para redução da contaminação	42
2.1.3.5	Degradação de patulina	46
2.1.3.6	Detecção e Quantificação de Patulina	50
3	OBJETIVO	54
3.1	OBJETIVO GERAL	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	MICRORGANISMOS	55
4.2	PATULINA PADRÃO E REAGENTES QUÍMICOS	55
4.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO	55
4.4	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA	56
4.5	PRODUÇÃO DE PATULINA	56
4.6	EXTRAÇÃO DE PATULINA DOS FRUTOS CONTAMINADOS	57
4.7	EXTRAÇÃO DE PATULINA DE SUCOS FERMENTADOS	57
4.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PATULINA	58
4.9	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA	58
4.10	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO CONTENDO O COMPOSTO BIOATIVO	59
4.11	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO EXTRATO BRUTO	60
4.12	OBTENÇÃO DO EXTRATO DIALISADO CONTENDO O COMPOSTO BIOATIVO	60
4.13	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO DIALISADO	61
4.14	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTO BIOATIVO POR ULTRAFILTRAÇÃO	61
4.15	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO ULTRAFILTRADO	62
4.16	ELETROFORESE DO EXTRATO ULTRAFILTRADO EM CONDIÇÕES DESNATURANTES E NÃO DESNATURANTES	62
4.16.1	Rastreamento e isolamento por eletroforese do composto bioativo	63
4.16.2	Determinação do R _f (fator de retenção) em condições desnaturantes	63
4.17	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO COMPOSTO BIOATIVO	64
4.17.1	Eletroforese em SDS-page para avaliação da pureza do composto bioativo e determinação da massa molecular	64

4.17.2	Focalização isoeétrica e determinação do ponto isoeétrico (eletroforese 2D) do composto bioativo	64
4.17.3	pH de máxima atividade do composto bioativo	65
4.17.4	Temperatura de máxima atividade degradadora do composto bioativo	65
4.17.5	Estabilidade térmica do composto bioativo a 80°C	66
4.17.6	Determinação de carboidratos	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA PATULINA	67
5.2	PRODUÇÃO DE PATULINA	68
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE PATULINA EM MAÇÃS CONTAMINADAS	69
5.4	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA PELO PROCESSO FERMENTATIVO	72
5.5	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO BRUTO ESTÉRIL	74
5.6	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO DIALISADO ESTÉRIL	76
5.7	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO ULTRAFILTRADO ESTÉRIL	79
5.8	RASTREAMENTO DO COMPOSTO BIOATIVO POR ELETROFORESE	82
5.9	AVALIAÇÃO DA PUREZA DO COMPOSTO BIOATIVO E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	84
5.10	FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA E DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DO COMPOSTO BIOATIVO	85
5.11	pH DE MÁXIMA ATIVIDADE DO COMPOSTO BIOATIVO	85
5.12	TEMPERATURA DE MÁXIMA ATIVIDADE DEGRADADORA DO COMPOSTO BIOATIVO	87
5.13	PRESENÇA DE CARBOIDRATOS	89
5.14	ESTABILIDADE TÉRMICA DO COMPOSTO BIOATIVO A 80°C	89
6	CONCLUSÕES	90
7	REFERÊNCIAS	92

1. INTRODUÇÃO

A produção de fruta brasileira superou os 43,7 milhões de toneladas em 2007, classificando o país entre os quatro maiores produtores mundiais juntamente com a China, Índia e EUA. Do total produzido, 45% destinou-se ao consumo *in natura* e 53% à indústria processadora. A maçã (*Malus domestica* L.) foi a segunda fruta mais exportada no ano de 2007 e o seu consumo em forma *in natura* ou processada é amplamente difundido, obtendo-se os mais variados produtos derivados, seja suco, polpa, purê, produtos fermentados, desidratados, conservas e doces, com grande aceitabilidade pelos consumidores.

Em países com tradição no processamento de maçãs, as fábricas são supridas com frutas de variedades industriais, usualmente rústicas e sem muita necessidade de manejo, colhidas e transportadas para as unidades de processamento onde o processo de seleção é menos rigoroso do que aquele utilizado no caso de frutas de mesa. Nos países que começam a processar maçãs, como o caso do Brasil, a matéria-prima disponível é a desqualificada para uso *in natura*, por defeitos diversos, como picadas de pássaros, injúrias mecânicas, cicatrizes na epiderme, má formação do fruto e distribuição desuniforme da coloração.

Não obstante, a matéria-prima deve estar livre de deterioração por fungos filamentosos, responsáveis por perdas substanciais na indústria de processamento. Na categoria, *Penicillium* spp. representa o principal agente deteriorante, com destaque a *P. expansum*, que além de colonizar o fruto e causar dano à polpa, produz a patulina, micotoxina de caráter teratogênico e cancerígeno em embriões de galinha e camundongos.

Embora não exista nenhum dado toxicológico ou epidemiológico em seres humanos, a patulina vem sendo empregada como indicador de qualidade nos frutos e produtos de maçã. Em 2001 o *Food and Drug Administration-FDA* publicou um documento, “*The Draft Guidance Document of FDA Components and Industry on Apple Juice and Apple Juice Products*”, que estabelece o limite de 50 µg/L para sucos de maçã e derivados, embora a

União Européia tenha estabelecido 25 µg/Kg em compotas e purês e 10 µg/Kg em produtos infantis.

A contaminação de suco de maçã por patulina ocorre principalmente em períodos de baixa produção ou entressafras quando a matéria-prima é escassa. Com o intuito de evitar maiores perdas na produção de suco, maçãs deterioradas são também utilizadas no processamento, aumentando o risco de incidência da micotoxina em produtos derivados. Entretanto, este problema é minimizado em derivados fermentados, cujas leveduras utilizadas no processo fermentativo têm poder detoxificante, reduzindo e/ou eliminando a contaminação presente na matéria-prima.

A degradação da toxina por leveduras está associada a um mecanismo de defesa do microrganismo, relacionado à síntese de proteínas. O emprego de leveduras e seus metabólitos no biocontrole durante o armazenamento dos frutos tem apresentado excelentes resultados contra o desenvolvimento e germinação de esporos de fungos deteriorantes.

Sendo assim, a investigação de compostos bioativos de leveduras sobre possível efeito degradador de micotoxinas associado ao biocontrole de caráter inócuo, compatíveis com a aplicação prática, seria favorável para garantir a qualidade e segurança de produtos oriundos da fruticultura.

A necessidade de aprofundar o conhecimento de compostos bioativos detoxificantes produzidos por leveduras, com ênfase em purificação, caracterização e estabilidade, possibilitará direcionar com eficiência racional, o controle de micotoxinas em alimentos, melhorando a qualidade higiênico-sanitária do produto.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE FRUTAS NO PAÍS

A produção de frutas no Brasil cresceu 4,5% em 2008, estimulada por um expressivo consumo interno, pela demanda crescente de agroindústrias e pelas vendas externas. Os últimos dados informados pelo Instituto Brasileiro de Frutas (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS-IBRAF, 2008) são referentes ao ano de 2007, quando o Brasil produziu mais de 43,7 milhões de toneladas de frutas, classificando o país como o terceiro maior produtor mundial, atrás da China e da Índia, é o 15º maior exportador e ocupa o 8º lugar em eficiência de produção (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION-FAO, 2008; IBRAF, 2008). Do total produzido, 45% das frutas destina-se ao consumo nacional *in natura*, 53% à indústria processadora e apenas 2% à exportação de frutas frescas, evidenciando a necessidade de incentivo para agilizar maior inserção no mercado internacional (FAO, 2008). As exportações brasileiras de frutas *in natura* geraram divisas de 430 milhões de dólares em 2007, sendo que cerca de 65 milhões foram decorrentes da maçã e seus derivados com crescimento de 100% nas exportações da fruta *in natura*, passando de 53 mil toneladas em 2006 para 106 mil toneladas em 2007 (IBRAF, 2008).

2.1.1 Maçã

Atualmente, há diversas espécies de macieiras como, por exemplo, a *Malus sylvestris* originária da Europa e a *Malus prunifolia* originária do Cáucaso e de parte da Rússia, mas não se sabe ao certo quando e onde se originou a macieira e qual ou quais foram as espécies silvestres que deram origem à maçã contemporânea, cujas variedades são atualmente conhecidas. Os frutos da macieira podem ser distinguidos e agrupados por suas variações de sabor, tamanho, forma, aparência, consistência da polpa e casca, e por suas distintas utilidades. De uma forma geral, as maçãs podem ser classificadas em três tipos: de mesa, de

cozinhar ou próprias à fabricação de sidra ou de vinagre (TODA FRUTA, 2008). Uma mesma árvore pode fornecer frutos com diferentes aproveitamentos, de acordo com sua classificação. Pela sua capacidade de produzir fibras de boa qualidade e pelo seu alto teor de potássio, a maçã é uma fruta indicada para manutenção da saúde, prevenindo doenças cardíacas e excesso de colesterol no sangue, e para dietas de emagrecimento (TODA FRUTA, 2008).

2.1.1.1 Colheita e armazenagem

As macieiras se desenvolvem bem em clima temperado, sendo favorável e essencial para uma boa produtividade, o que limita as regiões de plantio, colocando o Sul do Brasil em posição privilegiada em relação às demais regiões (SIMÃO, 1998).

A colheita é feita de acordo com os critérios de qualidade relacionados as características que se desenvolvem pós-colheita, durante a maturação dos frutos (TU; NICOLAI; DE BAERDEMAEKER, 2000).

Frutos destinados à comercialização imediata e à exportação são aqueles que apresentam melhor qualidade em termos de aparência, como coloração uniforme, forma característica, ausência de podridões e danos mecânicos ou machucados. Frutos com maior tamanho, mais aromáticos, com elevado teor de sólidos solúveis e com coloração mais intensa são obtidos com colheita tardia (ARGENTA, 1993; WATKINS *et al.*, 1993).

Os frutos que não se destinam imediatamente ao mercado consumidor são armazenados em câmaras frigoríficas que contribuem para diminuição do seu metabolismo, conservação das características físico-químicas e diminuição no crescimento de fungos. Esta armazenagem pode ser associada 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 e menor incidência de degenerescência na temperatura de -0,5°C (BRACKMANN; MAZARO; LUNARDI, 1998).

2.1.1.2 Produção de maçãs no Brasil e no Mundo

A extensão territorial e a diversidade climática do Brasil permitem o cultivo das mais variadas frutas, porém, o fator determinante no plantio das macieiras numa região depende do período de baixa temperatura, necessário para o repouso vegetativo e conseqüente quebra de dormência (FUNDAÇÃO CARGILL, 1983). No Brasil, safra 2007/08, foram produzidas 1,1 milhões de toneladas de maçã (IBRAF, 2009). As exportações de maçãs *in natura* chegaram a 112 mil toneladas e na forma de suco de maçã a 33 mil toneladas em 2008 (IBRAF, 2009). A Região Sul do país apresenta o clima mais propício para produção de maçã, sendo responsável por 98% da produção nacional, com aproximadamente 4% provenientes do Estado do Paraná (PR), 42% do Rio Grande do Sul (RS) e 54% de Santa Catarina (SC) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2007; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MAPA, 2007). As cultivares predominantes de maçã são Gala e Fuji, com representatividade de 46 e 45%, respectivamente, em relação à produção total (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ-ABPM, 2004).

No ano de 2000, o Brasil exportou mais de 60 mil toneladas de maçã para a Europa e está atingindo auto-suficiência na suplementação do mercado interno, recebendo destaque entre os frutos exportados, devido à vantagem na diferença de periodicidade em relação ao Hemisfério Norte (IBRAF, 2005). A safra nacional de maçã 06/07 atingiu 1113,8 mil toneladas, indicando aumento de 31,2% em comparação com os dados da produção anterior (produção de 849 mil toneladas) (IBGE, 2007).

2.1.2 Suco de maçã

O suco de maçã é o produto extraído da fruta por moagem ou prensagem (pressão), passando por um processamento de clarificação, adição de antioxidante, desaeração,

pasteurização e envase, sem adição de açúcar, adoçante ou conservantes. O produto final se apresenta como líquido límpido, claro e brilhante (KOZLOWSKA *et al.*, 2003; WOSIACKI *et al.*, 2002). O suco também pode receber adição de polpa para melhorar sua consistência ou adição de açúcar para corrigir a doçura, sendo então chamado de néctar de maçã.

2.1.2.1 Produção e consumo de suco de maçã

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

A indústria consumiu 18,9% da produção nacional de maçãs na safra 01/02, 81,1% destinado ao comércio da fruta *in natura*, sendo 7,6% destes para exportação (ABPM, 2005). Com o aumento da produção nacional, aumentaram as exportações da fruta *in natura* e a venda para as fábricas de suco (WOSIACKI *et al.*, 2002). A maior parte da produção nacional de suco concentrado de maçã destina-se à exportação, apresentando grande concorrência com a Argentina e Chile, países com tradição no processamento de maçãs e grandes produtores mundiais (PRADO, 2000).

No Brasil, o comércio interno de suco de fruta é pequeno, em torno de 5 a 7 litros anuais por habitante, decorrente do alto preço, falta de divulgação, incentivo, investimentos e de disponibilidade de variedades. A produção e comercialização de suco no Brasil é insignificante quando comparado com a Europa e os Estados Unidos, onde o consumo de sucos de fruta chega a 30 litros anuais por habitante, destacando-se o suco de maçã como o mais popular e segundo suco mais consumido no mundo (GALCIA-CLOSAS *et al.*, 2004; IBRAF, 2005).

2.1.2.2 Qualidade e legislação de suco de maçã

O Ministério da Agricultura define o suco de maçã como sendo a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da maçã (*Malus domestica* Borkh) por processo tecnológico adequado devendo obedecer aos Padrões de Identidade e Qualidade, fixados para suco de fruta (MAPA, 2000).

Pelo regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de maçã, deverá obedecer as características e composição. A cor deve ser translúcida, o aroma próprio, sólidos solúveis num mínimo de 10,5°Brix (20°C), acidez total acima de 0,15g/100g expressa em ácido málico, acidez volátil no máximo de 0,04g/100g expressa em ácido acético e açúcares totais naturais do fruto até 13,5g/100g (BRASIL, 2000).

Alguns países da Europa e os EUA também estabelecem níveis máximos para conteúdo de patulina em derivados de maçã. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda concentrações inferiores à 50 µg/L e, em 2001, o *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um documento, “*The Draft Guidance Document of FDA Components and Industry on Apple Juice and Apple Juice Products*”, que estabelece o limite de 50 µg/L para sucos de maçã e derivados (RICHARD *et al.*, 2003). A União Européia adotou recentemente este mesmo nível máximo e também 25 µg/Kg em produtos sólidos incluindo compota e purê de maçã e ainda o nível máximo permitido de 10 µg/Kg é proposto para produtos de maçã destinados a crianças (FONSECA, 2008).

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 para países que possuem limites estabelecidos por legislação para esta micotoxina em sucos (MELLO, 2004).

Na Tabela 01 observa-se que os países que tem legislação seguem a recomendação da OMS e da FDA de no máximo 50 µg/L de patulina em suco de maçã.

Tabela 01. Países que possuem legislação para patulina e o limite máximo permitido.

País	Tipo de alimento	Limite ($\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/Kg}$)
Alemanha	Suco de maçã	50
Áustria	Suco de frutas	50
Finlândia	Todos os alimentos	50
França	Suco de maçã e produtos derivados	50
Grécia	Suco de maçã e produtos de maçã	50
Israel	Suco de maçã	50
Itália	Suco de frutas	50
Noruega	Suco de maçã concentrado	50
República Tcheca	Todos os alimentos	50
	Alimentos para crianças	30
	Alimentos infantis	20
Romênia	Todos os alimentos	50
	Rações	30
Suécia	Suco de frutas	50
Suíça	Suco de frutas	50
Uruguai	Suco de frutas	50

Fonte: (FONSECA, 2008).

2.1.3 Propriedades estruturais e funcionais de patulina

A patulina, 4hidroxi-4furo[3,2-c]pirano(6H)-1 (Figura 01), uma micotoxina termo-resistente da classe hidroxifuropiranona e também chamada clavicina, claviformina ou expansina, apresenta fórmula empírica $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$ e sua massa molecular é de 154,12 Da. Pode ser produzida como metabólito secundário por várias espécies de fungos para inibir o crescimento de outros microrganismos. A patulina foi isolada pela primeira vez de *Penicillium claviforme*, nomeada claviformina, mas em razão de seu freqüente isolamento partindo de *Penicillium patulum*, hoje se chama patulina. Achava-se que era um antibiótico, mas pelos seus efeitos tóxicos em animais, foi considerada uma toxina. Apresenta estabilidade em ácidos diluídos e é resistente à temperatura de 125°C na faixa de pH entre 3,5 e 5,5,

ocorrendo o inverso em soluções alcalinas e compostos sulfurosos representados por metabissulfito e radicais sulfidrilas, quando diminui a sua atividade biológica (ENGEL; TEUBER, 1984; GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001; SCUSSEL, 1998). Sua atividade carcinogênica é atribuída à insaturação α, β , junto com uma dupla ligação conjugada externa, unida na posição 4 do anel lactona. Apresenta absorção UV máxima de 256,5 nm e solubilidade em água e solventes orgânicos comuns, exceto éter de petróleo (MAJERUS; KAPP, 2002; MOAKE; PADILLA-ZAKOUR; WOROBO, 2005; RYCHLIK; SCHIEBERLE, 2001).

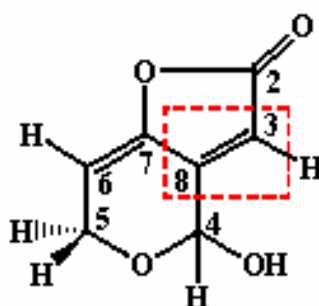


Figura 01 – Estrutura molecular da patulina (MOSS, 2008).

Formada pela via das policetidas (Figura 02), a patulina causa efeitos tóxicos em animais, de caráter teratogênico e cancerígeno em camundongos, além de lesões pulmonares, hepáticas e renais (GÖKMEN; ACAR, 1998 [01]; RICHARD *et al.*, 2003), efeitos gastrointestinais e neurotóxicos (HOPKINS, 1993) e imunotóxicos (SHARMA, 1993). A dose de letalidade - DL_{50} para camundongos varia de 5 a 30 mg/Kg de peso corpóreo (BOONZAAIJER; BODELDIJK; VAN OSENBRUGGEN, 2005). Segundo pesquisadores, a dupla ligação presente na estrutura da patulina interage com os ácidos nucleicos, afetando a transcrição gênica e conseqüentemente a síntese de biomoléculas (ARAFAT; MUSA, 1995; HATEZ; GAYE, 1978; MIURA; HASUMI; ENDO, 1993; MOULE; HATEY, 1977), também ocasiona o rompimento da membrana do protoplasma (MAHFOUD *et al.*, 2002; RILEY;

SHOWKER, 1991) e inibição da produção de interferon (WICHMANN; HERBARTH; LEHMANN, 2002). O resultado destes estudos é, como um todo, inconclusivo em humanos, mas sugere que sintomas agudos pelo consumo de patulina podem incluir agitação, convulsões, congestão pulmonar, edema, ulceração, hiperemia, distensão gastrointestinal, hemorragia intestinal, degeneração de células epiteliais, inflamação intestinal, vômitos e danos nos rins (MAHFOUD *et al.*, 2002; MCKINLEY; CARLTON; BOON, 1982). Após ingestão, a patulina é rapidamente excretada (cerca de 87%), sendo 49% nas fezes, 36% na urina e 1 a 2% pela via respiratória na forma de dióxido de carbono (MOSS, 2008).

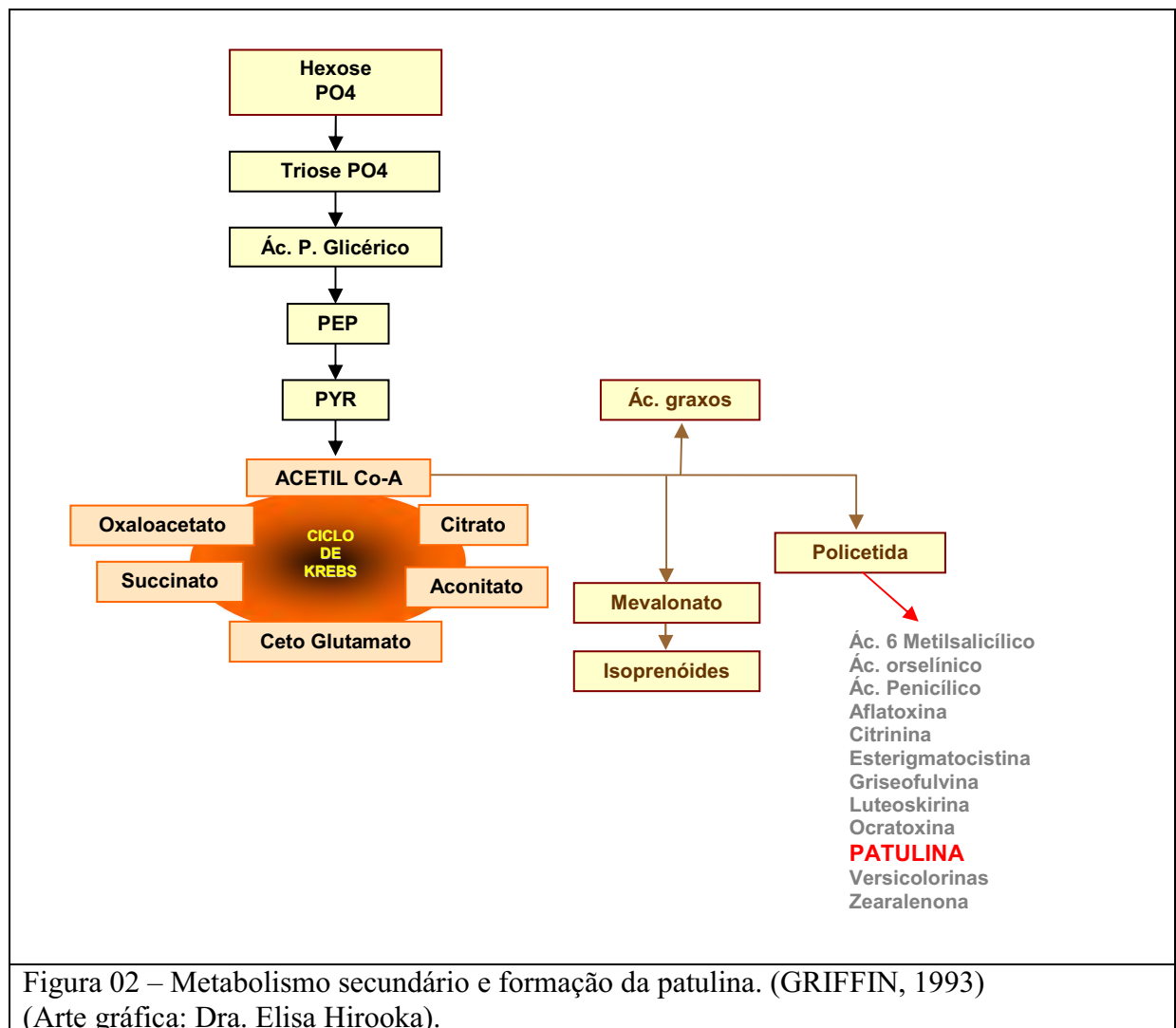
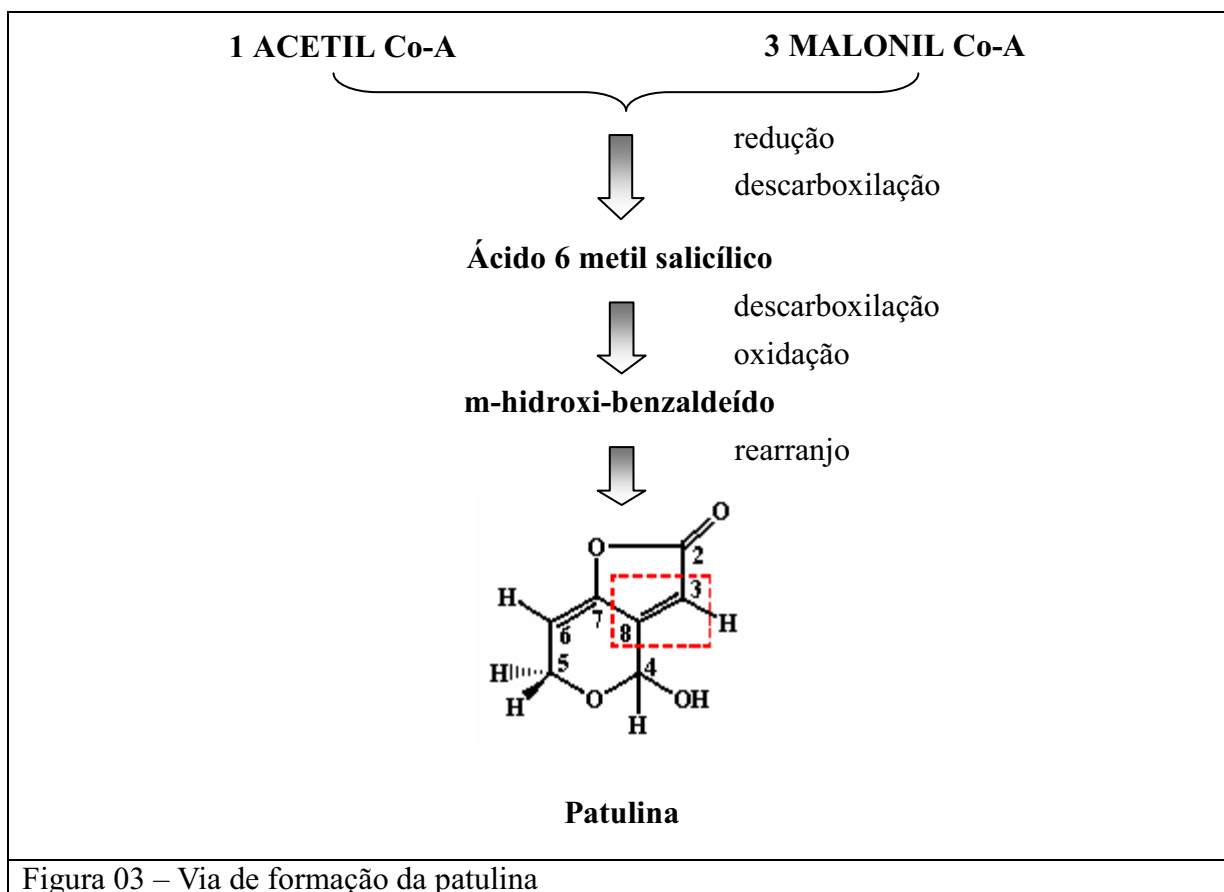


Figura 02 – Metabolismo secundário e formação da patulina. (GRIFFIN, 1993)
(Arte gráfica: Dra. Elisa Hirooka).

A produção de patulina ocorre quando a taxa de crescimento diminui em virtude das limitações do consumo de nitrogênio (GROOTWASSINK; GAUCHER, 1980). A biossíntese de patulina é bem compreendida e envolve uma série de condensações e reações de oxiredução, muitas, se não todas, catalisadas por enzimas. Sua síntese é iniciada com uma unidade de acetil-Coenzima A e três unidades de malonil-Coenzima A, sendo condensados em ácido 6-metilsalicílico (6-MAS) pela ação da enzima ácido 6-metilsalicílico sintetase (6-MAS sintetase). A próxima etapa envolve a conversão de 6-MAS em m-cresol pela atividade da 6-MAS descarboxilase. M-cresol é convertido em álcool m-hidroxibenzil através da m-cresol hidrolase. O próximo passo é a conversão do álcool m-hidroxibenzil a gentisaldeído pela enzima álcool m-hidroxibenzil desidrogenase, tendo como intermediário de reação o m-hidroxibenzaldeído ou o álcool gentisil. Uma vez formado o gentisaldeído, é convertido para isopoxidona, filostina, neopatulina, E-ascladiol e finalmente para patulina (Figura 03) (GRIFFIN, 1993).



Selmanoglu e Koçkaya (2004) investigaram os efeitos tempo-dependentes de patulina nos níveis de triiodotironina (T3), tetraiodotironina (T4), hormônio tireóide estimulante (TSH), testosterona, hormônio luteinizante (LH) e hormônio de crescimento (GH) no desenvolvimento de ratos machos de 5-6 semanas de idade por um período de 60 e 90 dias. A dose de patulina utilizada foi baseada em níveis de exposição humana (0,1 mg/Kg de peso corporal/dia). Ao término da experiência foram verificados os níveis de hormônio no soro e análise histopatológica por microscopia da tireóide e testículos. Os resultados revelaram que, após 60 dias de ingestão, os ratos apresentaram um aumento de 66,6% nos níveis de testosterona e uma diminuição de 17,3% nos níveis de T4. Após 90 dias de ingestão de patulina, os níveis de testosterona estavam aumentados em 75% e LH em 146%. Os exames histopatológicos do testículo demonstraram hiperplasia local no tecido intersticial e também desorganização do epitélio do tubo seminífero. A tireóide revelou infiltração de células linfóides e aumento do tecido intersticial entre os folículos e degeneração coloidal.

Em 2006, Iwahashi *et al.* avaliaram a citotoxicidade da patulina em leveduras por análise de transcrição observando a resposta nas leveduras após exposição a 50ppm de patulina. Encontraram a expressão de genes patulina-induzidos, semelhantes à expressão de genes obtidos após tratamento com substâncias agrícolas antifúngicas (maneb[®] e zineb[®]). Além disso, o tratamento com patulina ativou a degradação de proteínas, especialmente as atividades de proteossoma, metabolismo de aminoácidos sulfurados e sistema de defesa contra oxidação. Sugeriram danos no DNA por alquilação, o qual era reparado por recombinação e mecanismos de reparos. Os resultados também proveram genes biomarcados para a descoberta de patulina em produtos agrícolas. Os resultados sugeriram a possibilidade de aplicar o sistema de transcrição das leveduras para avaliação de substâncias químicas, especialmente para substâncias naturais que são difíceis de resistir à síntese orgânica.

Embora não exista nenhum dado toxicológico ou epidemiológico em seres humanos, a patulina vem sendo empregada como indicador de qualidade nos frutos e produtos de maçã (MOSS, 1996). O Ministério Britânico de Agricultura, Pesca e Alimentos (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD-MAFF) tem monitorado os níveis de patulina em sucos de maçã desde 1980. Quando contaminações acima de 50 µg/L foram confirmadas pela primeira vez, em 1992, foi sugerido o limite máximo permitido de até 50 µg/L, que foi confirmado em 1995 (UNITED KINGDOM, 1993). Com o estabelecimento de programas de controle, a redução dos níveis de patulina em sucos de maçã alcançou 60% (UNITED KINGDOM, 1998). Outros países como Suécia, Bélgica e Noruega também estabeleceram concentração máxima permitida de até 50 µg/L, como recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OUGH; CORISON, 1980).

Em 2001, o *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um documento, “*The Draft Guidance Document of FDA Components and Industry on Apple Juice and Apple Juice Products*”, que estabelece o limite de 50 µg/L para sucos de maçã e derivados (RICHARD *et al.*, 2003), embora a União Européia tenha estabelecido 25 µg/Kg em compotas e purês e 10 µg/Kg em produtos infantis (BOONZAAIJER; BODELDIJK; VAN OSENBRUGGEN, 2005; EUROPEAN COMMISSION, 2003). A Organização Mundial de Saúde (OMS) alterou o limite de ingestão de 7,0 para 0,4 µg/Kg de peso corpóreo/dia (BAERT *et al.*, 2004; BOLGER, 2002).

2.1.3.1 Principais microrganismos produtores de patulina

A patulina é produzida por mais de 60 espécies de fungos pertencentes a 30 gêneros (LAI, FUH, SHIH, 2000). Dentre esses citam-se *Penicillium expansum* (*P. leucopus*), *P. patulum* (*P. urticae*, *P. griseofulvum*), *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. claviforme*, *Paecilomyces* spp., *Saccharomyces vesicarium*, *Alternaria alternata*, *Byssochlamys nivea*, *B.*

fulva, *Aspergillus giganteus*, *A. terreus*, e *A. clavatus* (AYTAC; ACAR 1994; LAIDOU; THANASSOULOPOULOS; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2001; MOSS; LONG, 2002), destacando-se com especial importância e interesse o *P. expansum*, patógeno facultativo que invade frutas danificadas causando podridão, mais comum em maçãs, podendo assim ocorrer patulina em suco de maçã fresco. Normalmente é encontrada em altas concentrações na parte da fruta onde há presença de esporos (93 a 95% de toda toxina), difundindo-se para outras partes sadias do fruto devido sua hidrossolubilidade, até 4 cm além da lesão (BAERT *et al.*, 2004; LAIDOU *et al.*, 2001). Também pode ser produzida por *Aspergillus clavatus* em resíduos de cevada malteada e restos de cereal no campo, e por *Byssochlamys nivea* e *B. fulva* em silagem (SCUSSEL, 1998). Microrganismos produtores de patulina também já foram isolados de uvas, cerejas, pêras, damascos, nectarinas, pêssegos, tomates, mirtilo e amêndoas (DEMIRCI; ARICI; GUMUS, 2003; JIMINEZ *et al.*, 1991; LEGGOTT; SHEPHARD 2001; PRIETA *et al.*, 1994; RITIENI, 2003).

Penicillium spp. é certamente o fungo toxigênico de maior incidência em maçãs, considerado um patógeno de fermentos, que cresce em atividade de água (a_w) entre 0,83 a 0,99 e tem a capacidade de tolerar até 80% de sacarose (p/v) no meio de crescimento, causando podridão de coloração azul na parte externa da maçã e bege ou marrom-clara no tecido, deixando o fruto aguado e mole (HEFNAWY; ABOU-ZEID, 2003). Stott e Bullerman (1975) avaliaram a microbiota fúngica que contaminavam naturalmente maçãs, observando que 66% tem a capacidade de produzir patulina, sendo predominantes os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoclamys*.

Dombrink-Kurtzman e Blackburn (2005) avaliaram diferentes espécies de *Penicillium* spp. para determinar sua toxigenicidade em diferentes meios de cultivo. Para isto, utilizaram 11 espécies toxigênicas dos fungos, *P. expansum* (4), *P. griseofulvum* (3), *P. clavigerum* (2), *P. coprobium* (1) e *Penicillium* spp. (1) isolado de maçã. As culturas foram

cultivadas em meios líquidos Batata Dextrose, Extrato de Malte e Extrato de Levedura peptonado adicionado de glucose, todos com e sem suplementação de manganês, totalizando seis formulações diferentes. A quantificação foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector Ultravioleta (UV). As três cepas de *P. griseofulvum* apresentaram maior produção de patulina ao final do experimento. Para a maioria das cepas, o Caldo Batata Dextrose suplementado com manganês propiciou máxima produção de micotoxinas. Embora *P. expansum* seja frequentemente citado como provável fonte de patulina em sucos de maçã, outras espécies de *Penicillium* podem ser mais toxigênicas, devendo a indústria estar alerta à possibilidade destas outras serem as responsáveis pela ocorrência de patulina.

Hasan (2000) determinou as espécies de fungos predominantes e ocorrência de micotoxinas em maçãs sadias (100) e deterioradas (100). Também avaliou o efeito do tempo e temperatura sobre o crescimento de *P. expansum* em meio contendo glucose, NaNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl e extrato de maçã e a inibição da produção de patulina e aflatoxina utilizando óleos de frutas. *Aspergillus flavus* (100%), *A. niger* (63%), *Penicillium expansum* (50%) e *Rizopus stolonifer* (50%) foram os fungos isolados com maior frequência em frutas saudáveis. *A. niger* foi o microrganismo mais comum em maçãs deterioradas (83%), seguido de *A. flavus* (67%), *P. expansum* (58%), *R. stolonifer* (53%) e *Alternaria alternata* (42%). As micotoxinas naturalmente encontradas em maçã deteriorada foram aflatoxina e principalmente patulina. A temperatura ótima para produção de patulina por *P. expansum* foi de 15°C após 15 dias. Utilizando 0,2% de óleo de limão no meio de cultivo, a produção de patulina foi inibida completamente e com 0,05% de óleo de limão mais 0,2% de óleo de laranja reduziu mais de 90% da produção. A formação de aflatoxina foi reduzida em 90% quando era utilizado 0,2% de óleo de limão. A frequente ocorrência de *P. expansum* produtor de patulina em frutas

aponta a importância do controle durante o armazenamento das maçãs para evitar riscos de ingestão de toxina, devendo ser removido o tecido danificado antes da utilização do fruto.

Baseado nos tratamentos de lavagem de maçãs antes do armazenamento em câmaras frias, Chen, Ingham e Ingham (2004), avaliaram a eficácia desses tratamentos em maçãs cultivar Empério com relação ao crescimento de *P. expansum* NRRL 2304 e produção de patulina. Para os tratamentos foram utilizados sanitizantes comumente empregados na indústria. Os sanitizantes consistiram de solução de 200 ppm NaOCl, StorOx[®] 1%, sorbato de potássio 0,5%, 300 ppm SO₂, e solução de ácido acético entre 0 e 5%. Esporos de *P. expansum* foram inoculados em fatias de maçãs e, então, mergulhadas nas soluções por 5 min. O crescimento do fungo e a produção de patulina foram monitorados durante o armazenamento subsequente. A solução de sorbato de potássio (0,5%) e a de SO₂ (300 ppm) não afetou a sobrevivência do fungo ou produção de patulina. StorOx[®] (1%) foi efetivo contra os esporos em solução (destruição de 4 log de Número Mais Provável de esporos), mas não teve efeito quando os esporos estavam inoculados em fatias de maçãs. A lavagem com 200 ppm de NaOCl dificultou o crescimento de *P. expansum* em discos de maçã inoculados, mas não inibiu completamente a produção de patulina. A solução ácido acética (2 a 5%) apresentou maior eficácia contra *P. expansum*. Um tratamento de lavagem com 2% de ácido acético por 1 min foi suficiente para inibir por completo o crescimento do fungo e subsequente produção de patulina em maçãs armazenadas destinadas à produção de suco e sidra.

A produção de diferentes metabólitos de *P. expansum* isolados de culturas de origem pura foi demonstrada por Andersen, Smedsgaard e Frisvad (2004). Ao contaminar frutas e produtos de frutas, o fungo produziu substâncias tóxicas diferentes da patulina. Os autores enfocaram a atenção das legislações e das indústrias alimentícias no problema relacionado aos metabólitos de *P. expansum*. De acordo com a literatura, este fungo pode produzir citrinina,

ocratoxina A, patulina, penitrem A, e rubratoxina B. Neste estudo a produção qualitativa de metabólitos foi examinada usando Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (260 fungos), CLAE (85 fungos), e Espectrometria de massa (EM) (22 fungos). Os resultados mostraram que nenhum dos 260 fungos isolados produziram ocratoxina A, penitrem A ou rubratoxina B. Porém, quetoglobosina A e comunesina B foram produzidos constantemente por todos os fungos. Patulina e roquefortina C foram produzidos por 98% do fungos isolados e descobertos expansolidas A/B e citrinina em 91 e 85%, respectivamente.

Abramson *et al.* (2009) isolaram de maçãs provenientes do Canadá, 24 cepas de *P. expansum* e avaliaram sua capacidade de produção de patulina e citrinina. Quando cultivaram estes microrganismos em caldo YES (*Yeast Extract Saccharose*, extrato de levedura acrescido de sacarose) a 25°C por 28 dias, os isolados mostraram-se potentes produtores de citrinina ou patulina, e na maioria dos casos, ambas as micotoxinas. Citrinina e patulina foram produzidas em concentrações máximas de 565µg/mL (média 269µg/mL) e 100 µg/mL (média de 31µg/mL) respectivamente. Dentre os isolados, 91% produziram citrinina e 83% produziram patulina.

Em 2001, Abrunhosa *et al.* determinaram o potencial toxigênico de fungos isolados de uvas destinadas à produção de vinho de duas regiões vinícolas de Portugal. Os fungos toxigênicos isolados (51) foram identificados como *P. expansum* produtores de patulina e/ou citrinina, as quais foram quantificadas por CCD, e nenhum fungo produtor de ocratoxina foi encontrado. Quando os fungos eram cultivados em caldo YES, favorecia a produção de citrinina (51 cepas) e desfavorecia a produção de patulina (20 cepas). Quando cultivados em suco de uva, 33 cepas produziram patulina enquanto citrinina foi produzida por apenas uma das cepas. A presença de micotoxinas em vinhos de uva é discutida. A contaminação das uvas com patulina pareceu não contribuir para contaminação do vinho. As uvas da cultivar Douro apresentavam contaminação por *P. expansum*, mas as uvas da cultivar Vinho Verde não

apresentavam tal contaminação. Isto ocorreu devido à resistência dos cultivares a fungos ou por sofrer influência de fatores ambientais.

2.1.3.2 Controle de fungos

Tratamentos pós-colheita com fungicidas são utilizados para reduzir as deteriorações do fruto, como por exemplo, a aplicação do fungicida sintético imazalil (Freshgard[®] e Fungaflo[®]) em maçãs (NUNES *et al.*, 2001), mas cepas de *P. expansum* acabam desenvolvendo resistência (CONWAY *et al.*, 2004; JANISIEWICZ *et al.*, 2003). Em vista do interesse na ampliação da exportação de frutas brasileiras, o controle na armazenagem se tornou essencial para garantir a qualidade (IBRAF, 2008). Os consumidores cada vez mais conscientes vêm impondo exigências quanto à necessidade de produtos isentos de resíduos de agrotóxicos (CONWAY *et al.*, 2004; WISNIEWSKI; WILSON, 1992).

Métodos alternativos desenvolvem-se para o controle do bolor azul como a utilização de microrganismos antagônicos (COELHO, 2005; LEVY *et al.*, 2000) aplicação de antibióticos naturais (BATTA, 2004; SHOLBERG; BEDFORD; STOKES, 2005), aplicação de produtos sanitizantes (CONWAY *et al.*, 2004).

Okull e Laborde (2004) avaliaram a influência da oxidação eletrolítica (19,0 A) na viabilidade de esporos de *P. expansum*. O teste foi realizado em uma suspensão aquosa contendo o fungo (10^6 esporos/mL) e em maçãs inoculadas com os esporos (10^6 esporos) imersas em solução de cloridrato de sódio (0,1%). Aplicando a força eletrolítica máxima e de 50%, diminuiu a população de esporos viáveis por 4 e 2 unidades logarítmicas, respectivamente. A oxidação eletrolítica não preveniu a formação posterior da lesão na fruta inoculada diretamente com *P. expansum*, porém, ocorreu a formação de uma lesão menor quando as maçãs foram armazenadas. Concluíram que a oxidação eletrolítica é uma potencial

alternativa como desinfetante, podendo substituir o cloro no controle de infecções de maçãs por *P. expansum* durante o armazenamento e processamento das frutas.

Inicialmente as pesquisas para controle biológico eram direcionadas aos metabólitos bacterianos que demonstravam perspectivas promissoras para restringir o uso de agrotóxicos químicos (SANHUEZA; KRETZCHMAR; BORSÓI, 1992). Florianowicz (2001) mostrou a eficiência da atividade antifúngica de *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii* e *L. lactis* contra *P. expansum*. Nunes *et al.* (2001) relataram excelente controle exercido por *Pantoea agglomerans* (CPA-2) contra *B. cinerea* e *P. expansum* sob refrigeração, evidenciada pela redução de mais de 80% na deterioração de pêra ($8,0 \times 10^7$ UFC/mL) causada por *P. expansum* e *Rhizopus stolonifer* (10^3 , 10^4 e 10^5 conídias/mL).

Nos últimos anos, as leveduras e seus metabólitos também vem sendo estudados para sua utilização no controle biológico. Levy *et al.* (2000) analisaram o potencial antagônico de 18 leveduras contra *Penicillium* spp. produtor de patulina, avaliando o potencial e a estabilidade dos compostos ativos produzidos, utilizando o sobrenadante do meio de leveduras para realização de antifungigrama. Testes indicaram que o sobrenadante da levedura #38 apresentou maior halo e tempo de inibição. Esta atividade mostrou perspectivas para aplicação, porém, após 7 dias o efeito antagônico diminuiu devido à baixa estabilidade do composto responsável pela inibição, restringindo a aplicabilidade. Sob a forma de microrganismos vivos, os autores abrem perspectivas para estender ensaios com armazenagem a médio e longo prazo.

Usall *et al.* (2001) obtiveram resultados satisfatórios utilizando a levedura *Candida sake* (cepa CPA-1) no biocontrole de doenças pós-colheita causadas por *P. expansum* em maçãs, reduzindo a incidência de frutas deterioradas em mais de 70%. O tratamento de maçãs (cultivar *Golden Delicious*) pós-colheita com *C. sake* sob estocagem a frio em duas estações (1994/5 e 1995/6) também resultou no controle efetivo de *P. expansum*, com redução de 80%

no diâmetro da lesão e 50% na ocorrência das lesões (TEIXIDO; USALL; VINAS, 1999). No Brasil, Tavares (1996) obteve uma redução de *P. expansum* em até 80%, utilizando *Bacillus subtilis* e *B. thuringiensis*, sendo o resultado obtido superior ao controle químico.

Em estudo realizado por Coelho (2005), do total de 44 leveduras isoladas (16 de frutas, 10 de silagem de milho e 18 de formigueiro de laboratório), 5 apresentaram antagonismo contra esporos de *P. expansum* toxigênico (107 µg patulina/mL) em Ágar Meio para Levedura, associado à antibiose (produção de substância extracelular), sendo *Pichia ohmeri* 158 e *Candida guilliermondii* P3 as de maior atividade antagônica. No antifungigrama em meio líquido (caldo MPL) o sobrenadante do cultivo de *Candida guilliermondii* (25°C/72 horas) inibiu 58,15% da germinação dos esporos de *P. expansum*, e *Pichia ohmeri* (25°C/48 horas) inibiu o desenvolvimento de hifas em 66,17%, sugerindo mecanismo associado ao caráter *killer*, uma vez que ambas as leveduras foram positivas perante as linhagens padrão *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e *Pichia kluyveri* CAY-15.

2.1.3.3 Incidência de patulina em alimentos

Pesquisas mostraram que nem todos os produtos de maçã estão livres de patulina (SHILIHA; ASKAR, 1999). Alimentos infantis como os purês de maçãs, freqüentemente utilizados em papinhas de bebê, podem apresentar elevada contaminação, o que se torna mais preocupante pelo efeito correlato de dose ingerida x peso corporal. Os produtos comerciais obtidos a partir de maçã com maior valor agregado são os sucos clarificados e/ou reconstituídos e os fermentados, base para sidras (BISSESSUR; PERMAUL; ODHAV, 2001).

A presença de patulina em sucos de maçã está relacionada à contaminação da matéria-prima com fungos produtores da micotoxina e é de conhecimento técnico que o processo de clarificação não diminui o conteúdo de patulina no suco, apenas em pequena

proporção (16%) (BISSESSUR; PERMAUL; ODHAV, 2001). A temperatura empregada para pasteurização ou para produção de suco concentrado degrada a patulina, mas apenas num percentual pouco significativo. A utilização de radiação diminui as concentrações da toxina no suco de maçã causando pequenas alterações na coloração e nas concentrações de ácido ascórbico (ZEGOTA; ZEGOTA; BACHMAN, 1988). Pesquisas mostraram que os sucos clarificados e reconstituídos brasileiros não apresentaram teores de patulina preocupantes (SYLOS; RODRIGUES-AMAYA, 1999), contendo níveis abaixo do máximo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de 50 µg/L, supostamente pela utilização de matéria-prima de boa qualidade.

Em 1999, pesquisadores de São Paulo-Brasil determinaram a incidência de patulina em frutas e sucos de frutas comercializados em Campinas utilizando-se de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV e estabelecendo o limite de detecção de 5 µg/L com cromatografia de camada delgada para confirmação (SYLOS; RODRIGUES-AMAYA, 1999). Dentre as 30 amostras testadas, compostas de sucos comerciais adquiridos no mercado nacional, apenas em uma foi detectada a presença de patulina com a concentração de 17 µg/L. Os autores realizaram testes de recuperação mediante metodologias de diversos pesquisadores tendo obtido resultados diferentes, porém aceitáveis, dada a pequena variabilidade encontrada, e levantaram a hipótese de que a baixa incidência de patulina pode estar relacionada à sulfitagem dos sucos comerciais, permitido pela legislação brasileira, mas nada foi feito para confirmação.

Na Itália, Beretta *et al.* (2000) analisaram 82 amostras de produtos de maçã produzidos no país, concluindo que todas as amostras apresentaram boa qualidade, estando com concentrações de patulina inferiores a 50 µg/L. Ritieni (2003) analisou três procedimentos de extração de patulina utilizados para suco de maçã, sucos clarificados, alimento infantil e vinagre de maçã comercializados na Itália. Relatou que o método descrito

por MacDonald *et al.* (2000), o qual remove proteínas com sulfato de amônio sem adição de enzima, como sendo aquele que apresentou melhor recuperação, além de ser rápido e de baixo custo. A solução deste método clarificada em coluna de sílica gel também pode ser analisada por CLAE sem problemas. Dentre as amostras analisadas, somente uma delas apresentou nível superior ao permitido (50 µg/L); esta amostra era o purê de maçã orgânico com agente anti-microbiano (metabissulfito de sódio) com uma concentração de 74,2 µg/L.

Lai; Fuh e Shih (2000) estudaram as condições de CLAE de fase reversa em coluna de C₁₈ com detecção UV a 276 nm e avaliaram seu desempenho utilizando cromatografia gasosa para confirmação, visto que a espectrometria de massas foi ineficiente para confirmar baixas concentrações. Ao utilizar um volume de injeção de 50 µL, o limite de detecção calculado em suco de maçã foi de aproximadamente 0,5 µg/L e o limite de quantificação de 15 µg/L, abaixo de 20 µg/L como sugerido pela *Association of Official Analytical Chemists – AOAC* (2000). As taxas de recuperação atingidas foram satisfatórias, variando de 93,1 a 96,6%. As análises mostraram que das 105 amostras de sucos, 83,1% estavam isentas de patulina e 11,4% apresentaram pequenas quantidades, encontrando-se, ainda, dentro dos limites aceitáveis de no máximo 50 µg/L recomendado pela OMS.

Harwig *et al.* (1973) constataram alta ocorrência de *P. expansum* aliada à presença de patulina em 46% das maçãs naturalmente deterioradas, sob armazenagem sem refrigeração no Canadá, indicando aceleração na produção da toxina devido à conservação inadequada. O mesmo ocorreu com suco de maçã na Austrália, onde 65% das amostras apresentaram-se contaminadas por patulina (WATKINS; FAZERAS; PALMER, 1990). Anon (1999) e Brackett e Marth (1979) detectaram acima de 50 µg/L e 10 a 350 µg/L de patulina em 2,5 e 58% de amostras de sucos de maçã em Londres (Inglaterra) e Wisconsin (EUA), respectivamente. De 100 amostras de suco de maçã analisadas para verificação da incidência de patulina na Espanha, 82 estavam contaminadas, sendo que sete apresentaram níveis acima

de 50 µg/L (PRIETA *et al.*, 1994). A incidência de patulina também foi observada por Burda (1992) em 23% das 328 amostras de suco analisadas entre 1989/1990 no Reino Unido, com níveis da toxina entre 51 e 1130 µg/L em 73 amostras.

A contaminação com patulina em 215 amostras de suco concentrado de maçã foi detectada na Turquia, com valores variando de 7 a 376 µg/L (GÖKMEN; ACAR, 1998 [02]). Lindroth e Niskanen (1978) relataram a ocorrência de patulina em 20% dos sucos de maçã industrializados e 40% nos sucos caseiros, constatando-se no último grupo concentrações maiores que 1000 µg/L, provavelmente devido a condições inadequadas de estocagem, aliada à matéria-prima de baixa qualidade. Steiner; Werner e Washutti (1999) demonstraram a presença de níveis altos de patulina (500-2500 µg/L) em sucos de maçã, quando processados com frutas deterioradas. Boonzaaijer, Bobeldijk e Van Osenbruggen (2005) avaliaram a presença de patulina em 63 produtos comerciais derivados de maçã comercializados na Holanda e não encontraram níveis quantificáveis da toxina na maioria das amostras, porém a amostra de suco orgânico de maçã apresentou a toxina. Em uma pesquisa realizada em 42 amostras comerciais de suco e 23 de suco concentrado de maçã no Irã em 2002, a patulina foi detectada em 33 e 56%, respectivamente, com níveis superiores a 50 µg/L, cujo valor máximo foi 285,3 µg/L (CHERAGHALI *et al.*, 2005).

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

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

Outra pesquisa foi desenvolvida a fim de avaliar a produção de patulina em maçãs nos cultivares Gala e Fuji inoculados com *P. expansum* (NRRL 1172) e *P. variable* isolado de maçãs. Para isso, foram utilizadas temperaturas de armazenamento empregadas na indústria (0°C), de câmara fria (4°C) e temperatura ambiente (25°C) nos tempos de 15, 30, 60 e 90 dias. A produção de patulina ocorreu em todas as combinações de armazenagem, constatando que à medida que se elevava a temperatura, era acelerado o desenvolvimento dos fungos e a produção de patulina. A 0°C o aparecimento de patulina só foi detectado em 60 dias, a 4°C em 30 dias e a 25°C em 15 dias. As variações de pH não foram significativas e a deterioração macroscópica aumentava conforme o aparecimento de toxina. Os autores concluíram que os riscos freqüentes de produção de patulina nas temperaturas de refrigeração indicam a necessidade de melhor controle nos estágios de colheita e armazenagem de maçãs (ROSS *et al.*, 1998).

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

Entre 2 a 6% de patulina migrou para o tecido sadio, estando mais concentrada no diâmetro de 1,5 cm da lesão. Os autores sugeriram que a remoção do tecido afetado e tecido sadio próximo é uma boa prática para prevenção de toxina em derivados de maçã.

Morales *et al.* (2007) avaliaram a produção de toxina por *P. expansum* toxigênico isolado de frutos em maçãs maduras cultivar Golden, com e sem aplicação de fungicida (Folpet[®], tiabendazol e imazalil), durante armazenamento a 1°C por 6 semanas. Em nenhum fruto foi detectada a presença de toxina, indicando que à temperatura de armazenamento inibiu a produção de toxina pelo microrganismo. Em adição, mantiveram esses frutos à temperatura de 20°C por 3 dias, simulando a temperatura e tempo de transporte. Neste caso, observaram o aparecimento de lesões significativas com semelhante acúmulo de patulina em todos os frutos, indicando que o tratamento com fungicida não alterou a produção de toxina pelo fungo.

Em estudo semelhante, Higashihara *et al.* (2009) verificaram o efeito da temperatura de estocagem de maçãs na produção de patulina por *P. expansum*, e encontraram que a temperatura necessária para preservação dos frutos deve ser maior que 0°C. Para redução da produção de patulina pelo fungo, a temperatura deveria ser inferior a 5°C, sendo indicada a de 1°C como ideal para armazenamento pós-colheita.

Wilson e Nuovo (1973) isolaram 60 cepas de *P. expansum* produtoras de patulina em maçãs com deterioração, mantidas sob armazenagem de 0°C. Northolt; Van Egmond e Paulsch (1978) confirmaram o fato, constatando o desenvolvimento e produção de patulina em maçãs armazenadas a 1°C. Rychlik e Schieberle (2001) avaliaram a capacidade migratória da toxina em maçãs, encontrando concentrações de patulina em porções de até 4cm de distância da lesão, sendo essas com valor menor que 6×10^{-5} µg de patulina/g de tecido sadio. Celli (2006) quantificou a concentração de patulina em podridões de maçã, bem como o

tecido sadio ao redor da lesão (1cm). Encontrou patulina em todos os tecidos deteriorados e sadios analisados, chegando a 115,65 e 5,02 μ g de patulina/g de tecido, respectivamente.

Martins *et al.* (2002) verificaram a ocorrência simultânea de patulina e citrinina, micotoxinas produzidas principalmente por *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., respectivamente, em 351 podridões de maçã de diferentes cultivares, utilizando CCD para detecção e quantificação. O nível de detecção foi de 120-130 μ g/Kg para patulina e de 15-20 μ g/Kg para citrinina. Do total de amostras, 68,6% estavam contaminadas somente com patulina, 3,9% somente com citrinina e 19,6% contaminadas com patulina e citrinina, simultaneamente. A concentração de patulina chegou à 80,50 mg/Kg na cultivar Richared, e a de citrinina 0,92 mg/Kg na cultivar Rome Beauty, não sendo encontradas concentrações elevadas de ambas em uma mesma amostra. Os autores concluíram que maçãs que apresentam porções deterioradas apresentam risco ao ser humano se consumidos, como fruta ou suco de fruta, uma vez que podem conter elevada concentração de patulina.

Uma verificação da possível contaminação por patulina no aroma de maçã, um destilado de interesse comercial produzido durante a concentração de suco, foi realizada por Kryger (2001). O autor produziu um aroma de maçã a partir de um suco com elevada taxa de toxina (3420 ppb) e verificou que nenhuma patulina foi encontrada no destilado. Destacou, por outro lado, que ocorreu diminuição desta micotoxina presente no suco concentrado, mas que essa diminuição era decorrente do tratamento térmico empregado, o que já tinha sido relatado por outros pesquisadores. As concentrações de toxina reduziram aproximadamente 33% num tratamento térmico a 100°C por 3 horas sob vácuo. Das análises realizadas em 4 amostras de aromas comerciais, nenhuma apresentou níveis detectáveis de patulina.

Sendo a patulina um parâmetro de qualidade em sucos de maçã, Kadakal, Nas e Ekinci (2004) determinaram a presença de ergosterol e patulina em sucos contaminados para verificar se havia alguma relação entre elas. Sucos produzidos a partir de maçãs sadias, e a

partir de maçãs deterioradas apresentando 30%, 60% e 100% da área contendo podridão, foram analisados. Utilizando CLAE com detector diodo array para quantificação de patulina e de ergosterol, encontraram concentrações crescentes de ambos à medida em que as podridões da matéria prima aumentavam, variando de 1,9 à 861,0 µg de patulina/L (R=0,99) e de 0,7 à 111,0 mg de ergosterol/L (R=0,99). Correlacionando todas as concentrações de patulina e ergosterol, encontraram uma correlação linear de 0,98. Concluíram que, assim como a patulina, o ergosterol também pode ser utilizado como um controle microbiológico em maçãs.

Gökmen e Acar (1998 [01]) investigaram a relação entre a patulina e o ácido fumárico em 70 sucos comerciais de maçã concentrados para determinar se a presença de ácido fumárico é decorrente da atividade microbiológica da matéria-prima. Tanto a patulina, micotoxina produzida em maçãs principalmente por *P. expansum*, como o ácido fumárico, formado a partir do ácido málico sintético adicionado no suco de maçã durante a concentração do suco ou pelo crescimento de *Rhizopus* spp., foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Nenhuma correlação significativa foi encontrada para as amostras com níveis de patulina abaixo de 50 µg/L. As amostras que continham níveis de 67 a 216 µg de patulina/L tiveram um coeficiente de correlação ligeiramente maior que 0,55. O coeficiente de correlação mais significativo (0,71) foi determinado quando todas as 70 amostras foram correlacionadas. Este estudo indicou que a presença de ácido fumárico em suco de maçã é devido a atividade microbiológica da matéria-prima, porém, o tratamento de calor aplicado para concentração do suco, também propicia grande aumento desses níveis.

Pesquisas apontam que maçãs orgânicas apresentam maiores níveis de patulina que maçãs convencionais, sendo que essa maior contaminação se deve ao não tratamento com fungicidas, o que provavelmente resultou em maior incidência de fungos toxigênicos e, conseqüentemente, de patulina nessas frutas (MALMAURET *et al.*, 2002; PIEMONTESE;

SOLFRIZZO; VISCONTI, 2005). A Tabela 02 mostra a ocorrência de patulina em sucos de maçã e derivados comercializados em alguns países.

Tabela 02. Ocorrência de patulina em sucos de maçã e derivados em alguns países

País	n° de amostras analisadas	n° amostras positivas	Concentração de patulina ($\mu\text{g/L}$)	Referência
Brasil	30	1 (3,5%)	< 17	Sylos e Rodrigues-Amaya (1999)
EUA	10	2 (20%)	80 – 110	Trucksess e Tang (1999)
Inglaterra	40	1 (2,5%)	> 50	Anon (1999)
Brasil	13	1 (7,5%)	< 10	Prado <i>et al.</i> (2000)
Itália	82	2 (2,5%)	0,68 - 1150	Beretta <i>et al.</i> (2000)
Turquia	482	162 (33,5%)	50 – 376	Gökmen e Acar (2000)
África do Sul	20	6 (30%)	5 – 45	Leggott e Shephard (2001)
Cuba	20	1 (5%)	< 1,72	Fernández-Trevejo <i>et al.</i> (2001 [02])
Suécia	39	5 (13%)	2 – 50	Fernández-Trevejo <i>et al.</i> (2001 [02])
Turquia	45	27 (60%)	19,1 – 732,8	Yurdun, Omurtag e Ersoy (2001)
Bélgica	43	35 (81,5%)	0,7 - 17,3	Tangni <i>et al.</i> (2003)
Itália	21	5 (24%)	5,8 - 56,4	Ritieni (2003)
Japão	76	15 (20%)	1,4 - 45,6	Ito <i>et al.</i> (2004)
Itália	67	28 (42%)	0,07 - 69,3	Piemontese, Solfrizzo e Visconti (2005)
Irã	23	18 (78%)	15 – 149	Cheraghali <i>et al.</i> (2005)
Holanda	63	1 (1,5%)	< 25	Boonzaaijer, Bodeldijk e Van Osenbruggen (2005)
Brasil	27	3 (11%)	3 – 7	Iha e Sabino (2008)
Arábia Saudita	120	dados não informados	47 – 104	Gashlan (2009)
Brasil	16	4 (25%)	15 – 46	Welke <i>et al.</i> (2009[2])

2.1.3.4 Estratégias para redução da contaminação

Vários métodos são freqüentemente utilizados para reduzir os níveis de patulina em sucos de maçã, dentre eles destacam-se o tratamento com carvão ativado (LEGGOTT *et al.*,

2001; KADAKAL; NAS, 2002), dióxido de enxofre, irradiação gama, fermentação e lavagem das maçãs infectadas pelo fungo. Muitos desses processos são caros e/ou demorados. Por esta razão, é necessário encontrar um processo eficiente e econômico para controlar esses níveis (BISSESSUR; PERMAUL; ODHAV, 2001).

Em 2001, Gökmen *et al.* analisaram os efeitos da clarificação sobre a concentração de patulina, compostos fenólicos e ácidos orgânicos no suco de maçã. Os processos de clarificação empregados utilizaram tratamento enzimático para floculação seguidos de combinações de gelatina e bentonita, carvão ativado, ultrafiltração, resina adsorvente e/ou polivinilpolipirrolidona (PVPP). A clarificação convencional que utiliza gelatina, bentonita e carvão ativado demonstrou ser a mais eficaz na redução de patulina (40,9%), porém, esta técnica causou uma diminuição significativa na intensidade da cor e de compostos fenólicos no suco, afetando diretamente os padrões de identidade. A clarificação empregando ultrafiltração seguida de tratamento com resina adsorvente também resultou na diminuição de patulina (11,0%), trazendo melhorias na cor e transparência do suco. O PVPP não apresentou nenhum efeito sobre os teores de patulina, mas removeu drasticamente a concentração de fenóis. A composição de ácidos orgânicos não foi afetada pelas técnicas empregadas.

O carvão ativado, por suas propriedades adsorventes, foi usado para reduzir os níveis de patulina em suco de maçã, porém, sabe-se que a aparência e o sabor do suco podem ser afetados pelo tratamento (LEGGOTT *et al.*, 2001; HUEBNER *et al.*, 2000; KADAKAL, NAS, 2002).

A cinética de adsorção da patulina em carvão ativado, energia de ativação e calor de adsorção foi avaliado por Mutlu, Hizarcioglu e Gökmen (1997). Os pesquisadores estabeleceram uma aproximação para investigar o mecanismo de adsorção em carvão ativado de um grupo de substâncias químicas importantes nos sucos de fruta, selecionando a patulina como a substância química modelo. A cinética de sua adsorção em carvão ativado era

determinada por curvas isotérmicas de adsorção de equilíbrio a qual variou de 20 a 80°C e concentrações de patulina de 100 a 400 µg/L. Constantes da taxa de adsorção aparentes (K_{aapp}) foram alterados de $1,07 \times 10^{-3}$ para $1,86 \times 10^{-3}$ /g.min enquanto a temperatura aumentava. Para as curvas de adsorção de equilíbrio, foi empregado o modelo de Langmuir e parâmetros ajustados (K e Q°) foram obtidos para diferentes temperaturas. Energia de ativação e calor de adsorção foram determinados em sistema de adsorção do grupo ($E_a = 2,02$ kcal/mol e $\Delta H = 2,24$ kcal/mol). Concluíram que a adsorção ocorreu endotermicamente através de mecanismos físicos, a dependência de temperatura na cinética de adsorção foi descrita pelo modelo de Langmuir na fórmula de Arrhenius e o calor estável da patulina no processo em grupo foi reduzido ao mínimo.

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 utilizaram um micro invertebrado 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.

Três tipos diferentes de carvão ativado (NORIT SA 4, NORIT SX 4 e NORIT CA 1) foram avaliados quanto ao seu potencial na redução de patulina em suco concentrado de maçã, provendo uma detoxificação de sucos com níveis elevados da toxina. Os tratamentos foram realizados em sucos com 12°Brix e 120ng de patulina/mL e outro com 20°Brix e 160ng de patulina/mL, utilizando diferentes dosagens de carvão e temperaturas para verificar sua influência. O carvão NORIT SA 4 e o NORIT SX 4 exibiram curvas isotérmicas de adsorção semelhantes numa dosagem de 1 g/L. Eles alcançaram reduções de 80% e 70% de patulina, respectivamente, em 12°Brix e a 55°C. A semelhança no desempenho entre eles (carvão-

vapor ativado) sugeriu que a pureza e a acidez de superfície não influenciam a adsorção de patulina. O carvão quimicamente-ativado (NORIT CA 1) foi menos efetivo na remoção de patulina, reduzindo 45% da concentração inicial numa dose de 1 g/L. A remoção da patulina foi influenciada pelo Brix do suco, sendo que em Brix mais elevados a dose de carvão ativado requerido para remoção equivalente era maior. Numa dose de 1 g/L, NORIT SA 4 removeu somente 45% da patulina em suco com 20°Brix, enquanto a mesma dose removeu 80% da patulina em suco com 12°Brix. A remoção de patulina dos sucos por NORIT SA 4 (dose 1g/L) não foi influenciada pelas mudanças de temperatura entre 30 a 65°C. Em conclusão, o carvão ativado NORIT SA 4 provou ser o tratamento mais efetivo para a redução das concentrações de patulina em suco de maçã utilizando menores dosagens de carvão (LEGGOTT *et al.*, 2001).

O efeito da quantidade e do tempo de contato do carvão ativado sobre a concentração de patulina em suco de maçã foi estudado por Kadakal e Nas (2002). O melhor resultado foi obtido quando utilizaram 3 gramas de carvão ativado por litro de suco com tempo de contato de 5 minutos, obtendo redução na concentração da micotoxina de 62,2 para 30,8 µg/Kg.

Bebidas fermentadas não devem apresentar teores detectáveis de patulina, uma vez que as leveduras fermentativas degradam a toxina em condições anaeróbias. Em meio contendo patulina a levedura é induzida a produzir composto(s) capaz(es) de degradar a toxina. (LIPOWSKA *et al.*, 1990; STINSON *et al.*, 1978). Sumbu; Thonart e Bechet (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 ciclo-heximida, um inibidor de síntese protéica.

Drilleau e Bohoun (1973) analisaram 8 sidras francesas e 5 sidras dos EUA, detectando patulina em 5 e 4 amostras, respectivamente. Visto que os processos utilizados são

os mesmos até os dias de hoje, suspeita-se que a contaminação apresentada nestas sidras provenham do uso de matéria-prima com elevado grau de contaminação ou por alguma modificação nas etapas de produção como longo período entre a obtenção do suco e o início da fermentação, onde o crescimento fúngico e a produção de toxina continuam.

Em 2003 a Agência Britânica de Segurança Alimentar (*Food Standards Agency* - FSA) realizou um estudo em 100 amostras de sidras comerciais, não encontrando concentrações detectáveis de patulina (limite de detecção de 3 µg/L). Enfatiza-se que o processo fermentativo por *S. cerevisiae* é capaz de degradar de 93 a 99% da toxina inicial.

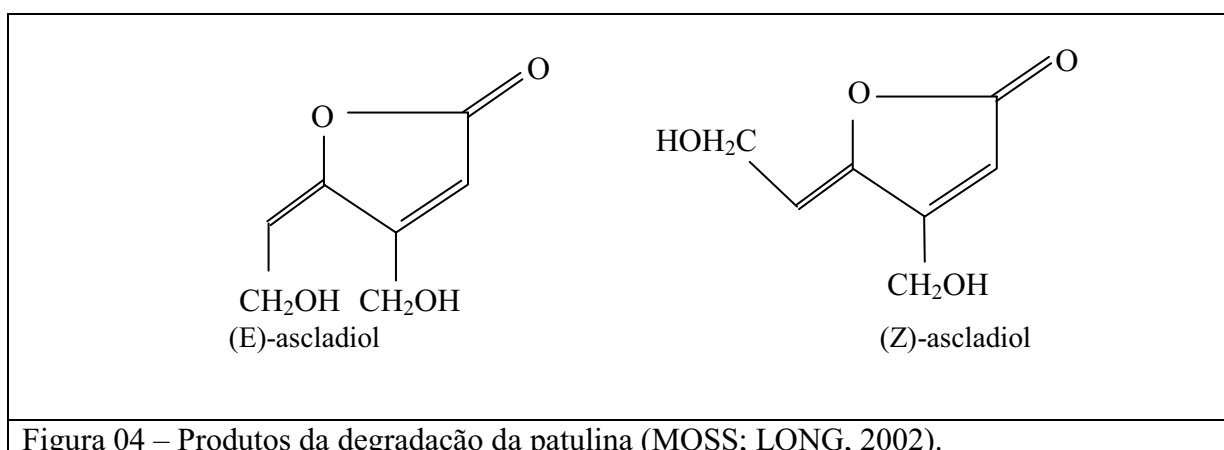
2.1.3.5 Degradação de patulina

Na indústria, o uso de conservantes durante o processamento de frutas se tornou uma necessidade para garantir a saúde dos consumidores por sua capacidade de preservar a qualidade dos produtos derivados (LEITÃO, 1990). A ação do metabissulfito é um fato comprovado, com vantagem na capacidade de degradar a patulina (ROSS, 1995). Além da degradação de patulina por compostos sulfurados, os estudos promissores mencionam outras alternativas com eventual utilidade, citando-se a remoção das partes deterioradas do fruto antes do processamento, porém pouco viável para as indústrias (CHERAGHALI *et al.*, 2005; SYDENHAM *et al.*, 1995), e detoxificação biológica efetuada pela microbiota presente no próprio fruto (HARWIG *et al.*, 1973; KARLOVSKY, 1999; ROSS, 1995; WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995).

Karlovsky (1999) citou a detoxificação de patulina por leveduras durante os processos fermentativos. Harwig *et al.* (1973) eliminaram a patulina submetendo o suco de maçã à fermentação de duas semanas por *Saccharomyces* spp. As leveduras destinadas à fabricação de sidras, constituídas de *S. cerevisiae* industriais, removeram eficientemente a patulina (BURROUGHS, 1977).

Stinson, Osman e Bills analisaram, em 1979, a solubilidade dos produtos da degradação da patulina ocasionado pelo processo fermentativo utilizando patulina marcada com ^{14}C . Encontraram pelo menos 6 diferentes produtos que migraram durante a cromatografia em camada delgada (CCD) além de um componente majoritário, imóvel. Relataram também a formação de pequena quantidade de CO_2 a partir da patulina.

Diferente de Stinson, Osman e Bills (1979) que haviam relatado a formação de CO_2 , Moss e Long (2002) verificam que não há formação de componentes gasosos pela degradação de patulina. Ao utilizar a patulina marcada com ^{14}C , estes últimos tinham como objetivo a caracterização melhor definida das condições sob as quais a *S. cerevisiae* degrada patulina e a identificação dos principais produtos da degradação. Todos os carbonos da molécula de patulina marcados foram rastreados nos produtos formados e concluíram que a degradação da patulina só ocorre quando o crescimento é anaeróbico, separando por CLAE um dos principais componentes formados, o (E)-ascladiol (Figura 04). Relataram traços de (Z)-ascladiol e outros componentes não caracterizados com massas moleculares inferiores, sendo que nenhum desses compostos era gasoso nem apresentavam volatilidade.



Stinson *et al.* (1978) projetaram um estudo para avaliar a persistência de patulina em suco de maçã durante a fermentação utilizando oito cepas de leveduras comerciais e três

diferentes processos para produção de sidra utilizados nos EUA, o Noroeste do Pacífico, que utiliza a adição de açúcar para dar início à fermentação, o da Califórnia que recebe adição de açúcar em duas etapas da fermentação e o Tradicional, sem adição de açúcar baseando-se na presença de açúcar do próprio suco. Somente duas cepas, pelo processo Tradicional, não foram capazes de remover patulina a um nível inferior a 50 µg/L. Visto que este último processo não é utilizado por indústrias, suspeita-se que a contaminação apresentada em sidras comerciais se dá por alguma modificação nas etapas de produção, como a diminuição do tempo de fermentação ou a adição de suco contaminado no fermentado.

Lipowska *et al.* (1990) examinaram a variação na concentração de patulina durante a produção de vinho de maçã, utilizando 12 mostos com presença de patulina. Após o término da fermentação a patulina não foi detectada e o tempo necessário para seu desaparecimento é curto, chegando a 48 horas do início da fermentação alcoólica. Avaliaram também a influência da sulfitagem do suco de maçã destinado à fermentação, mostrando que SO₂ conduz a uma eliminação de patulina no mosto, o que condiz com os achados de Sylos e Rodrigues-Amaya (1999).

Sumbu, Thonart e Bechet (1983) estudaram a ação da patulina sobre *S. cerevisiae* (cepa codificada como 1278b[α]) verificando a existência de inibição do crescimento da levedura, embora passageira, cuja duração é proporcional à concentração da toxina no meio. Demonstraram que existem dois momentos na ação da patulina em células de levedura: primeiro, a ação da toxina no metabolismo da levedura e a inibição subsequente de crescimento e, segundo, a retomada de crescimento indicando o aparecimento de um mecanismo de resistência provavelmente associado com o desaparecimento da micotoxina durante o processo fermentativo. Também observaram que a degradação de patulina por leveduras está associada a outro fator, um mecanismo de defesa do microrganismo e dependente da síntese de proteínas, uma vez que esta micotoxina não era degradada quando

adicionada simultaneamente com cicloheximida, um inibidor de síntese protéica, mas não foi concluído se essa proteína atua diretamente sobre a patulina ou se permite a síntese de uma substância responsável pela degradação. Da mesma forma, Celli (2006) verificou a degradação de patulina em suco de maçã pelo crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (LALVIN ICV D47). Ao cultivar a levedura em meio contendo 7µg de patulina/mL, observou que nas primeiras 19,5 horas, a toxina não foi degradada. Após esse período a toxina passou a ser eliminada, com velocidade de 0,078 µg/mL.h.

Considerando o efeito antagônico e degradador de *Pichia membranifaciens* e *Sporobolomyces roseus* na degradação de 588,4 para 290,0 µg de patulina (25°C/15 dias) em estudos preliminares (COELHO *et al.*, 2004; LEVY *et al.*, 2002), Coelho (2005) avaliou o efeito degradador de *Pichia ohmeri* 158 isolada de ecossistema natural (formigueiro) sobre patulina produzida por *P. expansum* toxigênico (107 µg patulina/mL). Para tanto, foi adicionado simultaneamente 223 µg de patulina e $3,0 \times 10^6$ células de *P. ohmeri* 158 em 25 mL de Caldo Extrato de Malte, seguido de quantificação da toxina aos 2, 5, 10 e 15 dias de incubação a 25°C por CLAE. A levedura reduziu em mais de 99% da toxina inicialmente adicionada após 15 dias de incubação.

Ricelli *et al.* (2007) determinaram o efeito degradador de patulina utilizando uma bactéria isolada de maçãs contaminadas, a qual foi identificada como *Gluconobacter oxydans*. Empregaram suco de maçã contaminado com 100µg de patulina/mL e inoculado com 10^5 células/mL, mantidos a 30°C sob agitação de 175rpm. Nestas condições obtiveram uma degradação de 91% da toxina em 72 horas.

Em 2008, Fuchs *et al.* avaliaram a remoção de patulina em meio líquido por trinta diferentes cepas de bactérias ácido lácticas. Utilizando CLAE com detecção de UV ou de fluorescência para determinação de toxina, encontraram que a cepa de *Bifidobacterium animalis* VM 12 foi eficaz na degradação de patulina.

2.1.3.6 Detecção e Quantificação de Patulina

Desde a descoberta de patulina, diferentes métodos vem sendo desenvolvidos com intuito de tornar a análise mais rápida e aumentar os níveis de detecção e quantificação (MOAKE; PADILLA-ZAKOUR; WOROBO, 2005). Atualmente, os métodos mais utilizados para quantificar patulina em produtos de fruta são baseados na separação da toxina por CLAE com detector UV. Este é o método oficial adotado pela AOAC para suco de maçã (método 995.10, AOAC, 2000) com um limite de quantificação de 5 µg/L. Neste método o suco é extraído 3 vezes com acetato de etila, seguidos de desidratação com sulfato de sódio. O solvente é evaporado sob fluxo de nitrogênio gasoso a 40°C e o resíduo deverá ser dissolvido em acetonitrila:água (10:90) no momento da análise em CLAE. A cromatografia líquida utiliza coluna C18 de fase reversa (5 µm, 250 x 4,6 mm) e detector UV fixado em 276nm. O sistema é isocrático, com fluxo de 1 mL/min e fase móvel acetonitrila:água (5:95). Utilizando esta técnica, Fernández-Trevejo, Verdes e Espinosa (2001 [01]) fizeram uma curva de calibração para validação da metodologia de detecção de patulina em sucos de maçãs e obtiveram a curva $y = 1952,5x + 1673,5$ com um coeficiente de correlação 0,9991. O limite de detecção foi 1,72 µg/L e o de quantificação, de 5,2 µg/L. O valor médio da recuperação de patulina obtido por esses autores foi de 82,51%, a partir de níveis de contaminação de 0,020, 0,050 e 0,100 µg/mL.

Sheu e Shyu (1999) desenvolveram uma técnica para extração de patulina de suco de maçã, a qual utilizava diálise combinada com derivatização e acilação seguida de confirmação por Cromatografia Gasosa (CG) e Espectrometria de Massas (EM). As amostras de suco de maçã adicionadas de 4-N,N-dimetilaminopiridina eram dialisadas usando cloreto de metano e anidrido acético nos tubos de diálise. A patulina era derivatizada em seu acetato e determinada utilizando CG e EM com o íon seletivo para monitorar a concentração. A curva de calibração apresentou linearidade entre 10 e 250 µg de patulina/L, e o limite de

quantificação foi 10 µg/L. Os níveis de patulina em sucos comerciais variaram de 0 a 107,2 µg/L com 77-109% de recuperação. A patulina foi detectada em 7 amostras das 10 analisadas. A técnica que combina extração de patulina por diálise e acilação demonstrou grande potencial podendo ser utilizada para extração de compostos em meio aquoso que necessitem derivatização antes da determinação.

Sewram *et al.* (2000) desenvolveram outro método para determinação de patulina, o qual empregou CLAE-EM-EM com monitoramento selecionado de reação (SMR - *selected reaction monitoring*) utilizando a pressão atmosférica e moléculas ionizadas (APCI - *atmospheric pressure chemical ionization*) como íons positivos e negativos. Este método que tem como princípio a indução da dissociação por colisão (CID) apresentou um coeficiente de correlação de 0,99 quando comparado aos resultados encontrados por CLAE, demonstrando sua aplicabilidade como uma nova ferramenta para análise de patulina em suco de maçã, mesmo em baixas concentrações, uma vez que quantificaram concentrações de 4µg/L.

Gökmen e Acar (1999) descreveram um método simultâneo para determinação de hidroximetilfurfural (HMF) e patulina em sucos de maçã. A toxina foi extraída com acetato de etila e passou por coluna de clarificação (sílica mais carbonato de sódio) para remoção de interferentes e da umidade. O HMF e a patulina foram determinadas por CLAE de fase reversa usando coluna C18 e detector diodo. A fase móvel utilizada foi acetonitrila – água (99:1, v/v) e fluxo de 1,0 mL/min. A taxa de recuperação do HMF variou de 86% a 100%, obtendo média de 94%, e a da patulina variou de 94% a 125% com média de 103%. Os limites de detecção foram menores que 0,01 mg/L para HMF e que 5 µg/L para patulina.

No ano seguinte, Shephard e Leggott (2000) revisaram os métodos analíticos disponíveis para determinação de patulina em fruta e sucos de fruta. Dentre eles, CLAE com detector UV e com detector diodo, Cromatografia Gasosa e Cromatografia em Camada Delgada. O método de escolha foi o CLAE, por ser mais rápido e seguro, e por ter aplicação a

diversas amostras. Os autores apontaram que futuramente métodos mais sensíveis serão necessários para confirmação de níveis mais baixos de patulina, os quais serão, provavelmente, o emprego de espectrometria de massas e o desenvolvimento de anticorpos patulina-específicos. Moake, Padilla-Zakour e Worobo (2005) complementaram as conclusões de Shephard e Leggott (2000), que há anos não existem novos métodos para quantificação da toxina, sendo que os existentes exigem operadores treinados para manusear materiais e equipamentos, sugerindo que o desenvolvimento de um método rápido e “caseiro” seria extremamente benéfico para a indústria.

Em 2005, Boonzaaijer, Bobeldijk e Van Osenbruggen desenvolveram um método analítico seguro para determinação e quantificação de patulina utilizando técnicas convencionais, disponível à maioria dos laboratórios. O método que utiliza CLAE com detector diodo, é aplicável a sucos de maçã e outros produtos mais sólidos. A separação da micotoxina se deu pela adição de hidroximetilfurfural (HMF), obtendo limite de quantificação de 25µg/L ou 25µg/Kg e um grau de recuperação de 87% para sucos de maçã. Os pesquisadores afirmam que este método tem sensibilidade para ser utilizado no controle de qualidade, uma vez que a União Européia estabelece um máximo de 50µg de patulina/L, porém, não pode ser utilizada para alimentos infantis, no qual é permitido um máximo de 10µg de patulina/L.

Silva, Schuch e Jabolnski (2007) descreveram um método rápido para separação e identificação de 5-hidroximetilfurfural (HMF) e patulina em sucos de maçã através de cromatografia eletrocínética capilar micelar (MECC), empregando dodecil sulfato de sódio (SDS) como surfactante. A separação foi feita usando o Instrumento de Eletroforese Capilar 3D (Hewlett-Packard-Stras-se 8,D-76337) equipado com detector UV. Nas condições otimizadas (tampão SDS:borato 50:50), encontraram melhor efeito na resolução do analito e no seu tempo de migração quando era aplicada a voltagem de 9Kv. Obtiveram boa separação

na linha de base entre o HMF e a patulina e limites de detecção de 30 µg/L e 9 µg/L, respectivamente, mostrando ser um método útil para um amplo intervalo de concentração de HMF e de patulina em sucos de maçã, sem nenhuma desvantagem em relação ao método oficial.

Em 2009, Cunha, Faria e Fernandes validaram um método para quantificação de patulina por cromatografia gasosa e espectrometria de massa utilizando patulina comercial marcada $^{13}\text{C}_{5-7}$. O método foi baseado na extração da toxina com acetato de etila – hexano seguidas de alcalinização e sililação com N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida e 1% de trimetilcloro-silano. Os limites de detecção e quantificação foram 0,4 e 1,6 µg/Kg, respectivamente. O método obteve sucesso quando aplicado a frutas, sucos, sidras e alimentos para bebê.

No mesmo ano, a validação de um método de CCD para detecção e quantificação de patulina foi realizada por Welke *et al.* (2009[1]). Com os valores de recuperação e limite de quantificação alcançados de 95% e 14 µg/L, respectivamente, concluíram que este método foi sensível o suficiente para ser utilizado como monitoramento por indústrias processadoras de maçã ou acompanhamento por órgãos do governo, com a vantagem de ser mais barato e de fácil realização.

WU *et al.* (2009) estudaram três métodos para extração de patulina, líquido-líquido, dispersão de matriz em fase sólida e a extração em fase sólida. Concluíram que a extração por dispersão de matriz em fase sólida foi a mais eficiente, a qual utiliza acetato de etila, metanol, diclorometano e hexano para extração de patulina, seguida de limpeza da amostra em coluna de sílica C_{18} e desidratação do eluato. As taxas de recuperação da toxina utilizando este método de extração foram de 79,68 à 94,32%.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biodegradação de patulina, empregando compostos bioativos obtidos de uma levedura de interesse industrial (*Saccharomyces cerevisiae* ICV D47), assim como proceder à concentração, purificação e caracterização bioquímica do composto bioativo envolvido no processo de degradação contribuindo para o estudo da qualidade de derivados de maçã.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a metodologia de análise de patulina presente em maçã e seus produtos por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Quantificar a patulina presente em podridões de maçãs e tecido não afetado do fruto, verificando a capacidade da toxina migrar para o tecido sadio.
- Determinar a cinética de degradação da patulina pelo processo de fermentação.
- Produzir composto bioativo com capacidade de degradar patulina por meio de processo fermentativo empregando leveduras de interesse industrial;
- Extrair o composto do meio de cultivo, separando a biomassa do sobrenadante;
- Comprovar a atividade detoxificante do composto bioativo no extrato bruto avaliando a remoção da toxina de sucos contaminados.
- Isolar, purificar e caracterizar o composto bioativo, empregando equipamentos e técnicas analíticas.
- Estudar a estabilidade do composto bioativo isolado e purificado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Foi utilizada a cepa toxigênica *P. expansum* n° 2 produtora de patulina isolada de maçã cultivar Gala para produção de patulina empregada nos experimentos (LEVY; HIROOKA, 1999). Este microrganismo, proveniente de cultura monospórica (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983), foi mantido em Ágar Batata Dextrose-BDA inclinado a 4°C na ausência de luz e usado como cultura estoque. Desta, quando necessário, foi recuperado em ágar Extrato de Malte-AEM inclinado a 21°C/5 dias e padronizado (10^5 esporos/mL).

Foi usada a cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN ICV D47 (LALVIN[®], Canadá) usualmente utilizada para produção de sidras. Esta cepa foi utilizada para degradação de patulina pelo processo fermentativo e obtenção do composto bioativo com capacidade detoxificante por ter apresentado maior atividade degradadora (CELLI *et al.*, 2005).

4.2 PATULINA PADRÃO E REAGENTES QUÍMICOS

Nas análises de quantificação de patulina foi utilizada como padrão de comparação patulina com 99,0% de pureza (SIGMA, USA) e os reagentes químicos de grau cromatográficos. Nas demais análises foram utilizados reagentes de grau P.A.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO

Foram dissolvidos 5 mg da película de patulina padrão (SIGMA[®]) em 1 mL de clorofórmio, subdivididos em cinco frascos (200 µL), secos com gás N₂ e estocados a -20°C. Para quantificação do padrão, a película de um dos frascos citados foi suspensa em etanol e quantificada a 275 nm em espectrofotômetro Cintra 20 (AOAC, 2000). Uma fração seca do

padrão calibrado (1000 µg) foi suspensa em acetonitrila:água (1:9) e diluída para construção de uma curva de calibração, de 0,020 a 0,350 µg/mL de patulina.

4.4 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA

O desempenho da metodologia para extração de patulina, utilizado nas condições de laboratório, foi avaliado por meio da determinação da recuperação, limite de detecção e de quantificação (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1998; IHA; SABINO, 2008).

O limite de detecção foi calculado como sendo a menor concentração da substância na amostra que pode ser diferenciada de zero (7 leituras). Para isso, foram utilizadas concentrações de patulina próximas ao menor ponto da curva padrão (0,010 µg/mL) e o limite de quantificação foi determinado multiplicando por 2 vezes o limite de detecção (IHA; SABINO, 2008).

A recuperação foi avaliada em triplicata pela adição de 50, 100 e 150 µg de patulina/L de suco de maçã, seguidos de extração, limpeza e quantificação.

4.5 PRODUÇÃO DE PATULINA

Para produção de patulina, empregada nos experimentos, foi inoculando uma alíquota de 10^5 esporos/mL de *P. expansum* em 10 Erlenmeyers de 250 mL com 25 mL de Caldo Extrato de Malte pH 4,4 (extrato de malte 0,6%, dextrose 0,6%, maltose 0,18%, extrato de levedura 0,14%) a 25°C/15 dias. O filtrado do meio de fermentação submersa foi extraído por três vezes com 25 mL de acetato de etila. Os extratos foram misturados perfazendo um volume total de 75 mL e desidratados com 30 g de sulfato de sódio anidro por 30 min. O extrato desidratado foi filtrado e evaporado a 40°C até atingir aproximadamente 25 mL e introduzido na coluna de limpeza (500 x 10 mm, com 8,5 g de sílica gel 60G, 70-230 mesh, SIGMA) previamente condicionada (24hs com álcool e 24hs com acetato de etila a 5°C). A

seguir procedeu-se a eluição com 75 mL de benzeno-acetato de etila (75:25) e o eluato foi evaporado a 40°C até atingir aproximadamente 5 mL, sendo seco sob fluxo de gás N₂ (AOAC, 2000). A patulina produzida foi quantificada por CLAE e utilizada para as análises de cinética de degradação.

4.6 EXTRAÇÃO DE PATULINA DOS FRUTOS CONTAMINADOS

Trinta e cinco maçãs da cultivar Fuji apresentando diferentes graus de deterioração foram coletadas do comércio local, pesadas, separadas as podridões e calculadas as porcentagens de deterioração do fruto relacionando peso/peso. Os tecidos deteriorados e os tecidos sadios (correspondendo à circunferência ao redor da lesão, tendo 2cm de espessura) foram triturados e homogenizados com auxílio de almofariz e coletada uma alíquota de 10 g, submetida a três extrações com 10 mL de acetato de etila. Os extratos foram misturados perfazendo um volume total de 30 mL e desidratados com 5 g de sulfato de sódio anidro por 30 min. O extrato desidratado foi filtrado e evaporado sob vácuo a 40°C até atingir um volume menor ou igual a 10 mL, ajustado seu volume para exatamente 10 mL e introduzido na coluna de limpeza (80 x 15 mm, com 1,5 g de sulfato de sódio anidro e 3,5 g de sílica gel 60G, 70-230 mesh, SIGMA). A seguir foi coletada uma fração de 2 mL do eluato, seca a 40°C sob fluxo de gás N₂ e armazenada a -20°C (AOAC, 2000).

4.7 EXTRAÇÃO DE PATULINA DE SUCOS FERMENTADOS

Alíquotas de 10 mL da amostra foram submetidas a três extrações com 10 mL de acetato de etila. Os extratos foram misturados perfazendo um volume total de 30 mL e desidratados com 5 g de sulfato de sódio anidro por 30 min. O extrato desidratado foi filtrado e evaporado sob vácuo a 40°C até atingir um volume menor ou igual a 10 mL, ajustado seu volume para exatamente 10 mL e introduzido na coluna de limpeza (80 x 15 mm, com 1,5 g

de sulfato de sódio anidro e 3,5 g de sílica gel 60G, 70-230 mesh, SIGMA). A seguir foi coletada uma fração de 2 mL do eluato, seca a 40°C sob fluxo de gás N₂ e armazenada a -20°C (AOAC, 2000).

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PATULINA

O resíduo obtido na extração de patulina foi redissolvido com 500 µL de acetonitrila/água (1:9) e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (forno Dionex STH 585, bomba Jasco PU 980 e detector UV Jasco-UV 975). Cem microlitros do resíduo redissolvido foram aplicados em sistema isocrático de fase reversa utilizando coluna C₁₈ (5 µm, 250 x 4,6 mm I.D., Dionex 201 SP™ VYDAC), previamente equilibrada com acetonitrila/água (5:95). A eluição foi conduzida a fluxo de 1,5 mL/min. a 30°C, procedendo-se ao monitoramento da fração eluída a 275 nm (KAWASHIMA; VALENTE SOARES; MASSAGUER, 2002). Nestas condições a patulina apresentou tempo de retenção de 5,6 min.

A patulina foi quantificada por comparação entre a área dos picos das amostras e a área dos picos de concentrações conhecidas do padrão da toxina (0,010; 0,020; 0,035; 0,050; 0,100; 0,200; 0,250 e 0,350 µg/mL).

4.9 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA

Maçãs da cultivar Fuji, selecionadas e lavadas, foram processadas em centrífuga de frutas Walita[®] de pequeno porte para obtenção do suco de maçã, utilizado como mosto de fermentação. Para remoção da pectina foram adicionadas enzimas pectinolíticas (Pectinex[®] 100L, 3 g/hL) e mantidas em banho-maria a 45°C por duas horas, e o sobrenadante límpido foi trasfegado, constituindo-se no mosto para fermentação.

Saccharomyces cerevisiae (LALVIN ICV D47) foi cultivada em 10 tubos de 25 mL contendo 20 mL de suco de maçã contaminado com 5,0 µg de patulina/mL (SUMBU; THONART; BECHET, 1983). O inóculo consistiu de 0,25 g de levedura seca ativa/L de suco de maçã (correspondente a $1,8 \cdot 10^7$ células/mL) e o sistema foi incubado a 25°C sem agitação para promover o metabolismo fermentativo, durante 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 64, 72, 96 e 120 horas. Todos os tubos estavam adaptados com uma mangueira para saída do gás produzido, a qual era mergulhada em um recipiente contendo uma solução de metabissulfito de sódio (3%) para impedir a entrada de oxigênio e microrganismos contaminantes. Tubos contendo suco e toxina serviram como controle da degradação de patulina por componentes do suco e do efeito do tempo.

Os resultados foram obtidos perfazendo três repetições, cada uma constituída de onze dados (0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 64, 72, 96 e 120 horas) para a concentração de patulina no fermentado.

4.10 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO CONTENDO O COMPOSTO BIOATIVO

A obtenção do extrato bruto foi realizada em duas etapas. A primeira consistiu no crescimento da levedura em meio contendo patulina para induzir a produção do composto bioativo. Desta forma, foram adicionados 0,25g de levedura seca ativada/L provendo um inóculo de aproximadamente $1,8 \times 10^7$ células/mL em um Erlenmeyer contendo 250 mL de Caldo MPL e patulina (3 µg/mL), com incubação a 25°C por 48 horas sem agitação. Decorridas 48 horas, foram separadas assepticamente as células do meio de cultivo contendo a toxina por centrifugação. A segunda etapa consistiu na obtenção do composto bioativo sem a presença de patulina, cultivando a levedura condicionada a produzir o composto bioativo em meio sem toxina. Nesta etapa foi adicionada a biomassa obtida na primeira fase em Erlenmeyer contendo 50 mL de caldo Meio para Levedura isenta de toxina com incubação a

25°C por 48 horas sem agitação. Após esse período o fermentado foi centrifugado, o sobrenadante foi coletado e submetido a filtração esterilizante por membrana (Durapore 0,22U de poro, Millipore[®]) consistindo no extrato bruto.

O inóculo foi baseado na escala de MacFarland, cuja enumeração de 1 a 10 corresponde a faixa de 3×10^8 a 3×10^9 células/mL, respectivamente, para contagem bacteriana (ITAL, 1995). Para a padronização do inóculo de leveduras, a mesma escala foi adaptada recalculando-se a contagem, obtendo-se os valores de 3×10^7 (escala nº1) a 3×10^8 (escala nº10) leveduras/mL, considerando-se que o tamanho de uma levedura seja equivalente a 10 vezes ao bacteriano (LEVY; HIROOKA, 1999)

4.11 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO EXTRATO BRUTO

Em 7 tubos de ensaio estéreis foram adicionados 5 mL de extrato bruto (pH 3,5) e 15 µg de patulina, obtendo concentração de 3 µg da toxina/mL. Os tubos foram incubados a 25°C e analisados após 0, 16, 24, 32, 48, 72 e 96 horas, quanto à porcentagem de toxina degradada (MOSS; LONG, 2002). Tubos contendo suco despectinizado estéril e toxina serviram como controle da degradação de patulina por componentes do suco e do efeito do tempo. As análises foram realizadas em triplicata, e foi utilizada a média aritmética dos 3 resultados obtidos para cada tempo.

4.12 OBTENÇÃO DO EXTRATO DIALISADO CONTENDO O COMPOSTO BIOATIVO

Uma alíquota de 50 mL do extrato bruto estéril foi dialisada sob refrigeração (4°C) por 72 horas em becker contendo 1 L de água destilada utilizando membranas de diálise de celulose regenerada da Spectra/Por com um ponto de corte (MWCO) de 8000-10000 Da, trocando-se a água a cada 8 horas, visando a eliminação de açúcares, peptídeos e proteínas de

baixa massa molecular, sendo então coletada a fração retida no interior da membrana dialisadora. Esta fração foi chamada de extrato dialisado e utilizada para testes de avaliação da cinética de degradação de patulina.

O experimento foi realizado por duas vezes para obtenção de um volume suficiente para análises subseqüentes, sendo misturadas as duas frações dialisadas, totalizando um volume aproximado de 100 mL.

4.13 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO DIALISADO

Em 6 tubos de ensaio estéreis foram adicionados 5 mL de extrato dialisado e 15 μ g de patulina, obtendo concentração de 3 μ g de patulina/mL. Os tubos foram incubados a 25°C e analisados após 0, 16, 24, 32, 48 e 72 horas, quanto à porcentagem de toxina degradada (MOSS; LONG, 2002). Os resultados foram obtidos perfazendo três repetições, cada uma constituída de seis dados para a concentração de patulina no extrato dialisado e utilizada a média aritmética dos 3 resultados obtidos para cada tempo.

4.14 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTO BIOATIVO POR ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração do extrato bruto foi realizada em cuba de agitação Millipore, Modelo 8400, 400 mL, diâmetro 76mm utilizando membrana Millipore ultracel amicon YM100, membrana de celulose regenerada, de 10.000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit - Limite Nominal de Peso Molecular), 76mm, a 5°C sendo o sistema pressurizado com gás nitrogênio. Dois litros de extrato bruto foram ultrafiltrados em alíquotas de 400 mL até obtenção de um volume de 30 mL, e diluídos com água ultrapura até 400 mL. Este processo foi repetido para uma maior remoção de açúcar. O volume final obtido para cada alíquota de

extrato bruto (400 mL) foi de 10 mL, totalizando 50 mL de extrato ultrafiltrado, o qual foi armazenado a -20°C.

4.15 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO ULTRAFILTRADO

Para avaliação da cinética de degradação de patulina pelo extrato ultrafiltrado, 5 tubos de ensaio estéreis contendo 9,75 mL de água ultrapura e 0,25 mL de extrato ultrafiltrado foram adicionados de 30 µg de patulina (3 µg de patulina/mL). Os tubos em triplicata foram incubados a 25°C e analisados após 0, 16, 24, 32 e 48 horas para determinação da porcentagem de toxina degradada (MOSS; LONG, 2002). Os resultados foram obtidos pela média aritmética dos 3 resultados para cada tempo.

4.16 ELETROFORESE DO EXTRATO ULTRAFILTRADO EM CONDIÇÕES DESNATURANTES E NÃO DESNATURANTES

A eletroforese das proteínas presentes nas amostras de extrato ultrafiltrado foi feita em gel de poli(acrilamida) na ausência de SDS (condições não desnaturantes). O gel foi preparado na concentração de 12,5% (água, acrilamida, tampão tris 1,5 M pH 8,8, persulfato de amônia, TEMED). O gel de empilhamento era constituído de acrilamida 4% (água, acrilamida, tampão tris 0,5 M pH 6,8; persulfato de amônia, TEMED) (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi realizada em géis de 12x12cm em cuba tipo “*Hoefler SE 600 Ruby*” da Amersham Biosciences.

Para análise de proteínas sob condições desnaturantes foi adicionado SDS (SDS-PAGE 10%) tanto na formulação do gel, como no gel de empilhamento e no tampão de corrida segundo metodologia descrita por Schagger e Von Jagow (1987).

4.16.1 Rastreamento e isolamento do composto bioativo por eletroforese

O isolamento do composto bioativo foi realizado por eletroforese em condições não desnaturantes com o extrato ultrafiltrado. Após a corrida, parte do gel foi corada com nitrato de prata para identificação das bandas protéicas e cálculos dos respectivos Rfs (fator de retenção, do inglês, *retention factor*), os quais são baseados na relação entre a distância percorrida por cada amostra e aquela percorrida pela frente de migração. A outra parte do gel foi recortada seguindo as bandas dos Rfs obtidos para extração dos compostos presentes; macerado e adicionado de 1 mL de água ultrapura contendo 3 µg de patulina para cada. O pH foi corrigido com ácido clorídrico 0,01N até 5 e mantido a 25°C por 24hs.

$$Rf = \frac{DP \text{ (distância entre o depósito e a banda protéica)}}{DT \text{ (distância entre o depósito e a frente de migração)}}$$

A quantidade de amostra adicionada em cada depósito do gel de eletroforese foi de 30µL e, como foram recortadas as bandas protéicas de 10 depósitos, totalizaram 300µL de amostra.

4.16.2 Determinação do Rf (fator de retenção) em condições desnaturantes

A determinação do Rf em condições desnaturantes foi necessária para identificação da banda de interesse nas análises subseqüentes como a estimativa da massa molecular e ponto isoelétrico. Essa determinação foi realizada segundo descrito no item 4.16.

4.17 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO COMPOSTO BIOATIVO

4.17.1 Eletroforese em SDS-PAGE para avaliação da pureza do composto bioativo e determinação da massa molecular

As amostras coletadas da eletroforese sob condições não desnaturantes foram analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante segundo LAEMMLI (1970). Para a revelação do gel foi utilizado o método com o reagente nitrato de prata de acordo com BLUM; BEIER; GROSS (1987).

A massa molecular do composto foi estimada através da curva padrão obtida pela inserção em gráfico do logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão contra seu fator de retenção (R_f) e posterior regressão linear. Para isso, as proteínas utilizadas como marcadores de massa molecular (marcador de baixa massa molecular GE, α -lactalbumina (14,4kDa), Inibidor de tripsina (20,1kDa), Anidrase carbônica (30kDa), Ovalbumina (45kDa), Albumina (66kDa), e Fosforilase b (97kDa)) foram depositadas no gel de eletroforese paralelamente ao composto estudado.

4.17.2 Focalização isoeétrica e determinação do ponto isoeétrico (eletroforese 2D) do composto bioativo

O ponto isoeétrico do composto foi determinado utilizando a focalização isoeétrica (IEF – PAGE) pelo sistema Ettan IPGphor II (Amersham Bioscience), conduzido em uma tira contendo gradiente imobilizado de pH linear de 3,0-10,0 em gel de poliacrilamida (7 cm) contendo anfólitos (Pharmalito – 0,5%), seguindo as instruções do fabricante que consistiu numa prévia hidratação do gel (60 μ L de amostra e 65 μ L de tampão de reidratação) durante 16hs e a passagem de corrente elétrica durante 4hs (500V/1h, 1000V/1h e 8000V/2hs) a 20°C. Uma vez terminada a focalização, os géis foram incubados com solução de equilíbrio

contendo ditioneitol (DTT) por 30 min e em solução de equilíbrio contendo iodoacetamida por mais 30min. Após essas incubações a tira de gel foi posicionada horizontalmente no topo do gel SDS-PAGE 8x10cm e selada com gel de agarose. Após a corrida, as bandas do gel foram visualizadas pela coloração com nitrato de prata.

4.17.3 pH de máxima atividade do composto bioativo

O pH de máxima atividade do composto bioativo foi realizado em 5 tubos de ensaio contendo 8 mL de água ultrapura, 0,5 mL do extrato ultrafiltrado e, uma vez que os alimentos derivados de maçã possuem caráter ácido, foram acidificados com solução de ácido clorídrico 0,01N até os valores de pH de 2, 3, 4, 5 e 6, ajustado seu volume para 10 mL com água ultrapura e adicionados de 30 µg da toxina (3 µg/mL). Após 24 horas de incubação a 25°C as amostras foram submetidas a extração e quantificação de patulina. gua ultrapura estéril acidificada e adicionada de patulina serviu de controle. As análises foram realizadas em triplicata e utilizadas as mdias aritméticas.

4.17.4 Temperatura de máxima atividade degradadora do composto bioativo

A temperatura de máxima atividade foi testada em 7 tubos de ensaio contendo 9,5 mL de água ultrapura e 0,5 mL do extrato ultrafiltrado adicionados de 30 µg da toxina (3 µg/mL) e armazenados por 16 horas nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C. Após período de incubação as amostras foram submetidas à extração e quantificação de patulina. gua ultrapura e estéril adicionada de toxina serviu de controle. As análises foram realizadas em triplicata e utilizadas as mdias aritméticas.

4.17.5 Estabilidade térmica do composto bioativo a 80°C

A estabilidade térmica foi avaliada à temperatura de pasteurização utilizada na indústria processadora de maçãs de 80°C por 20 min.

Um tubo de ensaio contendo 9,5 mL de água ultrapura e 0,5 mL do extrato ultrafiltrado foi submetido a 80°C por 20 min, o qual foi rapidamente resfriado em água corrente, adicionado de 30 µg da toxina (3 µg/mL) e mantido por 16 horas em incubação a 25°C e, então, realizada a extração e quantificação de patulina. Água ultrapura e estéril adicionada de toxina serviu de controle. A análise foi realizada em triplicata e utilizada a média aritmética.

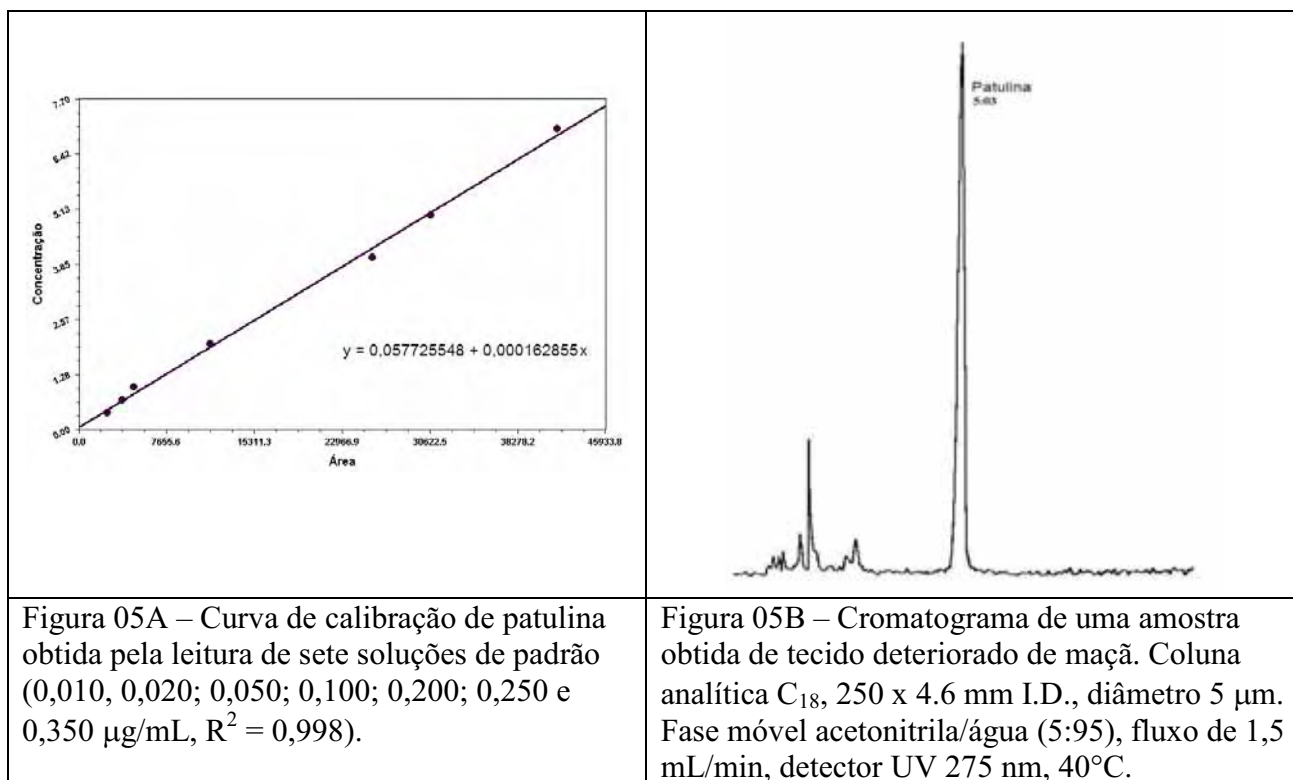
4.17.6 Determinação de carboidratos

A determinação de açúcares totais foi realizada pelo Método de fenol sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA PATULINA

Na Figura 05A estão apresentadas a curva de calibração e a equação de regressão que relaciona as áreas médias de cada pico calculadas por integração eletrônica e a concentração de patulina no intervalo de 0,010 a 0,350 $\mu\text{g/mL}$, com um coeficiente de correlação linear de 0,998. Nas condições de trabalho, o tempo de retenção da patulina foi de 5:03 minutos, como pode ser observado na Figura 05B.



O limite de detecção foi determinado como sendo a menor concentração da substância na amostra que pode ser diferenciada de zero (7 leituras). Para isso, foram utilizadas concentrações de patulina próximas ao menor ponto da curva padrão, que foi de 4,3 $\mu\text{g/L}$. O limite de quantificação foi determinado multiplicando por 2 vezes o limite de detecção, resultando 8,6 $\mu\text{g/L}$. O desvio padrão de 1,4 foi calculado utilizando 7 leituras desta

última concentração. Estes dois valores de limites são suficientes para o objetivo deste estudo e estão abaixo de 20 µg/L como sugerido pela *Association of Official Analytical Chemists – AOAC* (2000).

Na Tabela 03 estão apresentados os resultados da determinação dos teores de patulina em sucos de maçãs artificialmente contaminados, sendo estabelecidas as taxas de recuperação, com um valor médio de 86,24% ± 2,72, semelhante aos resultados obtidos por Fernández-Trevejo, Verdes e Espinosa (2001, [01]).

Tabela 03. Taxa de recuperação de patulina adicionada em suco de maçã.

Substrato	Patulina (µg/L)		Recuperação (%)	Coeficiente de Variação (%)	Média Recuperação (%)*
	Adicionada	Recuperada*			
Suco de maçã	50	42,03 ± 1,73	84,06	4,11	86,24 ± 2,72
	100	85,37 ± 4,21	85,37	4,93	
	150	133,93 ± 7,74	89,29	5,78	

*média aritmética ± desvio padrão

A curva de calibração para validação da metodologia de detecção de patulina em sucos de maçãs realizada por Fernández-Trevejo, Verdes e Espinosa (2001, [01]), resultou na equação $y = 1952,5x + 1673,5$ com um coeficiente de correlação 0,9991. O limite de detecção foi 1,72 µg/L e o de quantificação, de 5,2 µg/L. O valor médio da recuperação de patulina obtido por esses autores foi de 82,51%, a partir de níveis de contaminação de 0,020, 0,050 e 0,100 µg/mL. Em 2008, Iha e Sabino obtiveram um grau de recuperação de patulina em suco de maçã de 81,1% com desvio padrão de 7,7% e em bebida de soja contendo suco de maçã de 73,7% com desvio padrão de 1,8%, tendo a curva de calibração um coeficiente de correlação linear de 0,9999 e os limites de detecção e de quantificação foram de 3 µg/L e 7 µg/L.

5.2 PRODUÇÃO DE PATULINA

A quantidade de toxina obtida pelo crescimento de *P. expansum* n° 2 foi de 26750 µg (107 µg de patulina/mL) quando cultivado em Caldo Extrato de Malte pH 4,4 a 25°C/15 dias.

Em 1974, Sommer *et al.* avaliaram a toxigenicidade de diferentes cepas de *P. expansum* isoladas de maçãs e encontraram valores de 10 a 950 µg de patulina/mL quando cultivados a 22-24°C por 21 dias em caldo batata dextrose. Ross *et al.* (1998) encontraram uma toxigenicidade de 6,4 µg de patulina/g para *P. expansum* cepa NRRL 1172 quando cultivada em maçã a 4°C por 90 dias. Hasan (2000) obteve máxima produção de toxina por *P. expansum* quando era cultivado em meio glicose-Czapek's-maçã a 20°C por 15 dias, resultando numa toxigenicidade de 5,2 µg de patulina/mL. HE *et al.* (2009) utilizaram suco de maçã e *P. expansum* P99418 isolado de maçãs infectadas com fungo azul para produção de patulina. Inoculando o suco com 10⁶ esporos/mL, conseguiram uma produção máxima de 21,9 mg de patulina em 50 mL (0,438 mg/mL) quando cultivados durante 10 dias sem agitação a 25°C.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE PATULINA EM MAÇÃS CONTAMINADAS

O fungo contaminante de maior importância em maçãs é o gênero *Penicillium*, uma vez que é detectado com maior frequência em todas as etapas do cultivo, causando podridões no fruto (DOMBRINK-KURTZMAN; BLACKBURN, 2005). *P. expansum* é considerado o principal patógeno das lesões do fruto e causa podridão de coloração azul na parte externa da maçã, sendo sua forma esporulada, e de cor bege ou marrom-clara no tecido, deixando o fruto aguado e mole (HEFNAWY; ABOU-ZEID, 2003).

Neste experimento foi realizada a quantificação de patulina em 35 maçãs *in natura*, das quais 32 mostraram-se positivas, com níveis variando de 1,01 a 120,4 mg/Kg no tecido deteriorado. Os teores de patulina encontrados no tecido sadio próximo à lesão de 31 amostras variaram de 20 a 5020 µg/Kg, sendo 20 µg/Kg considerado traços, e em 4 amostras não foram detectados. Destas, a amostra 4 apresentou patulina na lesão e concentração não detectada (abaixo do limite de detecção) no tecido sadio próximo (Tabela 04). Estes resultados estão de

acordo com Beretta *et al.* (2000), que encontraram a toxina em 80,7% dos 26 frutos analisados em concentrações máximas de 113.343 mg de patulina/Kg de tecido deteriorado.

A média da concentração de patulina apresentou-se elevada mesmo quando as porcentagens de podridão dos frutos eram pequenas (Tabela 04).

Tabela 04. Concentração de patulina em podridões e áreas não afetadas de maçãs.

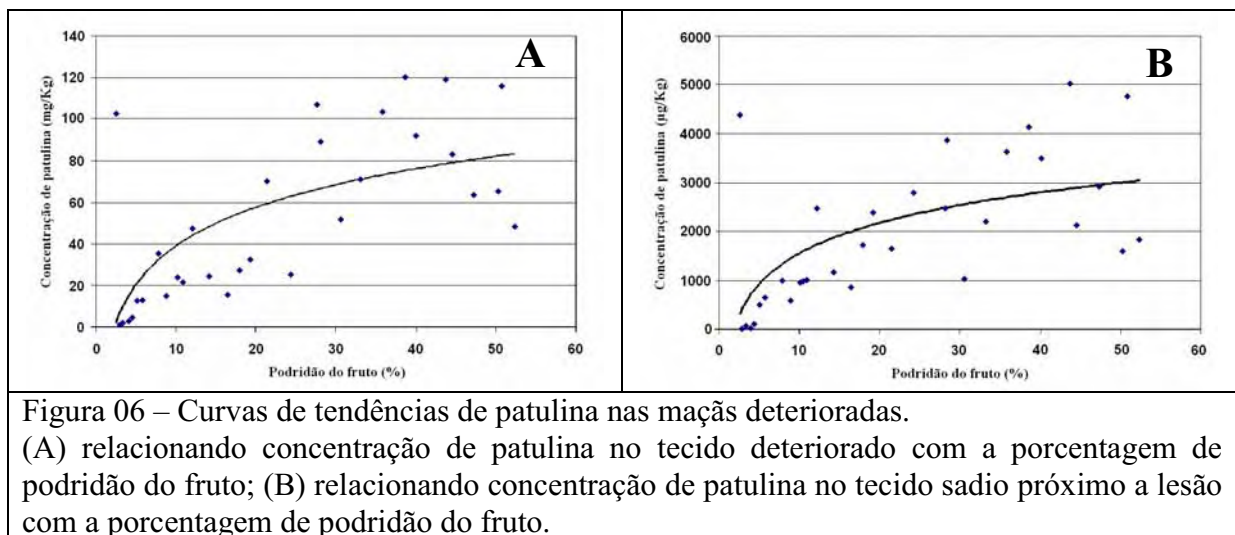
Amostras	Áreas deterioradas (%)	Concentração de patulina	
		Área deteriorada (µg/Kg)	Área não afetada** (µg/Kg)
1	2,5	102400	4380
2	3,0	1380	20
3	3,2	2120	130
4	3,9	1010	nd*
5	4,0	2860	30
6	4,1	nd*	nd*
7	4,5	4360	150
8	5,2	12700	530
9	5,8	13100	660
10	7,8	35200	970
11	8,9	15330	580
12	10,2	23800	950
13	10,8	21600	1010
14	12,0	47600	2480
15	14,2	24560	1150
16	16,2	nd*	nd*
17	16,4	15700	890
18	17,9	27430	1730
19	19,2	32550	2370
20	21,4	70380	1620
21	24,2	25150	2790
22	27,5	107300	3810
23	27,5	nd*	nd*
24	28,1	89320	2470
25	30,6	51740	1030
26	33,1	71360	2180
27	35,7	103410	3620
28	38,6	120400	4130
29	40,1	92180	3480
30	43,7	118800	5020
31	44,5	83400	2110
32	47,3	63420	2920
33	50,3	65180	1600
34	50,8	115650	4770
35	52,3	48220	1850

* nd: não detectado

** circunferência ao redor da lesão (2cm de espessura).

Considerando as propriedades hidrossolúveis da patulina, as porções sadias dos frutos imediatamente ao redor do foco de infecção, sem alteração na coloração e textura, foram analisadas para avaliar a capacidade migratória para o tecido não deteriorado.

No tecido sadio detectaram-se concentrações preocupantes desta substância, que atingiram 5020 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de tecido (Tabela 04), acima do limite estabelecido pela FDA de 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (RICHARD *et al.*, 2003). Essas concentrações de patulina detectadas no tecido sadio apresentaram-se crescentes com o aumento no diâmetro da podridão (Figura 06 A). Os frutos com grande porcentagem de podridão e menores concentrações de toxina também apresentaram proporção nas concentrações de toxina na porção sadia ao redor (Figura 05 B).



Esses resultados concordam com Rychlik e Schieberle (2001) que avaliaram a capacidade migratória da toxina em maçãs, encontrando concentrações de patulina em porções de até 4cm de distância da lesão, sendo essas com valor menor que 6×10^{-5} μg de patulina/g de tecido sadio.

5.4 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA PELO PROCESSO FERMENTATIVO

A patulina em bebidas fermentadas não deve ser detectável, uma vez que as leveduras fermentativas produzem, sob condições anaeróbias e por indução, uma proteína capaz de degradar a toxina (LIPOWSKA *et al.*, 1990; STINSON *et al.*, 1978).

Na Tabela 05 são apresentados os resultados (média aritmética de 3 quantificações) de um experimento conduzido com suco de maçã ao qual foi adicionada patulina e *Saccharomyces cerevisiae* para avaliar a cinética de degradação de patulina.

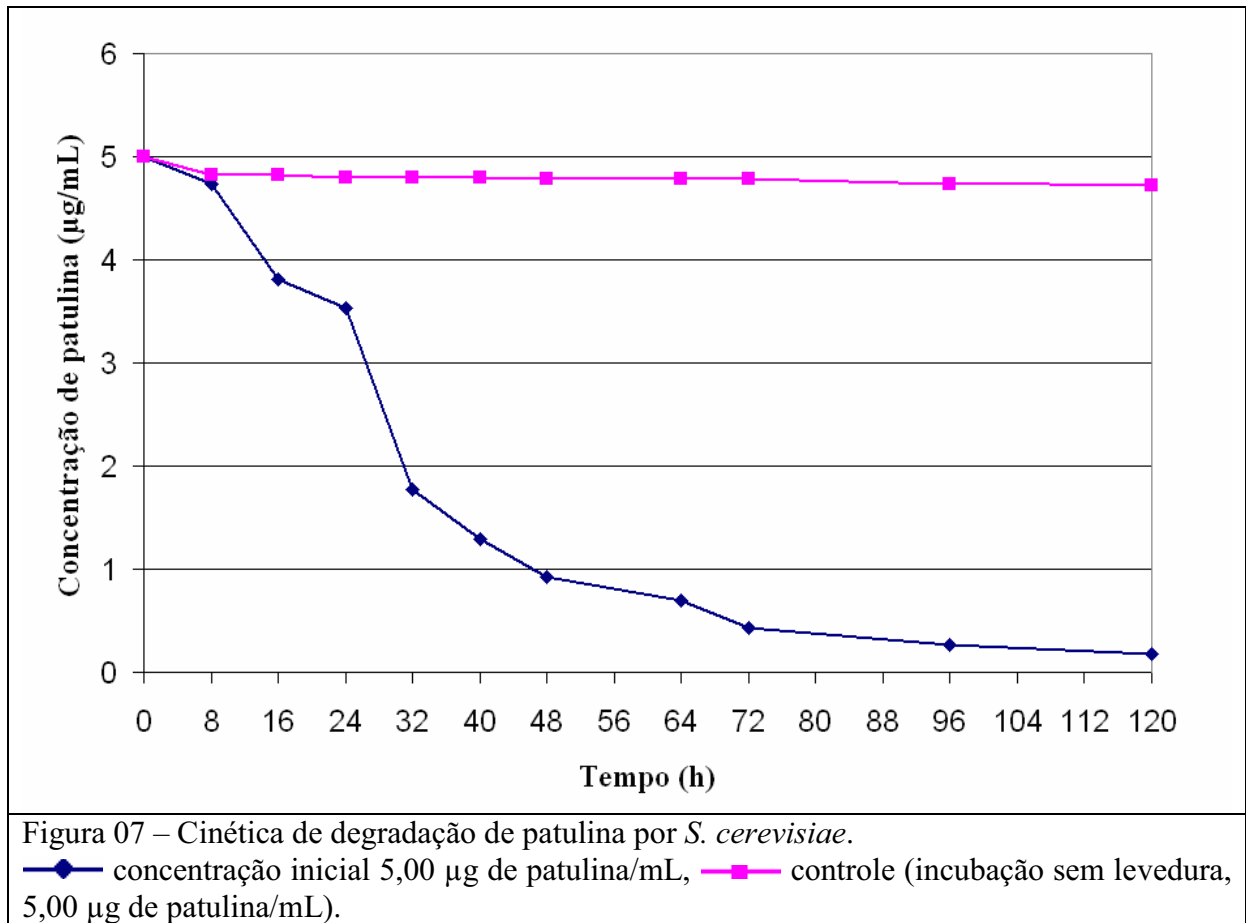
Tabela 05. Determinação da cinética de degradação de patulina em suco de maçã inoculado com *Saccharomyces cerevisiae*.

Tempo (h)	5,00 µg de patulina/mL	
	Sem <i>S. cerevisiae</i> *	Com <i>S. cerevisiae</i> *
0	5,00	5,00
8	4,82± 0,017	4,73± 0,013
16	4,82± 0,015	3,81± 0,009
24	4,80± 0,011	3,53± 0,018
32	4,80± 0,018	1,77± 0,015
40	4,80± 0,011	1,29± 0,010
48	4,79± 0,013	0,92± 0,015
64	4,79± 0,006	0,70± 0,006
72	4,78± 0,016	0,43± 0,011
96	4,74± 0,010	0,26± 0,014
120	4,72± 0,003	0,18± 0,016

Meio utilizado: suco de maçã despectinizado. Cultivo estático sob condições anaeróbias a 25°C.

* Cada valor corresponde à média aritmética das triplicatas ± desvio padrão.

Os teores de patulina nos ensaios inoculados com *S. cerevisiae*, onde foram adicionados 5,0 µg/mL de suco, permaneceram estáveis no período inicial de 8 horas. Após este tempo, até 32 horas, a eliminação da toxina ocorreu em maior intensidade, chegando a 1,77 µg/mL, o que representa uma redução de 64,6%. O processo continuou gradativamente com redução da toxina, porém de forma lenta, permanecendo um teor final de 3,6% (0,18 µg de patulina/mL) após 120 horas de fermentação (Figura 07). Esta degradação de patulina por leveduras durante os processos fermentativos foi citada por Karlovsky (1999).



Harwig *et al.* (1973) demonstraram a total degradação de patulina (3 µg/mL) do suco de maçã, submetendo à fermentação durante duas semanas por *S. cerevisiae* Y-99 e *S. ellipsoideus* DAVIDS #522, e durante quatro semanas quando inocularam *S. cerevisiae* MAC #Y2947. Burroughs (1977) removeu eficientemente a patulina (5 µg/mL) de sucos contaminados utilizando leveduras industriais para produção de sidras e tempo de fermentação de 12 dias.

A diminuição do teor de patulina pode estar associado a um mecanismo de defesa da levedura, onde ela produz uma proteína ainda não caracterizada capaz de degradar a toxina (SUMBU; THONART; BECHET, 1983). Os mesmos autores observaram a permanência de patulina no meio de cultivo, quando adicionada simultaneamente com 2 µg/mL de cicloheximida (inibidor da síntese protéica). Não obstante, se cicloheximida fosse adicionada 3

horas após a adição de patulina, a velocidade e a taxa de degradação seria reduzida, porém não suspensa.

Sumbu, Thomart e Bechet (1983) e Moss e Long (2002) relataram a existência de uma fase de adaptação das leveduras ou uma inibição temporária por um período proporcional à dose da toxina, ou seja, ocorre uma inibição concentração-dependente do crescimento, quanto maior a dose da toxina, maior é a fase de adaptação das leveduras e mais prolongada é a fase lag (estacionária). No crescimento de *S. cerevisiae* existem duas fases na ação da patulina sobre as células. Primeiro, uma ação da toxina no metabolismo da levedura e a inibição subsequente de crescimento, onde a levedura passa por uma fase de adaptação, sendo observada até 24 horas após a incubação. Segundo, a retomada de crescimento e degradação da patulina, indicando o aparecimento de um mecanismo de resistência provavelmente associado com o desaparecimento da micotoxina durante a fermentação do suco de maçã.

5.5 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO BRUTO ESTÉRIL

Uma vez que o desaparecimento de patulina pode estar associado a um mecanismo de defesa da levedura, devido a produção de um composto protéico capaz de degradar a toxina (SUMBU; THONART; BECHET, 1983), foi avaliada a atividade degradadora do extrato bruto da fermentação livre de células.

Analisando a cinética de degradação de patulina pelo processo fermentativo, onde houve notório decréscimo da toxina após 48hs de cultivo, os ensaios para obtenção do extrato bruto estéril foram conduzidos baseando-se neste tempo de crescimento do microrganismo para coleta do extrato bruto.

Após adição de toxina no extrato bruto estéril sem teor de patulina detectável, as análises mostraram uma redução de 55,7% (de 3,00 µg/mL para 1,33 µg/mL) durante o

período de análises (96h), sendo que uma redução de 28,3% desta (de 3,00 µg/mL para 2,15 µg/mL) foi observada em 24 horas e de 50% (de 3,00 µg/mL para 1,5 µg/mL) decorridas 48 horas quando mantidos a 25°C sob condições estáticas e estéreis (Tabela 06).

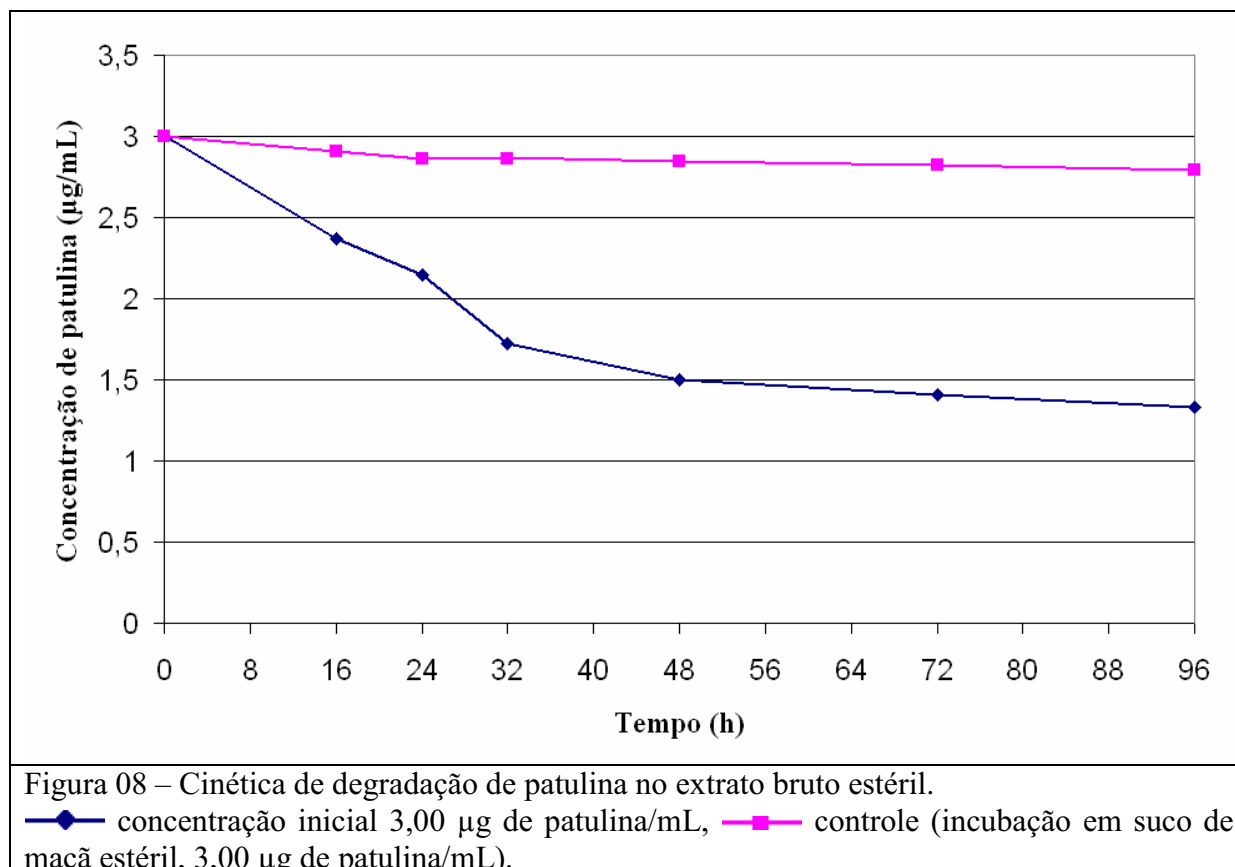
Tabela 06. Determinação da cinética de degradação de patulina no extrato bruto estéril quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV.

Tempo (h)	3,00 µg de patulina/mL	
	Suco de maçã estéril*	Extrato bruto*
0	3,00	3,00
16	2,91± 0,010	2,37± 0,023
24	2,86± 0,018	2,15± 0,016
32	2,86± 0,009	1,72± 0,019
48	2,85± 0,012	1,50± 0,011
72	2,82± 0,015	1,41± 0,020
96	2,79± 0,012	1,33± 0,012

Suco de maçã despectinizado utilizado como controle. Mantidos estáticos e estéreis a 25°C.

*média aritmética ± desvio padrão.

A maior redução nos teores de patulina foi observada nas primeiras 48 horas (redução de 50%) quando comparado às 48 horas finais (de 48 à 96 horas), onde a redução foi de 5,7%, podendo ser atribuída à diminuição da atividade do composto bioativo presente, porém, ainda apresentou maior degradação da toxina quando comparado ao controle (Figura 08), a qual foi de 3% no período de 48 à 96 horas.



5.6 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO DIALISADO ESTÉRIL

O equilíbrio de diálise é um método que possibilita a separação de componentes de alta massa molecular daqueles de baixa massa molecular utilizando para isto o diferencial de permeação entre membranas seletivas. A permeação das moléculas através da membrana depende da concentração do analito, do seu coeficiente de partição óleo/água e da área de superfície da membrana (TSAI, 2003).

A amostra de extrato bruto apresenta moléculas de alta massa molecular, como por exemplo, as proteínas, e estas devem ser separadas de substâncias interferentes a fim de medir sua atividade degradadora. Os mecanismos envolvidos no processo de permeação de substâncias pela membrana baseiam-se em forças dirigidas como diferença de concentração, de potencial elétrico e de pressão. Dentre estes mecanismos, os que apresentam maiores

aplicações estão relacionado à concentração e à pressão (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Esta técnica utiliza membranas de diálise com um tamanho de poro menor que o das proteínas e suas subunidades. O princípio da técnica se baseia na passagem de substâncias interferentes através da membrana de diálise até o equilíbrio, em temperatura constante, apresentando a vantagem de ser uma técnica termodinamicamente correta e livre de qualquer problema elétrico ou mecânico (VOLPE; FILHO, 1994).

Após adição da toxina no extrato dialisado estéril sem teor de patulina detectável, as análises mostraram completa remoção da toxina durante o período de análises (72hs), sendo que a redução de 62,3% desta (de 3,00 µg/mL para 1,13 µg/mL) foi observada em 16 horas, chegando a níveis não detectáveis decorridas 24 horas quando mantidos a 25°C sob condições estáticas e estéreis (Tabela 07).

A grande redução nos teores de patulina foi observada nas primeiras 16 horas (redução de 62,3%) quando comparado ao controle (1,7%) e de 100% (níveis não detectáveis) a partir de 24 horas de análise, enquanto o controle apresentava degradação de 1,7%, restando 2,95 µg de patulina/mL, que corresponde a 98,3% do total adicionada.

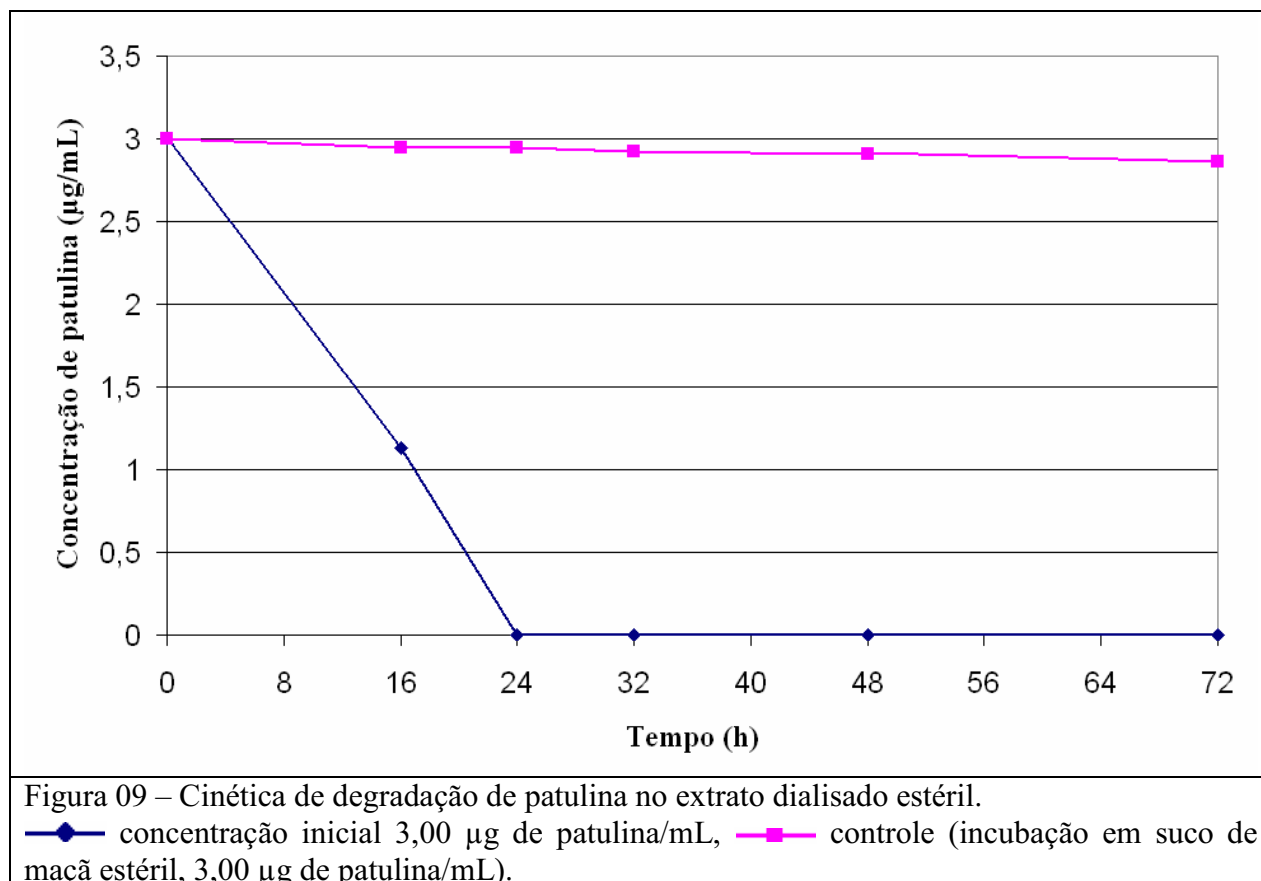
Tabela 07. Determinação da cinética de degradação de patulina no extrato dialisado estéril quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV.

Tempo (h)	3,00 µg de patulina/mL	
	Água estéril*	Extrato dialisado*
0	3,00	3,00
16	2,95± 0,015	1,13± 0,026
24	2,95± 0,028	nd**
32	2,92± 0,013	nd**
48	2,91± 0,010	nd**
72	2,86± 0,018	nd**

Água estéril utilizada como controle. Mantidos estáticos e estéreis a 25°C.

*média aritmética ± desvio padrão; **não detectado.

A Figura 09 mostra a cinética de degradação de patulina adicionada em extrato dialisado estéril durante os intervalos de tempo 0, 16, 24, 32, 48 e 72 horas, bem como o controle onde era adicionada a toxina em água estéril para verificar sua degradação em relação ao tempo de análise, quantificadas por CLAE com detector UV.



Com a utilização do extrato dialisado observou-se uma rápida degradação da patulina quando comparada com extrato bruto (28,3% em 24hs, Tabela 06) que pode estar relacionada à presença de alguma substância inibidora do composto bioativo que estava presente no extrato bruto e foi removida pelo processo de diálise empregado.

Estes resultados indicaram que o composto bioativo permaneceu no interior da membrana dialisadora (MWCO de 8000-10000 Da) e possui massa molecular superior a 10000 Da.

5.7 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PATULINA UTILIZANDO O EXTRATO ULTRAFILTRADO ESTÉRIL

Realizada uma ultrafiltração do extrato bruto estéril em cuba de agitação Millipore, Modelo 8400, 400mL, diâmetro 76mm utilizando membrana Millipore ultracel amicon YM100, membrana de celulose regenerada, de 10.000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit), 76mm, a 5°C e sistema pressurizado com gás nitrogênio, foi determinada a cinética de degradação de patulina pelo extrato ultrafiltrado.

A toxina adicionada neste extrato ultrafiltrado estéril sem teor de patulina detectável, foi totalmente degradada durante o período de análise (48hs). Uma redução de 51% (de 3,00 µg/mL para 1,48 µg/mL) foi observada nas primeiras 16hs, 74% (de 3,00 µg/mL para 0,79 µg/mL) em 24hs e não foi detectada em 32hs de análise quando mantidas a 25°C sob condições estáticas e estéreis (Tabela 08).

A maior redução de patulina foi constatada nas primeiras 16 horas (redução de 51%) quando comparada ao controle (2%), passando a níveis não detectáveis em 32 horas de análise, enquanto o controle permanecia com 96,6% (2,90 µg/mL) da toxina total adicionada após as 48 horas.

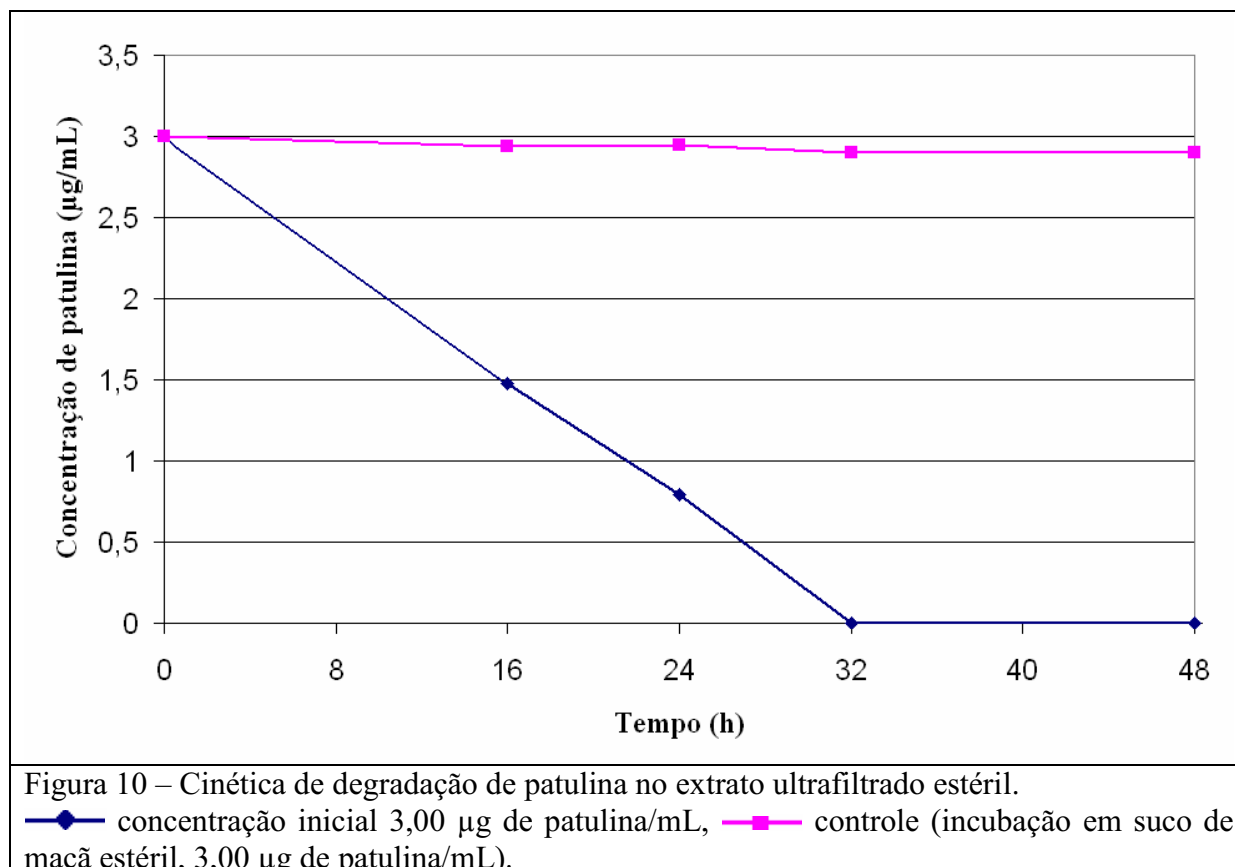
Tabela 08. Determinação da cinética de degradação de patulina no extrato ultrafiltrado estéril quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV.

Tempo (h)	3,00 µg de patulina/mL	
	Água estéril*	Extrato ultrafiltrado*
0	3,00	3,00
16	2,94± 0,030	1,48± 0,036
24	2,95± 0,023	0,79± 0,022
32	2,90± 0,018	nd**
48	2,90± 0,022	nd**

Água estéril utilizada como controle. Mantidos estáticos e estéreis a 25°C.

*média aritmética ± desvio padrão; **não detectado.

A Figura 10 mostra a cinética de degradação de patulina adicionada no extrato ultrafiltrado estéril durante os intervalos de tempo 0, 16, 24, 32 e 48 horas, bem como o controle (toxina em água estéril), quantificadas por CLAE com detector UV.



Tanto no extrato dialisado como no ultrafiltrado, observou-se uma rápida degradação da patulina quando comparada com extrato bruto (28,3% em 24hs), porém, mais lenta quando comparada com o extrato dialisado (62,3% em 16hs e não detectada em 24hs), que pode ser devido a aderência de uma parte do composto bioativo na membrana ultrafiltradora, bem como à redução de sua atividade durante o tempo de ultrafiltração.

Estes resultados confirmam que o composto bioativo foi retido no extrato ultrafiltrado após filtração na membrana de celulose regenerada (10000 NMWL) possuindo massa molecular superior ao tamanho do poro.

Numa comparação entre as atividades degradadoras de patulina entre os diferentes extratos por 32hs (Tabela 09) verificou-se uma maior degradação de patulina quando utilizado o extrato dialisado, com níveis não detectáveis em 24hs de análise. O extrato ultrafiltrado foi capaz de degradar a toxina presente, com níveis não detectáveis em 32hs de análise e o extrato

bruto, o qual consistiu de suco de maçã fermentado por 24hs e livre da biomassa, degradou a toxina até concentrações de 1,72 µg/mL (42,7% da total adicionada) nas mesmas 32hs.

Tabela 09. Determinação da cinética de degradação de patulina nos extratos bruto, dialisado e ultrafiltrado estéreis quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV.

Tempo (h)	3,00 µg de patulina/mL		
	Extrato bruto*	Extrato dialisado*	Extrato ultrafiltrado*
0	3,00	3,00	3,00
16	2,37± 0,023	1,13± 0,026	1,48± 0,036
24	2,15± 0,016	nd**	0,79± 0,022
32	1,72± 0,019	nd**	nd**

Mantidos estáticos e estéreis a 25°C.

*média aritmética ± desvio padrão; **não detectado.

A maior atividade do composto bioativo após etapas de purificação por diálise ou ultrafiltração indica a eficiência desses processos.

Na Figura 11 podemos observar a rápida degradação de patulina com a utilização do extrato dialisado e com o ultrafiltrado quando comparados ao extrato bruto.

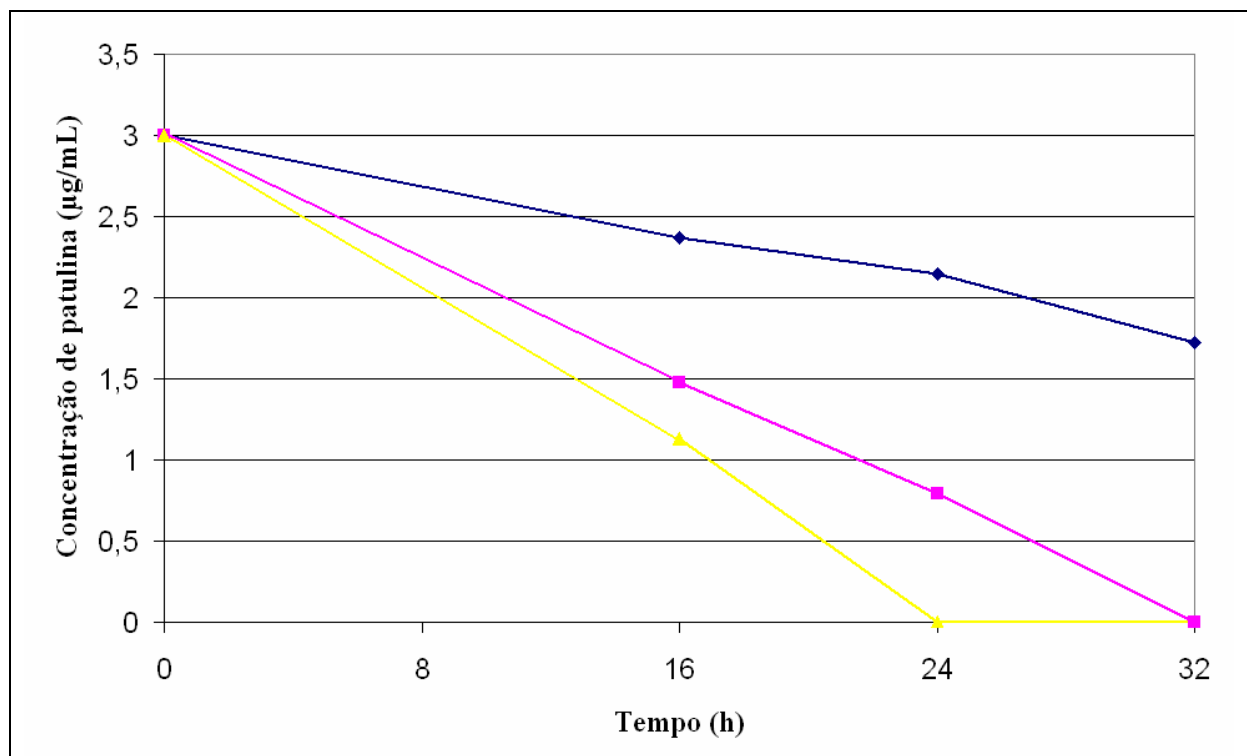
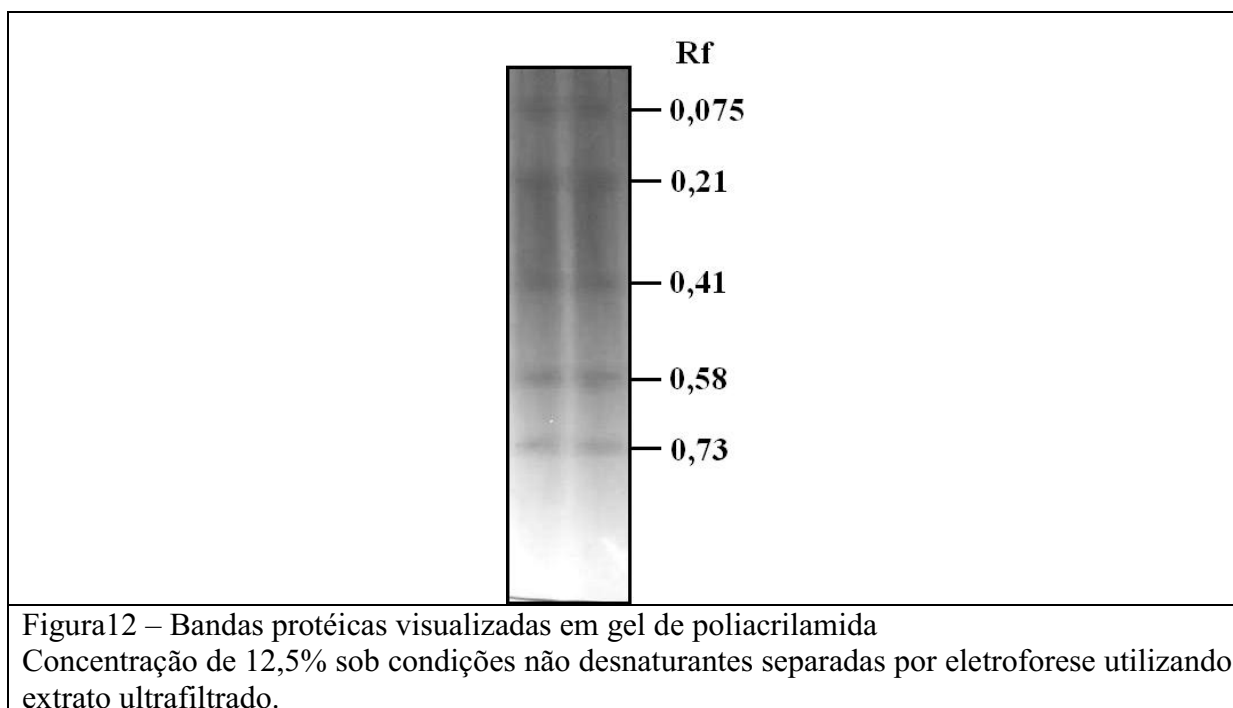


Figura 11 – Cinética de degradação de patulina nos extratos bruto, dialisado e ultrafiltrado estéreis.

—◆— no extrato bruto, —■— no extrato ultrafiltrado, —▲— no extrato dialisado. Conduzidos de modo estéreis com concentração inicial 3,00 µg de patulina/mL.

5.8 RASTREAMENTO DO COMPOSTO BIOATIVO POR ELETROFORESE

Na eletroforese sob condições não desnaturantes, para separar o composto bioativo sem perder sua atividade, foram observadas variações na intensidade de 5 bandas protéicas as quais possuíam valores para o fator de retenção (Rf) de 0,075; 0,21; 0,41; 0,58 e 0,73, respectivamente, como pode ser observado na Figura 12.



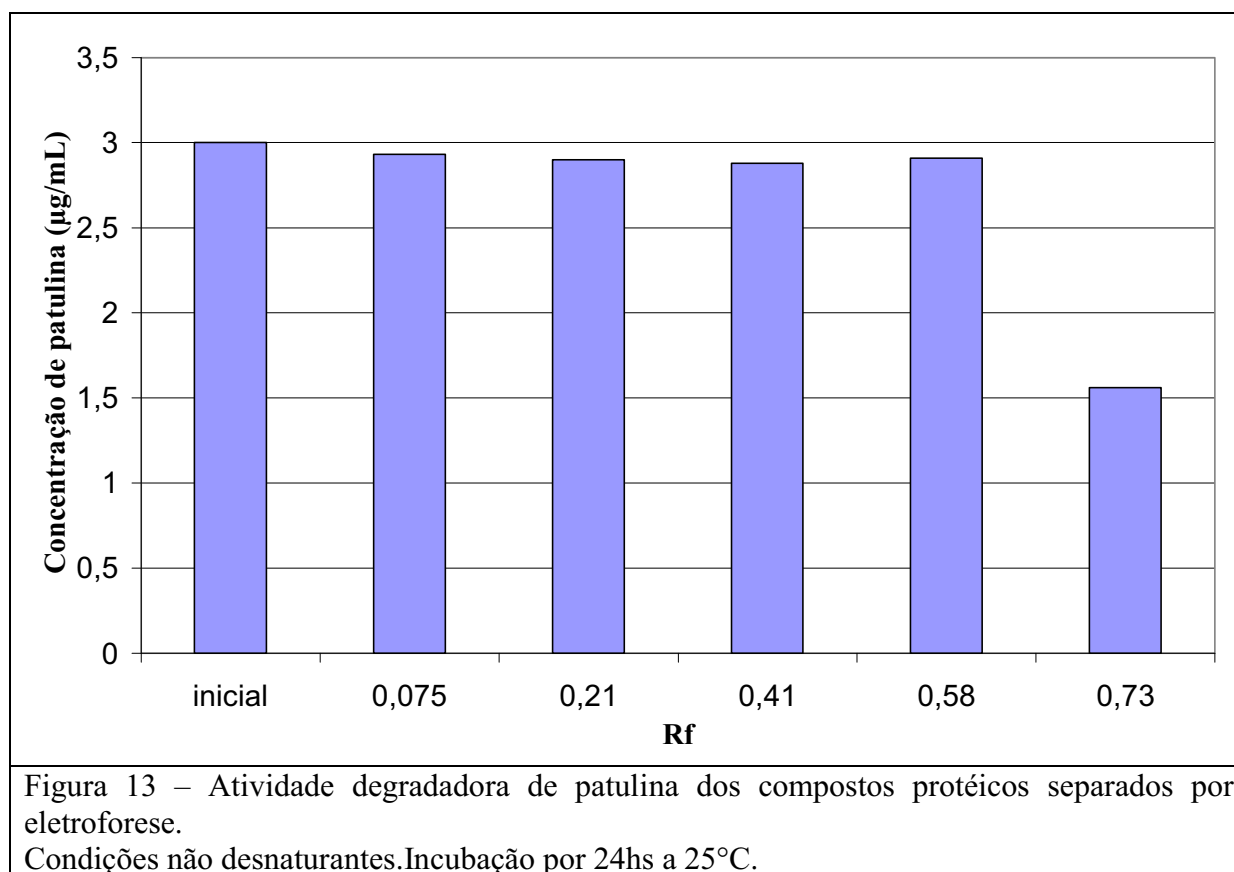
Ao determinar a atividade degradadora de patulina utilizando essas frações protéicas (5 bandas) extraídas do gel não corado pelo recorte das bandas segundo valores de Rf, seguidos de maceração, adição de 1mL de água ultrapura contendo toxina e acidificação, foi observada esta atividade degradadora na banda com Rf = 0,73 quando a redução de patulina foi de 48% (de 3,00 $\mu\text{g/mL}$ para 1,56 $\mu\text{g/mL}$), após 24hs de incubação a 25°C em condições estáticas, indicando efetivamente ser o composto bioativo. Nas demais frações (Rf de 0,075; 0,21; 0,41 e 0,58), a máxima redução de toxina foi de 4% (de 3,00 $\mu\text{g/mL}$ para 2,88 $\mu\text{g/mL}$ na fração protéica com Rf 0,41), permanecendo 96% (2,88 $\mu\text{g/mL}$) da concentração de patulina total adicionada (Tabela 10).

Tabela 10. Atividade degradadora de patulina pelos compostos protéicos separados por eletroforese quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV.

Rf das frações protéicas analisadas	3,00 µg de patulina/mL	
	Concentração de patulina em 24 horas (µg de patulina/mL)	Porcentagem de degradação
0,075	2,93	2,3%
0,21	2,90	3,3%
0,41	2,88	4,0%
0,58	2,91	3,0%
0,73	1,56	48%

Concentração de patulina inicial de 3,00 µg de patulina/mL. Mantidos estáticos a 25°C/24hs.

A Figura 13 ilustra a atividade degradadora de patulina nas frações protéicas obtidas pela separação em eletroforese sob condições não desnaturantes.



É importante destacar que o pH do gel (8,8) não foi capaz de desnaturar o composto bioativo, uma vez que apresentou atividade após sua extração.

5.9 AVALIAÇÃO DA PUREZA DO COMPOSTO BIOATIVO E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

Determinada a banda protéica com atividade degradadora de patulina ($R_f = 0,73$), o composto bioativo purificado pelos processos de ultrafiltração e eletroforese sob condições não desnaturantes foi analisado por SDS-PAGE (eletroforese desnaturizante) para avaliar o grau de pureza bem como estimar a sua massa molecular. Os géis obtidos dessa análise estão ilustrados na Figura 14, comprovando a homogeneidade da mesma.

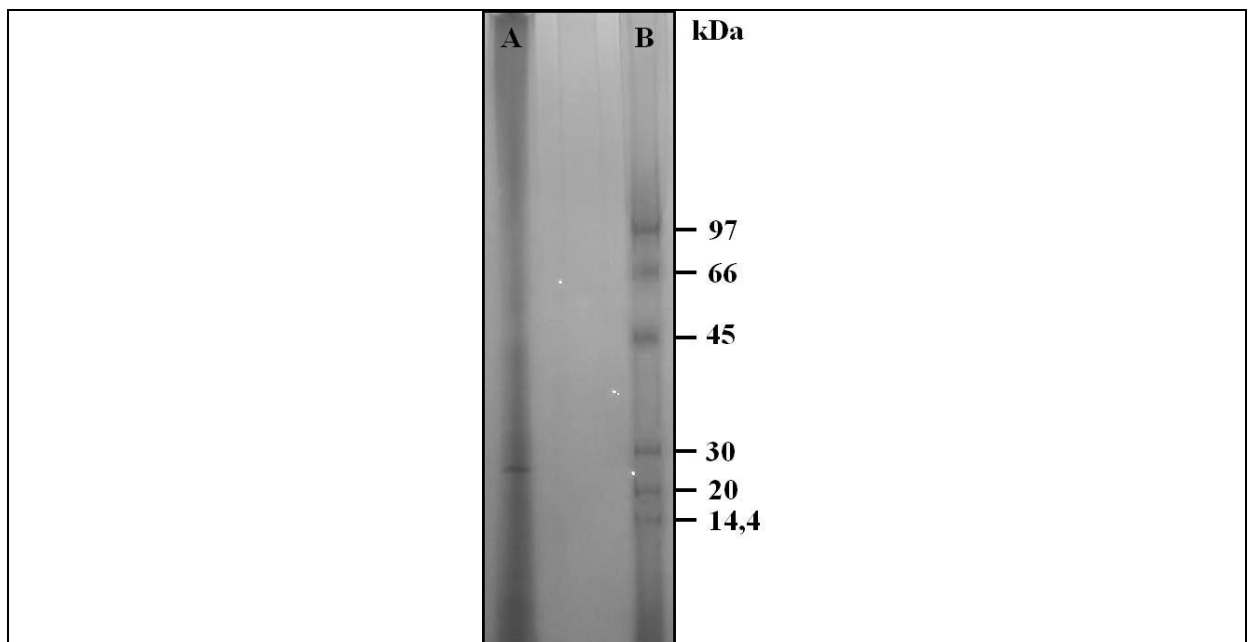
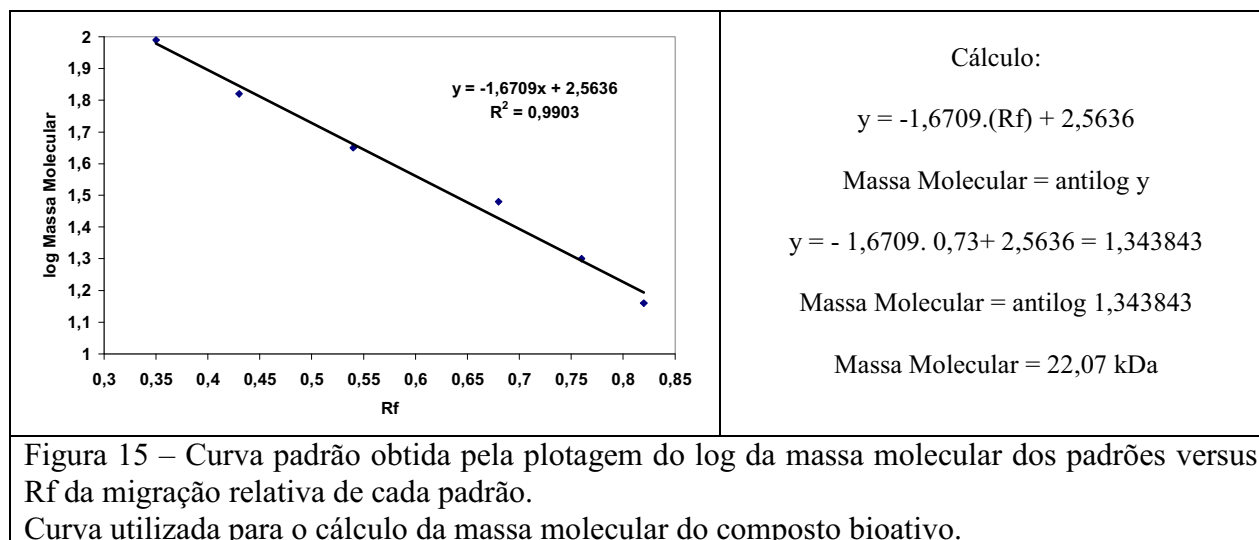


Figura 14 – Eletroforese SDS-PAGE para avaliação do composto bioativo e determinação de sua massa molecular. (A) composto bioativo produzido por *Saccharomyces cerevisiae* ICV D47. (B) Marcador de massa molecular GE Healthcare.

A massa molecular do composto bioativo puro foi estimada por meio de análise de regressão linear, plotando os valores do logaritmo da massa molecular dos padrões utilizados *versus* R_f da migração relativa de cada padrão e o do composto (Figura 15). Por esses cálculos a massa molecular do composto bioativo foi estimada em 22,07 kDa.



5.10 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA E DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DO COMPOSTO BIOATIVO

O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual o somatório de todas as suas cargas parciais é igual a zero, não sendo dependentes da concentração de proteínas (BERKELMAN; STENSTED, 2004). A análise para determinar o ponto isoelétrico do composto bioativo realizada por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida usando anfólitos Pharmalite com pH de 3,0 a 10 seguido de eletroforese SDS-PAGE, resultou na concentração deste composto exatamente no pólo positivo, indicando que nem o menor pH existente no gel (pH=3) foi capaz de precipitar o composto. Desta forma estima-se que seu ponto isoelétrico é inferior a 3.

5.11 pH DE MÁXIMA ATIVIDADE DO COMPOSTO BIOATIVO

A atividade do composto bioativo produzido por *Saccharomyces cerevisiae* ICV D47, acidificado em diferentes pHs (2, 3, 4, 5 e 6), mantido a 25°C por 24hs e realizado com o extrato ultrafiltrado são mostrados na Tabela 11.

Nesta Tabela 11 pode ser observado que, dentre os pHs testados, o composto apresentou maior atividade em pH 5, no qual não foram encontrados níveis detectáveis de

patulina após as 24hs de análise, porém, em pH 4 a degradação foi de 95% (3,00 µg/mL para 0,15µg/mL) e que o pH de máxima atividade deve encontrar-se entre os valores de 4 e 5, apresentando uma redução de 95 % e 100% respectivamente. Desta forma o composto apresenta uma faixa restrita de pH ótimo, onde uma pequena variação provoca a diminuição desta atividade. Em pH 2 ele não demonstrou estabilidade, reduzindo sua atividade degradadora em 9% (3,00 µg/mL para 2,73 µg/mL) como mostrados na Tabela 11. Isso pode estar relacionado com seu pI (inferior a 3), onde ocorre a precipitação do composto pelas equivalências de cargas e conseqüente perda de atividade.

Tabela 11. Determinação do pH de máxima atividade do composto bioativo presente no ultrafiltrado estéril em 24hs, quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV.

pH	3,00 µg de patulina/mL	
	Água estéril*	Extrato ultrafiltrado*
2	2,93± 0,014	2,73 ± 0,037
3	2,95± 0,015	1,80± 0,014
4	2,93± 0,028	0,15±0,030
5	2,94± 0,013	nd**
6	2,94± 0,010	0,68± 0,022

Água estéril utilizada como controle. Mantidos estáticos e estéreis a 25°C/24hs.

*média aritmética ± desvio padrão; **não detectado.

A Figura 16 ilustra a atividade do composto bioativo em degradar patulina em diferentes valores de pHs (2, 3, 4, 5 e 6).

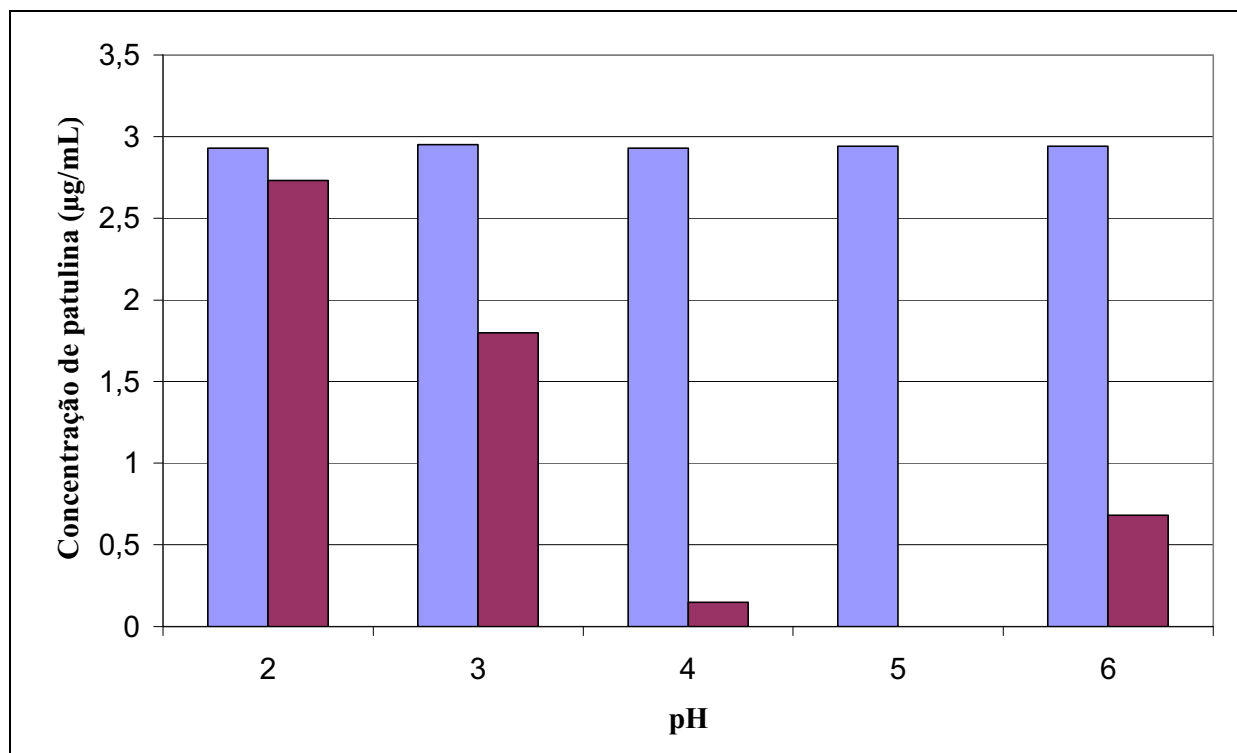


Figura 16 – Degradação de patulina pelo composto bioativo presente no extrato ultrafiltrado estéril em pHs 2, 3, 4, 5 e 6.

Concentração inicial 3,00 µg de patulina/mL, mantidos estáticos a 25°C por 24hs. ■ controle (incubação em água ultrapura estéril acidificada, ■ extrato ultrafiltrado acidificado.

5.12 TEMPERATURA DE MÁXIMA ATIVIDADE DEGRADADORA DO COMPOSTO BIOATIVO

A temperatura de máxima atividade do composto bioativo quando analisada utilizando extrato ultrafiltrado adicionados de 3µg da toxina/mL e armazenados por 16hs nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C, foi de 35°C.

Os resultados estão apresentados na Tabela 12, onde é possível verificar maior redução nos teores de patulina quando utilizada a temperatura de 35°C (74% de redução). Na temperatura de 30°C apresentou a segunda maior redução de 69,3%, e compreenderam as duas temperaturas onde o composto apresentou maior atividade.

Nas temperaturas de 20 e 25°C a degradação de patulina foi menor (52,3% e 50,7%, respectivamente), bem como, após o aumento da temperatura para 40 e 45°C (61,7% e 52,6%, respectivamente). Na temperatura de 50°C o composto apresentou a menor atividade

degradadora (40%) dentre as temperaturas testadas, indicando inibição da atividade ou perda de sua estabilidade pelo calor.

Tabela 12. Determinação da temperatura de máxima atividade do composto bioativo presente no ultrafiltrado estéril em 16hs, quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV.

Temperatura	3,00 µg de patulina/mL	
	Água estéril*	Extrato ultrafiltrado*
20	2,93± 0,013	1,43± 0,032
25	2,95± 0,032	1,48± 0,043
30	2,95± 0,021	0,92± 0,017
35	2,92± 0,032	0,78± 0,026
40	2,94± 0,015	1,15± 0,014
45	2,93± 0,040	1,42± 0,022
50	2,91± 0,025	1,80± 0,007

Água estéril utilizada como controle. Mantidos estáticos e estéreis por 16hs.

*média aritmética ± desvio padrão.

A Figura 17 ilustra a atividade do composto bioativo em degradar patulina à temperatura de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C por 16hs.

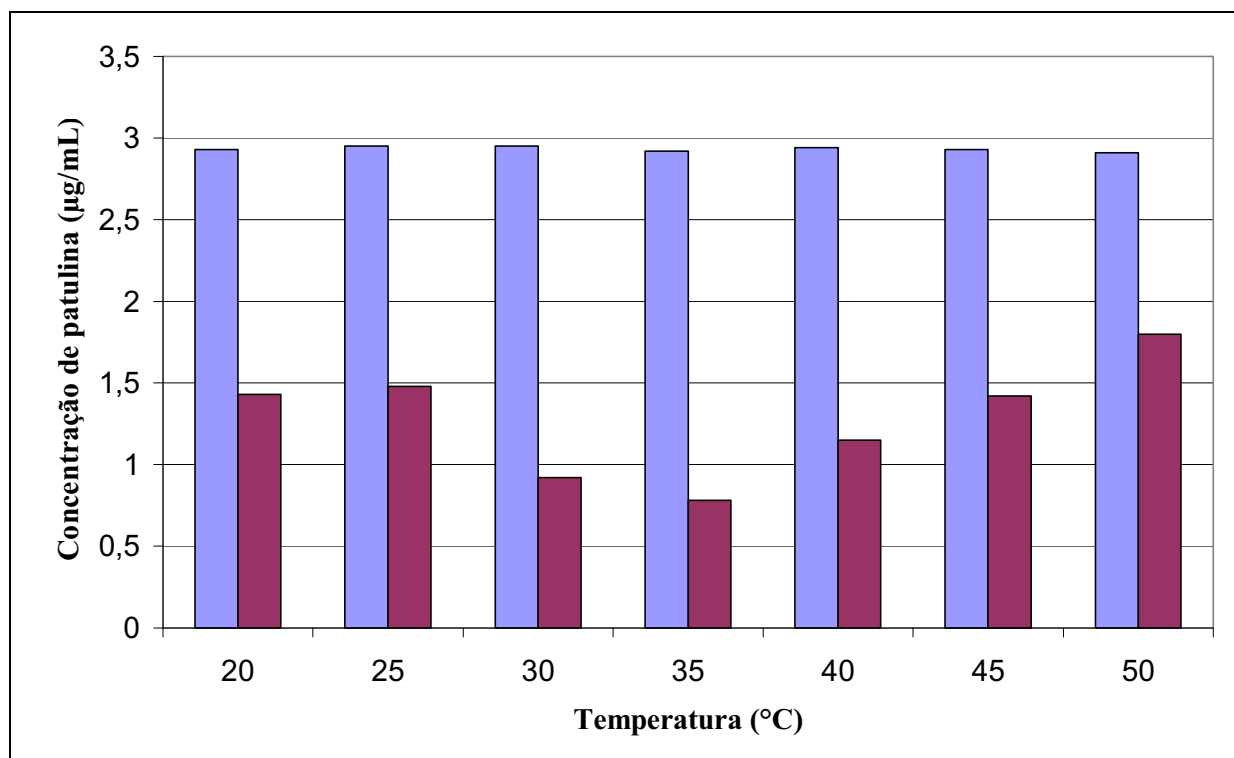


Figura 17 – Degradação de patulina pelo composto bioativo presente no extrato ultrafiltrado estéril à diferentes temperaturas.

Concentração inicial 3,00 µg de patulina/mL. ■ controle (incubação em água ultrapura estéril, ■ extrato ultrafiltrado.

Estas análises foram realizadas com o extrato ultrafiltrado estéril que estava armazenado a -20°C até o período das análises, o qual apresentou atividade mesmo após congelamento e descongelamento, mostrando a estabilidade do composto bioativo à baixas temperaturas.

5.13 PRESENÇA DE CARBOIDRATOS

O Método fenol sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) foi utilizado para determinação de carboidratos. Com limite de detecção de $1\mu\text{g/mL}$, o composto bioativo não apresentou níveis detectáveis de carboidratos, indicando pouca ou nenhuma glicosilação.

5.14 ESTABILIDADE TÉRMICA DO COMPOSTO BIOATIVO A 80°C

Após tratamento térmico empregado a 80°C por 20 minutos, o qual é utilizado na indústria processadora de maçãs, o composto bioativo não apresentou atividade degradadora de patulina. Este resultado pode ser devido à baixa ou nenhuma glicosilação do composto, uma vez que não foi detectada a presença de carboidratos. Wang *et al.* (1996) encontraram que a estabilidade térmica de proteínas parece depender do teor de carboidratos, ou seja, das glicosilações presentes, tendo descrito que a maior estabilidade térmica foi observada em proteínas mais fortemente glicosiladas, independentemente das cadeias de carboidratos ligados covalentemente.

6. CONCLUSÕES

A metodologia de quantificação da patulina por CLAE foi padronizada, apresentando recuperação de 86,24%, um limite de detecção de 4,3 µg/L e de quantificação de 8,6 µg/L.

Em maçãs destinadas ao consumo *in natura* apresentando manchas de infecção microbiana, a toxina ocorreu em concentrações altas, mesmo nas partes não afetadas, o que pode se constituir num problema ao consumidor.

A patulina adicionada no suco inoculado com *S. cerevisiae* foi reduzida até 3,6% da concentração inicial em 120 horas, ocorrendo 64,6% de degradação em 32 horas.

O extrato bruto obtido por fermentação alcoólica com *S. cerevisiae* foi capaz de degradar patulina, 50% da total adicionada em 48 horas e 55,7% em 96 horas.

O extrato bruto dialisado degradou 62,3% da patulina adicionada em 16 horas, chegando a níveis não detectáveis a partir de 24 horas.

O extrato bruto ultrafiltrado foi capaz de degradar 51% da patulina em 16 horas de análise, 74% em 24 horas e níveis não detectáveis em 32 horas.

O composto bioativo foi purificado em duas etapas, através de técnica de ultrafiltração seguida de eletroforese em condições não desnaturantes.

A massa molecular encontrada para este composto foi estimada em 22,07 kDa, possuindo ponto isoelétrico inferior a 3.

pH e temperatura de máxima atividade degradadora encontrados estavam entre 4 e 5, e 30 e 35°C, respectivamente.

O composto não apresentou glicosilações detectáveis por análise de carboidratos e uma baixa estabilidade térmica, não resistindo a temperatura de 80°C por 20 minutos.

O composto bioativo demonstrou eficiente degradação de patulina devendo ser realizados testes de toxigenicidade deste e dos subprodutos da degradação de patulina para

que possa ser utilizado na degradação da toxina pela sua adição em produtos derivados de maçã, antes ou após sua pasteurização.

7. REFERÊNCIAS

ABPM - Associação Brasileira dos Produtores de Maçã. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>> Acesso em: 25/10/2004.

ABPM - Associação Brasileira dos Produtores de Maçã. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>> Acesso em: 19/04/2005.

ABRAMSON, D.; LOMBAERT, G.; CLEAR, R.M.; SHOLBERG, P.; TRELKA, R.; ROSIN, E. Production of patulina and citrinin by *Penicillium expansum* from British Columbia (Canada) apples. Mycotoxin Research, n. 25, p. 85–88, 2009.

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. Letters in Applied Microbiology., v.32, p.240-242, 2001.

ANDERSEN, B.; SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J.C. *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. J. Agric. Food Chem. v.52,p.2421-2428, 2004.

ANON. Survey of apple juice for patulin. MAFF Food Surv. Inf. Sheet, n. 173, London: HMSO, 1999.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). AOAC Official Method 995.10. Determinación de Patulina en Frutas y Alimentos. Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Washington, MD, USA, 17ed., 2000.

ARAFAT W, MUSA M.N. Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., v.87(2), p.177-86, 1995.

ARGENTA, L. C. Concentração de etileno interno e maturação de maçãs cvs. Gala, Golden delicious e Fuji. Rev. Bras. Frut., v.15 n.1, p.125-132, 1993.

AYTAC, S.A.; ACAR, J. Einflub von L-Ascorbinsäure und Schwefeldioxidzusatz auf die Stabilität von Patulin in Apfeläften und Pufferlösungen. Ernährung., v.1, p.15-17, 1994.

BAERT, K.; CHITUNDU, K.; DE MEULENAER, B.; DEVLIEDHERE, F. Incidence of patulin in organic and conventional apple juice marketed in Belgium. Paper presented at XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Bethesda, Maryland, USA, 2004, p.37.

BATTA, Y. A. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. Crop protection, v.23, p.19-26, 2004.

BERETTA, B.; GAIASCHI, A.; GALLI, C. L.; RESTANI, P. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. Food Add. Cont., v.17, n.5, p.399-406, 2000.

BERKELMAN, T.; STENSTED, T. 2-D Eletrophoresis: Principles and Methods. Edition AC (80-6429-60). GE Healthcare, 2004. Manual do fabricante.

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

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. *Electrophoresis*. v.8, p.93-99, 1987.

BOLGER, M. Integration of risk assessment and management. In: Joint FAO/WHO seminar on the safety/risk analysis of contaminants: genotoxic carcinogens, Rotterdam, The Netherlands, 2002.

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

BRACKETT, R. E.; MARTH, E. H. Patulin in apple juice from roadside stands in Wisconsin. *J. Food Protect.*, v.42, n.11, p.862-863, 1979.

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.26, n.2, p.215-219, 1998.

BRASIL. Instrução normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Estabelece o regulamento técnico para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para a polpa de fruta. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, Seção 1, n.6, p.54-58, jan, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURDA, K. A. Research Note: Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit-products marketed in New South Wales. *J. Food Protect.*, v.55, n.10, p.796-798, 1992.

BURROUGHS, L. F. Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. *J. AOAC*, v.60, n.1, p.100-103, 1977.

CELLI, M.G. Patulina em maçãs e em produtos derivados. Aspectos sanitários e controle empregando *Saccharomyces Cerevisiae*. 2006, 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa: Ponta Grossa-PR, 2006.

CELLI, M.G.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y.; WOSIACKI, G. Degradação de patulina por *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação de mosto de maçã. *Anais do 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas-SP, 2005.

CHEN, L.; INGHAM, B.H.; INGHAM, S.C. Survival of *Penicillium expansum* and patulin production on stored apples after wash treatments. *Journal of Food Science*. v.69, n.8, p.669-675, 2004.

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

COELHO, A.R.; LEVY, R.M.; HOFFMANN, F.L.; TANIWAKI, M.H.; KMELMMEIER, C.; PAGNOCCA, F.C.; HIROOKA, E.Y. Patulin producing *Penicillium expansum* vs. antagonistic yeasts with perspectives of biocontrol in the post-harvest of fruits. In: XI INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2004. Bethesda, Maryland, USA. Proceeding... Maryland, USA, p. 99, 2004.

COELHO, A. R. Controle de *Penicillium expansum*/biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita. 2005, 122f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Departamento de Ciências de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina: Londrina-PR, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for codex purposes, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling. Documento CX/MAS 98/5, 1998.

CONWAY, W. S.; LEVERENTZ, B.; JANISIEWICZ, W. J.; BLODGETT, A. B.; SAFTNER, R. A.; CAMP, M. J. Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce post-harvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. Post-harvest Biol. Technol., v.34, p.11-20, 2004.

CUNHA, S.C.; FARIA, M.A.; FERNANDES, J.O. Determination of patulin in apple and quince products by GC-MS using $^{13}\text{C}_{5-7}$ patulin as internal standard. Food Chemistry. n. 115, p. 352-359, 2009.

DEMIRCI, M.; ARICI, M.; GUMUS, T. Presence of patulin in fruit and fruit juices produced in Turkey. Ernahrung-Umschau., v.50(7), p.262-263, 2003.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; BLACKBURN, J. A. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. Intl. J. Food Microbiol., v.98, n.3, p.241-248, 2005.

DRILLEAU, J. F.; BOHOUN, G. La patuline dans les produits cidricoles. C. R. Seances Acad. Agric. Fr., v.59, p.1031-1037, 1973.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and related compounds. Analytical Chemistry, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

ENGEL, G.; TEUBER, M. Patulin and other small lactones. In: Mycotoxins. Netherland: [s.n.], 1984. p.290-299.

EUROPEAN COMMISSION. 2003. Ec N° 1425/2003.

FAO - FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em 02/06/2008.

FERNÁNDEZ-TREVEJO, E. O.; ARIAS VERDÉS, J. A.; SERSA ESPINOSA, R. [01] Validación de um método para la determinación de patulina em jugos y purês de frutas por HPLC. Ver. Cubana Aliment. Nutr., v.15, n.1, p.20-25, 2001.

FERNÁNDEZ-TREVEJO, E. O.; ARIAS VERDÉS, J. A.; SERSA ESPINOSA, R. [02] Presence of patulin in fruit purees and juices. *Alimentaria*, Madrid, v.321, p.133-135, 2001.
FLORIANOWICZ, T. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *Europe Food Research Technology*, v. 212, n. 3, p. 282-286, 2001.

FONSECA, H. Micotoxinas on line. Disponível em <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 28/06/2008.

FSA - FOOD STANDARDS AGENCY, 2003. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk>> Acesso em: 07/10/05.

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. v.46, n.4, p.1398-1407, abril, 2008.

FUNDAÇÃO CARGILL. Relatório Anual, 1983

GALCIA-CLOSAS, R.; BERENGER, A.; JOSE, T. M.; JOSE, S. M.; QUIRO, J. R.; NAVARRO, C.; AMAUD, R.; DORRONSORO, M.; DOLORES, C. M.; BARRICARTE, A.; ARDANAZ, E.; AMIANO, P.; MARTINEZ, C.; AGUDO, A.; GINZALES, C. Dietary sources of vitamin C, Vitamin E, and specific carotenoids in Spain. *Br. J. Nutr.*, v.91, p.1005-1011, 2004.

GASHLAN, H.M. High performance liquid chromatographic determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia. *Scientific Research and Essay*. v.4, n.2, p. 69-72, fev, 2009.

GÖKMEN, V.; ACAR, J. [01] An Investigation on the relationship between patulin and fumaric acid in apple juice concentrates. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v.31, p.480-483, 1998.

GÖKMEN, V.; ACAR, J. [02] Incidence of patulin in apple juice concentrates products in Turkey. *Journal of Chromatography A*, v.815, p.99-192, 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, 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.; ARTIK, N.; ACAR, J.; KAHRAMAN, N.; POYRAZOGLU, E. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *Eur Food. Res. Technol.*, v.213, p.194-199, 2001.

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

GRIFFIN; D. H. *Fungal Physiology*. 2ªed, N.Y., EUA, 1993. p.250-251.

GROOTWASSINK, J.W.D.; GAUCHER, G.M. De novo biosynthesis of secondary metabolism enzymes in homogeneous cultures of *Penicillium urticae*. J. Bacteriology v.141(2), p.443-455, 1980.

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. J. Canad. Inst. Food Sci. Technol., v.6, n.1, p.22-25, 1973.

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

HATEZ F, GAYE F. Inhibition of translation in reticulocyte by the mycotoxin patulin. FEBS Lett., v.95, p.252-256, 1978.

HE, J.; TSAO, R.; YANG, R.; ZHOU, T. Purification of patulin from *Penicillium expansum* culture: high-speed counter-current chromatography (HSCCC) versus preparative high-performance liquid chromatography (prep-HPLC). Food Additives and Contaminants. v. 26, n. 1, p. 101–107, jan, 2009.

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. Microbiol. Pol., v.52, p.53-64, 2003.

HIGASHIHARA, K.; TAKEUCHI, M.; BANDO, S.; SAEGUSA, Y.; MIYAGAWA, H.; GOTO, T. Effect of storage temperature on the growth of *Penicillium expansum* and its production of patulin in apples. Mycotoxins. v. 59, n. 1, p.7-13, 2009.

HOPKINS, J. The toxicological hazards of patulin. Food Chem. Toxicol., v. 31, p. 455-459, 1993.

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.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - LSPA -, 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 10/07/2008.

IBRAF - INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Novos horizontes para a fruticultura brasileira, 2005. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>> Acesso em: 10/07/2008.

IBRAF - INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Volume das exportações de frutas cresce 14%, 2008. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>> Acesso em: 10/07/2008.

IBRAF - INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Comparativo de exportações de frutas frescas, 2009. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>> Acesso em: 20/10/2009

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, 2008.

ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Manual técnico nº 14, p. 45, 1995.

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 this contamination in Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.52, n.25, p.7464-7468, 2004.

IWAHASHI, Y.; HOSODA, H.; PARK, J.H.; LEE, J.H.; SUZUKI, Y.; KITAGAWA, E.; MURATA, S.M.; JWA, N.S.; GU, M.B.; IWAHASHI, H. Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.6, n.9, 2006.

JACKSON, L.S.; BEACHAM-BOWDEN, T.; KELLER, S.E.; ADHIKARI, C.; TAYLOR, K.T.; CHIRTEL, S.J.; MERKER, R.I. Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.66, n.4, p.618-624, 2003.

JANISIEWICZ, W. J.; LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; SAFTNER, R. A.; REED, A. N.; CAMP, M. J. Control of bitter rot and blue mold of apples by integrating heat and antagonist treatments on MCP treated fruit stored under controlled atmosphere conditions. *Post-harvest Biol. Technol.*, v.29, p.129-143, 2003.

JIMINEZ, M.; MATEO, R.; QUEROL, A.; HUERTA, T.; HERNANDEZ, E. Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia* v.115, p.121-127, 1991.

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.

KADAKAL, C.; NAS, S.; EKINCI, R. Ergosterol as a new quality parameter together with patulin in raw apple juice produced from decayed apples. *Food Chemistry*, p.1-6, 2004

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

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE SOARES, L. M.; 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*, v.33, p.269-273, 2002.

KOCA, N.; EKSI, A. Reduction of patulin in apple juice concentrates during storage. *Journal of Food Safety*, v.25, p.1-8, 2005.

KOZLOWSKA, K.; JERUSZKA, M.; MATUSZEWSKA, I.; ROSZKOWSKI, W.; BARYLKO-PIKIELNA, N.; BRZOWSKA, A. Hedonic tests in different locations as predictors of apple juice consumption at home in elderly and young subjects. *Food Qualit. Pref.*, v.14, p.653-661, 2003.

KRYGER, R. A. Volatility of patulin in apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, v.49, n.8, p.4141-4143, 2001.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, n. 227, p. 680, 1970.

LAI, C. L.; FUH, Y. M.; SHIH, Y. C. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. *J. Food Drug Anal.*, p.85-96. aug., 2000.

LAIDOU, A.; THANASSOULOPOULOS, C. C.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest pathogens. *J. Phytopathol.-Phytopathol. Zeitschrift*, v.149, p.457-461, 2001.

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.; STOCKENSTROM, 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.*, v.18, n.9, p.825-829, 2001.

LEITÃO, M. F. F. Conservadores em alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microrganismos. *Col. Inst. Tecnol. Alim.*, v.20, n.9, p.116-127, 1990.

LEVY, R. M.; HAYASHI, L.; CARREIRO, S.C.; PAGNOCCA, F.C.; HIROOKA, E.Y. Inhibition of mycotoxigenic *Penicillium* sp. and patulin biodegradation by yeast strains. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v. 27, n. 1, p. 41-47, 2002.

LEVY, R. M.; HIROOKA, E. Y. Detoxificação de patulina por leveduras antagonistas a *Penicillium* spp. *Unopar Científica - Ciências Biológicas e da Saúde*, v.1, n.1, p.57-62, 1999.

LEVY, R. M.; SILVA, R. S. F.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. Ensaio fatorial da atividade inibitória de *Penicillium* por leveduras em frutos de maçã. *Braz. J. Food Technol.* v.3, p.145-150, 2000.

LINDROTH, S.; NISKANEN, A. Comparison of potential patulin hazard in home-made and commercial apple products. *J. of Food Sci.*, v.43, p.446-448, 1978.

LIPOWSKA, T.; GOSZCZ, H.; KUBACKI, S.; JANUSZEWSKI, T.; Studies of changes in patulin content during apple wine production and must sulphurization. *Food Process. Preserv.*, v.41 p.7-19, 1990.

MAC DONALD, S.; LONG, M.; GILBERT, J.; FELGUEIRAS, I. Liquid Chromatographic Method for Determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree – Collaborative Study. *J. AOAC*, n.83, p.1387-1394, 2000.

MAHFOUD, R.; MARESCA, M.; GARMY, N.; FANTINI, J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol. App.l Pharmacol.*, v.18, p.1209–1218, 2002.

MAJERUS, P.; KAPP, K. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. *Gen. Health Cons. Protec.*, p.12-18, mar., 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.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Programa Nacional de Erradicação da *Cydia pomonella*, 2007. Disponível em: <www.agricultura.gov.br> Acesso em 15/05/2008.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Suco de maçã. 2000. Disponível em: <www.agricultura.gov.br> Acesso em 20/08/2005.

MARIN, S.; MORALES, H.; HASAN, H.A.H.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Patulin distribution in Fuji and Golden apples contaminated with *Penicillium expansum*. *Food Additives e Contaminants*, v.23, p.1316-1322, 2006.

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

MCKINLEY, E.R.; CARLTON, W.W.; BOON, G.D. Patulin mycotoxicosis in the rat: toxicology, pathology, and clinical pathology. *Food Chem. Toxicol.*, v.20, p.289-300. 1982.

MELLO, L. M. R. Produção e Mercado Brasileiro de Maçã, 2004. Comunicado técnico nº50. Disponível em: <www.cnpuv.embrapa.br> Acesso em: 25/08/2007.

MIURA S, HASUMI K, ENDO A. Inhibition of protein prenylation by patulin. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* v.318(1), p.88-90, 1993.

MOAKE, M.M.; PADILLA-ZAKOUR, O.; WOROBO, R.W. Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* v.1, p.8-21, 2005.

MORALES, H.; MARÍN, S.; ROVIRA, A.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. *Letters in applied microbiology.* v.44, n.1, p.30-35, 2007.

MOSS, M. O. Mycotoxins. *Mycological Research*, v. 100, n.5, p.513-523, 1996.

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

MOSS, M. O.; LONG, M. T. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Add. Cont.*, v.19, n.4, p.387-399, 2002.

MOULE, Y.; HATEY, F. Mechanism of the in vitro inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from *Byssoschlamys nivea*. *FEBS Lett.*, v.74, p.121-125, 1977.

MUTLU, M.; HIZARCIOGLU, N.; GÖKMEN, V. Patulin adsorption kinetics on activated carbon, activation energy and heat of adsorption. *Journal of Food Science.*, v.62, n.1, p.128-130, 1997.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species-an illustrated manual for identification*. Pennsylvania, Pennsylvania State University, 1983. 193p.

NORTHOLT, M. D.; VAN EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food Protec.*, v.41, n.11, p.885-890, 1978.

NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I. Biological control of post-harvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Intern. J. Food Microbiol.*, v.70, n.1-2, p. 53-61, 2001.

OUGH, C.S.; CORISON, C.A. Measurement of patulin in grapes and wines. *Journal of Food Science*, Chicago, v.45, n.3, p.476-478, 1980.

OKULL, D.O.; LABORDE, L.F. Activity of electrolyzed oxidizing water against *Penicillium expansum* in suspension and on wounded apples. *Food Microbiology and Safety.*, v.69, n.1, p.23-27, 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.

PRADO, E. C. Empresas produtoras de sucos de frutas investem em produção de matéria-prima para crescer. *Exportar & Gerência*, p.18-21, mar, 2000.

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, A.; DÍAZ, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. *J. Agri. Food Chem.*, v.42, p.1701-1703, 1994.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RICELLI, A.; BARUZZI, F.; SOLFRIZZO, M.; MOREA, M.; FANIZZI, F.P. Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*. *Applied and Environmental Microbiology*. v.73, n.3 p.785-792, fev. 2007.

RICHARD, J.; PAYSE, G.; DESJARDINS, A.E.; MARAGAS, C.; NORRED, W. Mycotoxins, risk in plant, animal and human systems. *Council of Food Protective*, 2003. p. 71.

- RILEY R.T., SHOWKER J.L. The mechanism of patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.09, p.108-26, 1991.
- RITIENI, A. Patulin in Italian commercial apple products. *J. Agri. Food Chem.*, v.51, n.20, p.6086-6090, 2003.
- ROSS, G. Patulina: parâmetros que influem na produção, detoxicação e considerações sobre microbiota fúngica em maçã (*Malus domestica* Borkhausen). 1995, 108f. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos); Departamento de Ciências de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina: Londrina-PR, 1995.
- ROSS, G. U.; TANIWAKI, M. H.; SABINO, M.; VIZONI, T.; HIROOKA, E. Y. Produção de patulina em maçã (*Malus domestica* Borkhausen), cultivares gala e Fuji, inoculadas com *Penicillium* spp. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v.18, n.1, p.82-87. jan./abr., 1998.
- RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. *Europe Food Technol.*, [s.l.] p.274-278, 2001.
- SANHUEZA, R.M.; KRETZCHMAR, A.A.; BORSÓI, M. Avaliação de organismos antagônicos a *Penicillium expansum* em maçãs cv. Fuji em pós colheita. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, n. 4, 1992.
- SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. *Analytical Biochemistry*, 166, p. 368-379, 1987.
- SCUSSEL, V. Patulina. In: *Micotoxinas em alimentos*. Florianópolis-SC: Insular, 1998. p.47-48.
- 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, p.721-727, 2004.
- SEWRAM, V.; NAIR, J.J.; NIEUWOUDT, T.W.; LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G.S. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.897, p.365-374, 2000.
- SHARMA, R.P. Immunotoxicity of mycotoxins. *J. Dairy Sci.*, v. 76, p. 892-897, 1993.
- SHEPHARD, G.S.; LEGGOT, N.L. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A*, v.882, p.17-22, 2000.
- SHEU, F.; SHYU, Y.T. Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination. *J. Agric. Food Chem.* v.47, n.7, p.2711-2714, 1999.
- SHILIH, H.; ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food. *J. Fruit Process.*, n.5, p.164-167, 1999.

SHOLBERG, P. L.; BEDFORD, K.; STOKES, S. Sensitivity of *Penicillium* spp. and *Botrytis cinerea* to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. *Crop protection*, v.24, n.2, p.127-134, fev., 2005.

SILVA, S.J.N.; SCHUCH, P.Z.; JABLONSKI, A. Determinação simultânea de 5-hidroximetilfurfural e patulina, em suco de maçã, por eletrocromatografia micelar. *Higiene Alimentar*, v.21, n.155, p.92-96, out., 2007.

SIMÃO, S. Tratado de fruticultura. Piracicaba-SP: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. 760 p.

SOMMER, N. F.; BUCHANAN, J. R.; FORTLAGE, R. J. Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology*, v.28, n.4, 1974.

STATISTICA FOR WINDOWS 5.0. Inc. Tulska OK, USA, 1995.

STEINER, I.; WERNER, D.; WASHUTTI, J. Patulin in fruit juices. Part 1. Analysis and control in Austrian apple and pear juices. *Ernaehrung*, v.23, p.202-208, 1999.

STINSON, E. E.; OSMAN, S. F.; HUHTANEN, C. N.; BILLS, D. D. Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Appl. Envir. Microbiol.*, v.36, n.4, p.620-622. oct., 1978.

STINSON, E. E.; OSMAN, S. F.; BILLS, D. D. Water-soluble products from patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *J. Food Sci.*, v.44, p.789-796. may/june., 1979.

STOTT, W. T.; BULLERMAN, L. B. Influence of carbohydrate and nitrogen source on patulin production by *Penicillium patulum*. *Appl. Microbiol.*, v.30, p.850-854, 1975.

SUMBU, Z. L.; THONART, P.; BECHET, J. Action of patulin on a yeast. *Appl. Envir. Microbiol.*, v.45, n.1, p.110-115, jan., 1983.

SYDENHAM, E. W.; VISMER, F. H.; WALTER, F. O.; MARASAS, N. B.; SCHELECHTER, M. Reduction of patulin in apple juice samples: influence of initial processing. *Food Control*, v.6, n.4, p. 195-200, 1995.

SYLOS, C. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. *Food Add. Cont.*, 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.

TAVARES, S.C.C.H. Controle biológico clássico de patógenos de frutas no Brasil - situação atual. In: V SINCOBIOL, Foz do Iguaçu, 1996. Anais: Conferências e palestras, p. 57-68, 1996.

TEIXIDO, N.; USALL, J.; VINAS, I. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, v.50, n.3, p.203-210, 1999.

TODA FRUTA. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>> Acesso em: 20/06/08.

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.

TSAI, T.H. Assaying protein unbound drugs using microdialysis techniques. *Journal of Chromatography B*, v.797, p.161-173, 2003.

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

UNITED KINGDOM. Ministry of Agriculture Fisheries And Food. Patulin in apple juice. Survey. *Food Surveillance Information Sheet*, n.16, oct.1993.

UNITED KINGDOM. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. News releases: MAFF and industry work together on food safety, 1998.

USALL, J.; TEIXIDO, N.; TORRES, R.; DE ERIBE, X.O.; VINAS, I. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 21, n. 2, p. 147-156, 2001.

VOLPE, P.; FILHO, E. A. S. Estudo da interação proteína-surfactante pelo método de equilíbrio de diálise. *Química Nova*, v.17, n.2, p.199-204, 1994.

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

WANG, C.; EUFEMI, M.; TURANO, C.; GIARTOSIO, A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*, v.35, n.23, p.7299-7307, 1996.

WATKINS, K. L.; FAZERAS, G.; PALMER, M. V. Patulin in Australian apple juice. *Food Australia*, v.42, n.9, p.438-439, 1990.

WATKINS, C.; HARKER, R.; BROOKFIELD, P.; TUSTIN, S. Maturity of Royal Gala, Breabum and Fuji - The New Zealand Experience. *Annual Washington Tree Fruit Postharvest Conference*, Wenatchee (USA), v.9, p.16-19, 1993.

WELKE, J.E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H.A.; NOLL, I.B. [1] Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector. *Food Additives and Contaminants*. v. 26, n. 5, p. 754–758, maio 2009.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H.A.; NOLL, I.B. [2] Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã. *Brazilian Journal of Food Technology (ITAL)*, v.11, p. 78-83, 2009.

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

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

WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C. L. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables. *Rec. Adv. HortScience*, v.27, p.94-98, 1992.

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

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.19-28, jan., 2002.

WU, R.N.; HAN, F.L.; SHANG, J.; HU, H.; HAN, L. Analysis of patulin in apple products by liquid-liquid extraction, solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods: a comparative study. *European Food Research and Technology*. n.228, p.1009-1014, 2009.

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.

ZEGOTA, H.; ZEGOTA, A.; BACHMAN, S. Effect of irradiation on the patulin content and chemical composition of apple juice concentrate. *Lebensm Unters Forsch*, p.235-238. sep., 1988.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 26 / 02 / 2010

Marcos G. Celli

Marcos Giovanni Celli