

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

MARCOS GIOVANI CELLI

PATULINA EM MAÇÃS E EM PRODUTOS DERIVADOS. ASPECTOS
SANITÁRIOS E CONTROLE EMPREGANDO *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE.

PONTA GROSSA
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

MARCOS GIOVANI CELLI

PATULINA EM MAÇÃS E EM PRODUTOS DERIVADOS. ASPECTOS
SANITÁRIOS E CONTROLE EMPREGANDO *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE.

Dissertação apresentada como um dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Wosiacki

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisabete Y. Sataque Ono

PONTA GROSSA
2006

MARCOS GIOVANI CELLI

**PATULINA EM MAÇÃS E EM PRODUTOS DERIVADOS. ASPECTOS
SANITÁRIOS E CONTROLE EMPREGANDO *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE*.**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ponta Grossa, 21 de Fevereiro de 2006.

Dr. Gilvan Wosiacki
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dr. Alessandro Nogueira
Pesquisador PRÓDOC da CAPES/UEPG

Dra. Elisa Y. Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

PONTA GROSSA
2006

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, pelas oportunidades oferecidas;

Ao coordenador do curso Professor Dr. Gilvan Wosiaki, pela incansável orientação, dedicação, incentivo, paciência, e amizade sem os quais este trabalho não seria possível;

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela orientação, atenção e apoio no desenvolvimento deste trabalho, e utilização do HPLC no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia-UEL;

Aos membros titulares Dra. Elisa Hirooka, Dra. Nelci Chiquetto Silva, Dr. Alessandro Nogueira, e suplentes da banca examinadora, pelas valiosas sugestões, que contribuíram para o aprimoramento desta Dissertação;

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

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela Bolsa de Mestrado;

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

Ao Mestre Adriano Wagner pela metodologia fornecida para pré-limpeza de amostras.

Às técnicas Adriana Pereira da Silva, Elaine Cunha Moreno, e em especial ao Dr. Alexandre Coelho pelo auxílio prestado nos experimentos de patulina e sobretudo, amizade, eternamente grato;

À Doutoranda Simone Fujii pelos incansáveis auxílios, dicas, dedicação, amizade e companheirismo durante o trabalho;

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação Audie, Genoveva, Krishina, Laylla, Ligia, Luciana, Luis Gustavo, Márcia, Maria Carolina, Marli, Simone, Thaís, Elisabete Hiromi Hashimoto, Cláudio, Alessandra B. Ribeiro, Laisiane da Nóbrega e Ricardo Reche Ribeiro pela alegria, companheirismo e amizade;

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, em especial à Patrícia Sambatti, por sempre me ajudarem quando precisava, obrigado;

Às técnicas de laboratório Danianne, Denise e Rita;

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

Aos amigos Carmen Lígia, Claucieni, Cláudia Edu, Graciela pelo apoio constante nos momentos mais difíceis, muito obrigado;

Aos meus pais Norberto Celli 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, verificar a sua presença em sucos comerciais e monitorar a degradação no processo fermentativo típico utilizando ***Saccharomyces cerevisiae***. 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 limite de detecção e de quantificação foram 6,7 e 33,5 µg/L, respectivamente. Foram analisados frutos de maçã *in natura* tendo sido constatada a presença de patulina em todas as 22 amostras, em concentrações que variaram de 0,1 a 120,4 µg/g de tecido na porção deteriorada e de 0,02 a 5,02 µg/g de tecido, na sadia. Em maçãs da cultivar Gala foi observada um aumento da concentração da toxina relacionado ao aumento da massa contaminada. Em maçãs da cultivar Fuji foi observado um aumento do teor de patulina relacionado ao peso da massa nas amostras de menor tamanho e à medida que a massa era maior, os teores de patulina encontrados foram mais baixos, tendo sido observada a presença de células de leveduras, neste caso. A qualidade dos sucos comerciais mostrou-se satisfatória, pois não foi detectada a presença de patulina em 38 amostras analisadas, o que sugere que esta micotoxina possa não se constituir em um problema sério nas condições de industrialização de maçã na Região Sul do país. Sucos de maçã contendo 4,5 e 7,0 µg de patulina/mL, respectivamente, foram inoculados com 25g de células de levedura seca ativa/hL, sendo observada uma redução no teor de toxina de 96% e 90%, respectivamente, ao final do processo fermentativo. Numa segunda análise, sucos de maçã contendo 7,0 µg de patulina/mL foram inoculados com ***S. cerevisiae***, tendo sido observada uma diminuição da população de células vivas de levedura durante o crescimento, sendo a toxina totalmente eliminada em 120 horas de fermentação. A diminuição do açúcar e a formação de álcool não tiveram diferenças quando comparado ao controle, porém a concentração final de nitrogênio foi menor no fermentado contendo a toxina.

Palavras-chave: patulina, suco, fermentado, ***Saccharomyces cerevisiae***, desintoxicação.

ABSTRACT

Patulin, a potential carcinogenic, mutagenic and teratogenic toxin produced by *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. and *Byssoclamys* sp., may be found in apples, apple juices and other non fermented apple products. In fermented beverages, however, such toxin is not usually detected even when the raw material is evidently contaminated with molds. In this work it was planned to quantify this mycotoxin both in the contaminated portion of apples and in the apparently healthy portion next to the contaminated part, to verify its presence in commercial apple juices and to follow its elimination during a fermentative procedure with *Saccharomyces cerevisiae*. The toxin was quantified by HPLC in an isocratic system with reverse phase and UV detection at 275 nm. The recovery degree of patulin was 86,24% and the detection and quantification boundaries were 6,7 e 33,5 µg/L, respectively. Samples of apple containing microbial injuries were analysed and patulin was found in all 22 selected fruits, from 0.1 a 120.4 µg/g in the rotten tissue and from 0,02 up to 5,02 µg/g in the surrounding tissue, in the range of 1 cm, apparently healthy. In Gala cultivars it was found patulin in amounts directly related with the size of microbiologically injured tissue. However, in apples Fuji cv. it was found an different behaviour, with amounts of patulin increasing in the less contaminated samples but decreasing in the fruits in which the rotten tissue were larger. In such cases, some yeasts were found in the rotten tissue. The commercial apple juices quality was considered normal once it was not found any trace of patulina in 38 samples bought in local market, what suggests that this mycotoxin may be not a real problem under the conditions of apple processing available in South Region of the country. Apple juices containing patulin, 4.5 and 7.0 µg/mL, respectively, were inoculated with 25g a commercial yeast dry cells/hL, and it was observed an elimination of 96% and 90%, respectively. In another experiment, apple juice containing patulin at a concentration of 7,0 µg/mL were inoculated *S. cerevisiae*, and the population of live cells were lower in all growing phases as well as the mycotoxin was completely eliminated from the growing media at 120 hours. Both the sugar consumption and ethanol production were similar as compared to the control but the nitrogen final level was lower in the fermentation containing patulin.

Key words: patulin, apple, juice, fermented beverage, *Saccharomyces cerevisiae*, detoxication.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 01 – Ingredientes descritos na rotulagem dos produtos de maçã analisados.	33
Tabela 01 – Taxa de recuperação de patulina adicionada em suco de maçã.	42
Tabela 02 – Incidência de patulina em maçãs deterioradas, cultivar Fuji, Gala e Red star.	44
Tabela 03 – Concentrações de patulina determinadas durante experimento cinético com suco de maçã comercial contendo patulina e inoculado com <i>S. cerevisiae</i> .	54
Tabela 04 – Degradação de patulina por <i>S. cerevisiae</i> e efeito da toxina sobre o crescimento da levedura.	57
Tabela 05 – Parâmetros analisados durante as fermentações.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Morfologia do <i>Penicillium expansum</i> . (Aumento de 400X).	18
Figura 02 – Estrutura molecular da Patulina.	20
Figura 03 – Metabolismo secundário. Formação de Patulina.	21
Figura 04 – Produtos da degradação da patulina.	28
Figura 05A – Curva de calibração de patulina.	41
Figura 05B – Cromatograma de padrão.	41
Figura 06 – Aspecto microscópico de bolor crescido sobre a superfície de maçã deteriorada (aumento de 400X).	43
Figura 07 – Aspecto de maçãs com diferentes graus de podridão causada por fungos deteriorantes.	43
Figura 08a – Concentração de patulina em maçãs cultivar Fuji.	46
Figura 08b – Curvas de tendências das maçãs cultivar Fuji.	47
Figura 09a – Concentração de patulina em maçãs cultivar Gala.	48
Figura 09b – Curvas de tendências das maçãs cultivar Gala.	49
Figura 10a – Concentração de patulina em maçãs cultivar Red Star.	49
Figura 10b – Curvas de tendência das maçãs cultivar Red star.	50
Figura 11 – Eliminação de patulina por <i>S. cerevisiae</i> .	55
Figura 12 – Concentração de patulina no meio de fermentação inoculado com <i>S. cerevisiae</i> .	59
Figura 13 – Evolução do número de células vivas de <i>S. cerevisiae</i> .	59
Figura 14 – Concentração de nitrogênio no meio de fermentação.	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	MAÇÃ	12
2.1.1	Cultura no país	12
2.1.2	Colheita e armazenagem	13
2.1.3	Produção de maçãs no Brasil e no Mundo	13
2.2	SUCO DE MAÇÃ	15
2.2.1	Produção e consumo	15
2.2.2	Qualidade e legislação	16
2.3	FUNGOS E DOENÇAS	16
2.3.1	Principais microrganismos produtores de patulina	17
2.3.2	Controle do fungo	18
2.4	AS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE PATULINA	20
2.4.1	A incidência de patulina alimentos	22
2.4.2	Degradação de patulina	27
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MATERIAL	32
4.1.1	Cepa de microrganismo toxigênico	32
4.1.2	Levedura teste	32
4.1.3	Patulina Padrão e produtos químicos	32
4.1.4	Maçãs e seus produtos	33
4.2	MÉTODOS	34
4.2.1	Padronização da metodologia	34
4.2.1.1	Preparo de soluções padrões de trabalho	34
4.2.1.2	Produção de patulina e teste de toxigenicidade	34
4.2.1.3	Extração de patulina dos frutos contaminados	35
4.2.1.4	Extração de patulina de sucos industrializados	35
4.2.1.5	Extração de patulina de sucos fermentados	36
4.2.1.6	Quantificação da patulina	36
4.2.1.7	Determinação de limites de detecção, limite de quantificação e grau de recuperação	37
4.2.2	Determinação da presença de patulina em frutos contaminados	37
4.2.2.1	Análise da morfologia do fungo encontrado em maçãs	37
4.2.3	Determinação de patulina em sucos industrializados	38
4.2.4	Comprovação da eliminação de patulina por fermentação	38
4.2.4.1	Fermentação do suco comercial	38
4.2.4.2	Obtenção e fermentação do suco de maçã	38
4.2.4.2.1	Crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	39
4.2.4.2.2	Análises químicas do mosto em fermentação	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA PATULINA	41
5.2	PATULINA EM MAÇÃS CONTAMINADAS	42
5.3	DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PATULINA EM SUCOS DE	51

5.4	MAÇÃ COMPROVAÇÃO DA ELIMINAÇÃO DE PATULINA POR FERMENTAÇÃO	54
6	CONCLUSÕES	63

APÊNDICE

Apêndice 1 - Fluxograma 1 - Quantificação de patulina padrão por espectrofotômetro	72
Apêndice 2 - Fluxograma 2 - Extração de patulina do cultivo de <i>P. expansum</i>	73
Apêndice 3 - Fluxograma 3 - Extração de patulina de sucos comerciais de maçã	74
Apêndice 4 - Fluxograma 4 - Clarificação do extrato em coluna cromatográfica e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência	75
Apêndice 5 - Fluxograma 5 – Comprovação da eliminação de patulina por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	76
Apêndice 6 - Fluxograma 6 - Eliminação de patulina por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
Apêndice 6 - Fluxograma 6 - Quantificação de patulina em maçãs <i>in natura</i>	78

1 INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkhausen) foi a segunda fruta mais exportada no ano de 2004 pelo Brasil, ocupando o 5º lugar no fornecimento das principais variedades (Fuji, Gala e Golden delicious). O setor agroindustrial da maçã está balizado a suprir o mercado consumidor durante todo o ano com frutas para consumo *in natura* ou com produtos nobres como sucos, vinhos e aguardentes. Neste sentido é fácil e oportuno observar as características necessárias de acordo com a finalidade dos frutos: no primeiro caso, as maçãs comerciais devem ser de boa aparência, suculentas e agradáveis ao paladar enquanto que no segundo, as características que importam são os teores de ácidos e de compostos fenólicos além dos teores de açúcar que, em ambos os casos, devem ser altos.

Em países com tradição no processamento de maçãs as fábricas são supridas com frutas de variedades industriais, usualmente rústicas, colhidas e transportadas para as unidades de processamento onde não há processo de seleção como aqueles utilizados no caso de frutas de mesa. Em países que começam a processar maçãs, como o caso do Brasil, a matéria-prima disponível é a desqualificada para uso *in natura*, considerados grupo de descarte por defeitos diversos, como picadas de pássaros, injúrias mecânicas, cicatrizes na epiderme, má formação do fruto, distribuição não uniforme da coloração e problemas fitossanitários. Assim as maçãs industriais disponíveis no país são atípicas se comparadas às dos países tradicionalmente processadores de sucos e ou bebidas fermentadas.

Mas em qualquer um dos casos, a matéria-prima deve ser sadia, pois se houver infestação com microrganismos, existe a possibilidade de carrear para dentro do processo, problemas sérios como a presença de patulina, uma micotoxina termorresistente, cancerígena e letal, produzida por muitos microrganismos, destacando-se o *Penicillium expansum*. A patulina pode estar presente em produtos obtidos a partir de maçãs em unidades de elevado

porte, mas em unidades menores e se os responsáveis se preocupam com a qualidade, isto não acontece, a menos que haja uma falta de conhecimento.

A contaminação de sucos de maçã por patulina ocorre principalmente em períodos de baixa produção ou entressafras quando a matéria-prima é escassa. Para manter a produção, maçãs de baixa qualidade, mesmo apresentando manchas, podridão e outros tipos de deterioração, são utilizadas juntamente com maçãs sadias na produção de suco.

A monitoração da toxina em alguns países mostra uma grande incidência de patulina em produtos de maçã e para isso diferentes técnicas são pesquisadas para redução dos níveis nos alimentos. Esse problema apresenta-se minimizado em produtos fermentados, pois as leveduras diminuem ou até eliminam a presença de patulina mesmo que ela tenha sido intencionalmente adicionada em ensaios experimentais.

Não existe legislação brasileira para patulina em alimentos, porém, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um máximo de 50 µg/L em bebidas e de 25 µg/L em alimentos infantis.

Nesta fase onde ainda a produção de suco de maçã é incipiente no país, parece ser oportuna a divulgação de resultados quanto à incidência de patulina em frutas e produtos disponíveis no mercado consumidor e quanto às boas práticas de processamento em unidades do pequeno ao grande porte. Esta proposição atende ainda a implantação de uma estrutura operacional de identificação e quantificação de micotoxinas em nível de laboratório buscando uma parceria a fim de garantir a qualidade da atividade, a ser realizada, à medida do possível, em tempo real. Além disso, monitorar a degradação de patulina pelo processo fermentativo tem grande importância ajudando a elucidar um mecanismo para desintoxicação de alimentos processados de maçã.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MAÇÃ

Até os dias de hoje 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. Podem ser, por exemplo, a *Malus sylvestris* originária da Europa, a *Malus prinifolia* originária do Cáucaso e de parte da Rússia, ou todas elas em conjunto. Em suas variedades, os frutos da macieira podem ser distinguidos e agrupados por suas qualidades e sabor, tamanho, forma, aparência e consistência da polpa e da casca, e por suas distintas utilidades. Basicamente as maçãs podem ser de três tipos: de mesa, de cozinhar ou próprias à fabricação da sidra ou do vinagre. Apesar das inúmeras variedades de maçã existentes, uma mesma árvore pode fornecer frutos com diferentes aproveitamentos, de acordo com a sua classificação. De fato o seu alto teor de potássio e pela capacidade de produzir boas qualidades de fibras, a maçã é fruta indicada para a manutenção da saúde, para prevenção de doenças cardíacas e de excesso de colesterol no sangue, e para dietas alimentares de emagrecimento (TODA FRUTA, 2005).

2.1.1 Cultura no país

Condições climáticas favoráveis são essenciais para a produtividade da macieira, limitando seu plantio nas regiões de clima temperado, colocando o Brasil em posição privilegiada em relação às demais nações (SIMÃO, 1998).

A produção de fruta brasileira superou os 38 milhões de toneladas em 2002, classificando o país entre os quatro maiores produtores mundiais juntamente com a China, Índia e EUA (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION-FAO, 2005; INSTITUTO

BRASILEIRO DE FRUTAS-IBRAF, 2005). Do total produzido, 53% destina-se ao consumo nacional *in natura*, 46% à indústria processadora e apenas 1,5% à exportação de frutas frescas, evidenciando a necessidade de incentivo para agilizar maior inserção no mercado internacional (FAO, 2005).

2.1.2 Colheita e armazenagem

A colheita dos frutos é variável, de acordo com os critérios de qualidade relacionados a características que se desenvolvem pós-colheita, durante a maturação dos frutos (TU; NICOLAI; DE BAERDEMAEKER, 2000). Frutos destinados a comercialização imediata e à exportação são aqueles que apresentam melhor qualidade em termos de aparência. Frutos de maior tamanho, mais aromáticos, com elevado teor de sólidos solúveis e com coloração avermelhada 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 et al., 1998).

2.1.3 Produção de maçãs no Brasil e no Mundo

Dentre os maiores produtores de maçã, o Brasil ocupa a 15ª posição e o 8º lugar em eficiência de produção (FAO, 2005; IBRAF, 2005).

A safra nacional de maçã 03/04 atingiu 980 mil toneladas, indicando aumento de 17% em comparação com os dados da produção anterior (produção de 835 mil toneladas) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 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 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). A Região Sul do país apresenta o clima mais propício para produção de maçã, sendo responsável por 98% da produção nacional na safra 03/04, com 40 mil toneladas provenientes do Estado do Paraná (PR), 353 mil toneladas do Rio Grande do Sul (RS) e 583 mil toneladas de Santa Catarina (SC) (IBGE, 2004; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MAPA, 2005). 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).

As exportações brasileiras de frutas *in natura* geraram divisas de 369.756 milhões de dólares em 2004, sendo que cerca de 30 milhões foram decorrentes da maçã e seus derivados (IBRAF, 2005).

2.2 SUCO DE MAÇÃ

O suco de maçã é o produto extraído da fruta por moagem ou extração (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., 1996). 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.

2.2.1 Produção e consumo

Como acontece com a maioria das produções agrícolas, existe um fração de safra de maçã que acaba não sendo comercializado no mercado *in natura*, que pode chegar a 30% da produção nacional, sendo destinado à industrialização (WOSIACKI et al., 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 quanto 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; WOSIACKI et al., 1995).

2.2.2 Qualidade e legislação

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).

2.3 FUNGOS E DOENÇAS

Uma das maiores perdas econômicas é causada por contaminação do fruto por fungos, ocorrendo em qualquer estágio da maçã, crescimento, colheita e/ou amadurecimento e armazenagem. Após a colheita estes alimentos tornam-se ainda mais susceptíveis à contaminação por fungos, ficando impróprios para o consumo, gerando perdas econômicas (LUGAUSKAS; STAKENIENE, 2002).

Um grande número de fungos produz metabólitos secundários e alguns desses apresentam potencial toxigênico (micotoxinas) desempenhando um importante papel na contaminação de alimentos para consumo humano e animal. A formação de micotoxinas é dependente de fatores endógenos e ambientais, permanecendo também no tecido sadio das frutas. Essa difusão pode ocorrer independente do tipo de fungo e da micotoxina produzida (BENNETT; KLICH, 2003; SCUSSEL, 1998).

Dentre as espécies de fungos que contaminam naturalmente maçãs, 66% tem a capacidade de produzir uma micotoxina denominada patulina, sendo eles do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoclamys* (STOTT; BULLERMAN, 1975).

2.3.1 Principais microrganismos produtores de patulina

A patulina é produzida em alimentos por vários fungos como *Aspergillus spp*, *Byssochlamys spp* e *Penicillium spp* destacando-se com especial importância e interesse o *Penicillium expansum* (Figura 01) parasita facultativo que invade frutas danificadas causando podridão, mais comum em maçãs, podendo assim ocorrer patulina em suco de maçã fresco. Normalmente encontrada em altas concentrações na parte espoliada da fruta (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 produzida por *Aspergillus clavatus* em materiais como resíduos de cevada maltados e restos de cereal no campo. *Byssochlamys nivea* e *Byssochlamys fulva* também produzem patulina e são importantes em silagem (SCUSSEL, 1998).

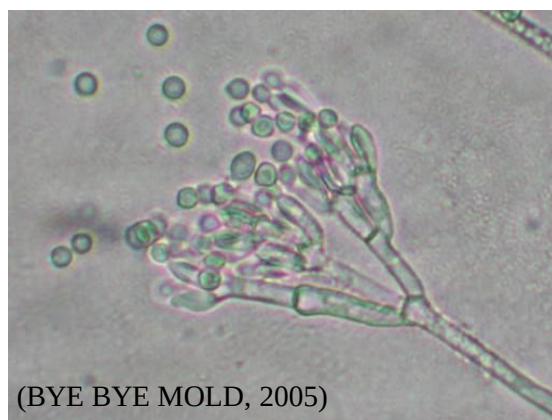


Figura 01 – Morfologia do *Penicillium expansum*. (Aumento de 400X).

Penicillium spp é certamente o fungo toxigênico de maior incidência em maçãs, considerado um parasita de fermentos, 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).

Dombrink e Blackburn (2005) estudaram outras espécies de *Penicillium*, demonstrando que o *P. expansum* não é a cepa mais toxigênica, porém a de maior importância considerando a frequência com que é detectado e em todas as etapas do cultivo de maçã e o principal causador de podridões.

2.3.2 Controle do fungo

Tratamentos pós-colheita com fungicidas são utilizados para reduzir as deteriorações do fruto, como por exemplo, a aplicação do fungicida sintético imazalil (Freshgard® e Fungaflor®) 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, 2005). 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 utilizando microrganismos antagônicos (COELHO, 2005; LEVY et al., 2000) aplicação de antibióticos naturais (BATTÀ, 2004; SHOLBERG; BEDFORD; STOKES, 2005) e aplicação de produtos sanitizantes (CONWAY et al., 2004).

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 antibiograma. 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.

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 perante esporos de ***Penicillium 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 ***Penicillium 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.

2.4 AS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE PATULINA

A patulina, 4hidroxi-4furo[3,2-c]pirano(6H)-1 (Figura 02), uma micotoxina termo-resistente da classe hidroxifuropiranona e também chamada clavicina, claviformina ou expansina, apresenta fórmula empírica $C_7H_6O_4$ e seu peso molecular é de 154,12 Da e pode ser produzida como metabólito secundário por várias espécies de fungos. A patulina foi isolada pela primeira vez de *Penicillium claviforme*, nomeada claviformina, mas em razão de seu freqüente isolamento partindo de *Penicillium patulum*, hoje chama-se patulina. Apresenta estabilidade em ácidos diluídos e 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). 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 (SCUSSEL, 1998; GONÇALES; PINTO; FELICIO, 2001; MAJERUS; KAPP, 2002; RYCHLIK; SCHIEBERLE, 2001).

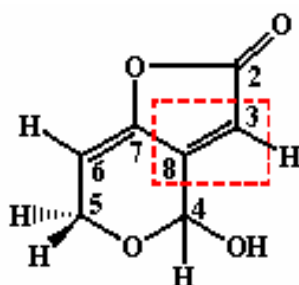


Figura 02 – Estrutura molecular da Patulina (SCUSSEL, 1998).

Formada pela via das policetidas (Figura 03), a patulina causa efeitos tóxicos em animais, de caráter teratogênico e cancerígeno em camundongos, além de lesões pulmonares, hepáticas e renais (GOKMEN; ACAR, 1998; RICHARD et al., 2003), efeitos gastrointestinais e neurotóxicos (HOPKINS, 1993) e imunotóxicos (SHARMA, 1993). A taxa de letalidade - DL_{50} para camundongos varia de 5 a 30 mg/kg de peso corpóreo (BOONZAAIJER; BODELDIJK; VAN OSENBRUGGEN, 2005). Segundo Moule e Hatey (1977), a dupla ligação presente na estrutura da patulina interage com o ácido nucléico, afetando a transcrição gênica e conseqüentemente a síntese de biomoléculas.

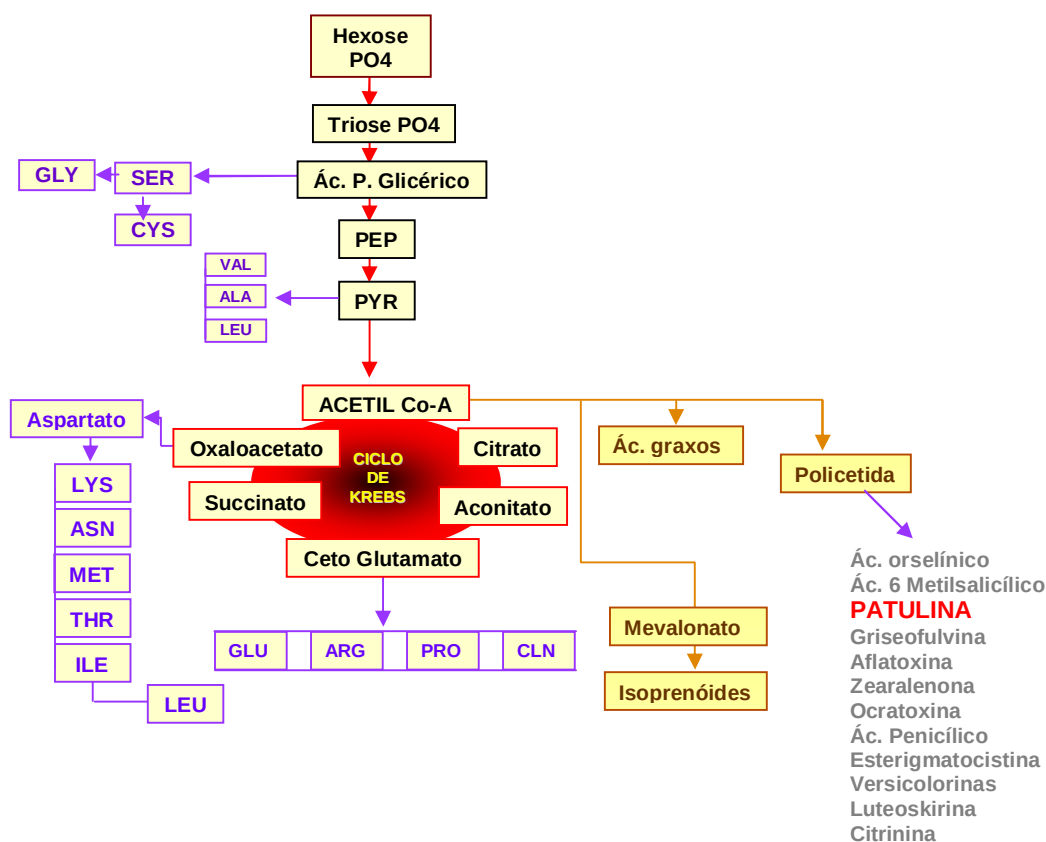


Figura 03 – Metabolismo secundário. Formação de Patulina. (Arte Gráfica: Dra. Elisa Y. Hirroka) (GRIFFIN, 1993).

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). Recentemente, 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 (EUROPEAN COMMISSION, 2003; BOONZAAIJER; BODELDIJK; VAN OSENBRUGGEN, 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) alterou o limite de ingestão de 7,0 para 0,4 µg/kg de peso corpóreo/dia (BOLGER, 2002; BAERT et al., 2004).

2.4.1 A 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 (BISSEUR; 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 significativamente o conteúdo de patulina no suco, mas em pequena quantidade (16%) (BISSEUR; PERMAUL; ODHAV, 2001). A temperatura empregada para pasteurização ou para produção de suco concentrado acaba por degradar 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 levantam a hipótese que a baixa incidência de patulina possa 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 da 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 utilizando amostras de 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 melhores recuperações, além de ser rápido e de baixo custo. A solução clareada deste método 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 massa 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 0,05 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 livres 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). Brackett e Marth (1979) e Anon (1999) detectaram 10 a 350 µg/L e acima de 50 µg/L de patulina em 58 e 2,5% de amostras de sucos de maçã em Wisconsin e Londres, 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 (GOKMEN; ACAR, 1998). 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. 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).

Outra pesquisa foi desenvolvida afim 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).

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 à 1°C.

Em 2001, Kryger verificou a possível contaminação por patulina no aroma de maçã, um destilado de interesse comercial produzido durante a concentração de suco. 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.

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 cicloheximida, um inibidor de síntese protéica.

Drilleau e Bohoun (1973) analisaram 8 sidras francesas e 5 sidras dos EUA, encontrando patulina em 5 e 4 amostras, respectivamente. Visto que os processos utilizados são os mesmo 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 (FSA) realizou um estudo em 100 amostras de sidras comerciais, não encontrando concentrações detectáveis de patulina (limite de detecção de 3 µg/L). Enfatiza que o processo fermentativo por *S. cerevisiae* é capaz de degradar de 93 a 99% da toxina inicial.

2.4.2 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 desintoxicação biológica efetuada pela microbiota presente no próprio fruto (HARWIG et al., 1973; KARLOVSKY, 1999; ROSS, 1995; WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995).

Karlovsky (1999) citou a desintoxicação 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 para isto, patulina marcada com ¹⁴C. 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 CO₂ a partir da patulina.

Diferente de Stinson; Osman e Bills (1979) que haviam relatado a formação de CO₂, Moss e Long (2002) verificam que não há formação de componentes gasosos pela degradação de patulina. Ao utilizar a patulina marcada com ¹⁴C, 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 pesos moleculares inferiores, sendo que nenhum desses compostos era gasoso nem apresentaram volatilidade.

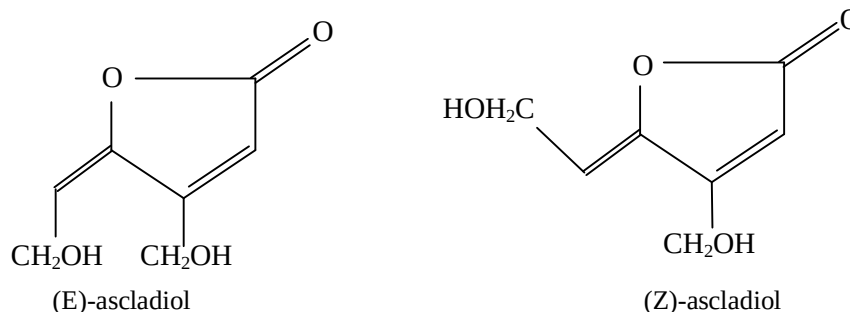


Figura 04 – Produtos da degradação da patulina (MOSS; LONG, 2002).

Stinson et al.(1978) projetaram um estudo para avaliar a persistência de patulina em suco de maçã durante a fermentação utilizando para isto, 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 confiando 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 estava presente e foi encontrado que 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.

Ao considerar 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 (LEVY et al., 2002; COELHO et al., 2004), 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 diminuiu mais de 99% da toxina inicialmente adicionada após 15 dias de incubação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir mediante conhecimentos técnico-científicos com a garantia de qualidade de maçã e produtos obtidos a partir de maçã no que diz respeito à presença da micotoxina termoestável patulina produzidas por bolores em frutos contaminados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validar a metodologia de análise de patulina presente em maçãs 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.

Verificar a presença de patulina em sucos industrializados.

Determinar a eliminação da patulina no processo de fermentação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Cepa de microrganismo toxigênico

Foi utilizada a cepa toxigênica de *P. expansum* nº 2 (LEVY; HIROOKA, 1999) isolada de maçã cv. Gala (1999), possuindo uma toxigenicidade de 107 µg de patulina/mL quando cultivada em Caldo Extrato de Malte por 15 dias a 25°C. A amostra do microrganismo, proveniente de cultura monospórica (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983), foi mantida em Ágar Batata Dextrose-BDA inclinado a 4°C na ausência de luz.

4.1.2 Levedura teste

Saccharomyces cerevisiae LALVIN ICV D47 (Lalvin®) foi selecionada para realização dos ensaios de fermentação por ser uma levedura comercial comumente utilizada na produção de vinho de maçã, e por apresentar a propriedade de eliminar patulina do meio de cultivo.

4.1.3 Patulina Padrão e produtos químicos

Patulina com 99,0% de pureza (ACROS, Nova Jersey, USA), produtos químicos de grau cromatográficos foram utilizados nas análises de quantificação de patulina, sendo que nas demais, foram utilizados de grau P.A.

4.1.4 Maçãs e seus produtos

Maçãs foram adquiridas do comércio varejista apresentando pontos de infecção fúngica, para quantificação de patulina na porção deteriorada e na porção sadia próxima.

Amostras de 38 sucos de maçã comerciais em embalagens Tetrapak[®] foram coletadas na região de Ponta Grossa – PR, mas produzidas na região Sul e Sudeste no período de 19/out/04 a 08/jan/05, compreendendo produtos prontos para consumo com açúcar (23), sem açúcar (10) e enriquecido com soja (5). As marcas utilizadas foram coletadas aleatoriamente de diferentes pontos comerciais e acompanhadas em lotes diferentes durante o período de coleta.

O quadro 1 mostra os ingredientes descritos na rotulagem que são utilizados pela indústria para a produção de suco, néctar e suco de maçã enriquecido com soja.

Quadro 1 – Ingredientes descritos na rotulagem dos produtos de maçã analisados.

Ingredientes	Descrição
Suco de maçã	suco polposo de maçã acrescido de água.
Néctar de maçã	suco concentrado de maçã acrescido de água ou suco e polpa de maçã acrescidos de água.
Suco de maçã enriquecido com soja	suco concentrado de maçã acrescido de água e extrato de soja
Acidulantes	ác. cítrico, ác. málico
Antioxidantes	ác. Ascórbico
Anti-espumantes	INS 900
Estabilizante	INS 412, pectina cítrica
Edulcorantes	aspartame, acesulfame K, açúcar
Aroma	aroma natural de maçã

Produtos acondicionados em embalagem Tetrapak[®], esterilizados e envasados assepticamente.

Sucos destinados ao processo fermentativo corresponderam ao suco de maçã comercial sem adição de açúcar, contendo 11g de carboidratos/100mL e suco de maçã da cv. Gala produzido no laboratório.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Padronização da metodologia

O desempenho da metodologia para extração de patulina a ser utilizado nas condições de laboratório, foi avaliado por meio da determinação da recuperação, limite de detecção e de quantificação (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1998; VALENTE SOARES, 2001).

4.2.1.1 Preparo de soluções padrões de trabalho

Dez mg da película de padrão de patulina (99,0% de pureza - ACROS, Nova Jersey, USA) foi dissolvida em 1 mL de clorofórmio, subdividida em cinco frascos (200 µL), secas sob gás N₂ e estocadas a -20°C. Para uso, a película foi suspensa em etanol e quantificada a 275 nm em espectrofotômetro Cintra 20 (AOAC, 2000). Uma fração seca do padrão calibrado (500 µg/mL) 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.

4.2.1.2 Produção de patulina e teste de toxigenicidade

O fungo foi cultivado 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 submetido a três partições com 25 mL de acetato de etila e os extratos superiores combinados (75 mL) e desidratados, mantendo-se com 100 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 em coluna (500 x 10 mm, com 8,5 g de sílica gel 60G, 70-230 mesh, MERCK). A seguir procedeu a eluição com 75 mL de benzeno-acetato de etila (75:25) e o eluato evaporado a 40°C até atingir aproximadamente 5 mL, sendo seco sob fluxo de gás N₂ (AOAC, 2000).

4.2.1.3 Extração de patulina dos frutos contaminados

Os tecidos sãos e deteriorados foram triturados e homogenizados com auxílio de Gral e Pistilo e coletada uma alíquota de 10 g, submetidas a três partições com 10 mL de acetato de etila e os extratos superiores (30 mL) combinados e desidratados, mantendo-se 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 em coluna (80 x 15 mm, com 1,5 g de sulfato de sódio anidro e 3,5 g de sílica gel 60G, 70-230 mesh, MERCK). 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).

4.2.1.4 Extração de patulina de sucos industrializados

Alíquotas de 25 mL da amostra foram submetidas a três partições com 25 mL de acetato de etila e os extratos superiores combinados (75 mL) e desidratados, mantendo-se com 10 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 25 mL, ajustado seu volume para exatamente 25 mL e introduzido em coluna de pré-limpeza Romer Labs[®]. A seguir foi coletada uma fração de 2 mL do eluato, seca a 40°C sob fluxo de N₂ e armazenada a -20°C (AOAC, 2000).

4.2.1.5 Extração de patulina de sucos fermentados

Alíquotas de 25 mL da amostra foram submetidas a três partições com 25 mL de acetato de etila e os extratos superiores (75 mL) combinados e desidratados, mantendo-se com 10 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 25 mL, ajustado seu volume para exatamente 25 mL e introduzido em coluna (80 x 15 mm, com 1,5 g de sulfato de sódio anidro e 3,5 g de sílica gel 60G, 70-230 mesh, MERCK). 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).

4.2.1.6 Quantificação da patulina

O extrato foi suspenso em 500 µL de acetonitrila:água (1:9) e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (forno CTO-10A VP, bomba LC10AD e detector UV SPD-10, Shimadzu, Japão). Uma alíquota de 20µL da amostra foi aplicada em sistema isocrático de fase reversa utilizando coluna C₁₈ (5 µm, 250 x 4,6 mm I.D., Trennsäule), e fase móvel constituída de acetonitrila:água (5:95). O fluxo da fase móvel foi mantido a 1,5 mL/min a 30°C, sendo monitorado com leitura em detector UV 275 nm (KAWASHIMA; VALENTE SOARES; MASSAGUER, 2002); nestas condições a patulina apresentou tempo de retenção de 7,4 min. A patulina foi quantificada pela comparação das áreas dos picos das amostras com as áreas dos picos de concentrações conhecidas do padrão da toxina (0,020; 0,035; 0,050; 0,100; 0,200; 0,250 e 0,350 µg/mL).

4.2.1.7 Determinação de limites de detecção, limite de quantificação e grau de recuperação

O limite de detecção foi calculado como sendo três vezes o desvio padrão de 7 leituras do branco da amostra (menor concentração aceitável do analito, 0,020 µg/mL), e o limite de quantificação como sendo cinco vezes o limite de detecção. A recuperação foi avaliada em triplicata pela adição de 50, 100 e 150 µg de patulina/L, de suco comercial sem detecção de patulina, seguidos de extração, limpeza e quantificação.

4.2.2 Determinação da presença de patulina em frutos contaminados

Vinte e duas maçãs das cultivares Fuji (9), Gala (9) e Red star (4) coletadas do comércio local, apresentando diferentes graus de deterioração, foram pesadas, separadas as podridões e calculadas as porcentagens de deterioração do fruto relacionando peso/peso. As porções deterioradas variaram de 2,3 a 50,3% do fruto. Também foi analisada uma porção de tecido sadio, correspondendo à circunferência ao redor da lesão, tendo 1cm de espessura. Os tecidos sãos e deteriorados foram triturados separadamente, homogeneizados com auxílio de Gral e Pistilo, sendo coletada uma fração de 10 g para ser realizada a extração e quantificação de patulina.

4.2.2.1 Análise da morfologia do fungo encontrado em maçãs

Análises macroscópicas e microscópicas foram realizadas nas porções deterioradas das maçãs da cultivar Gala, Fuji e Red star para verificar os microrganismos presentes e a morfologia do fungo contaminante. Uma raspagem do tecido afetado foi depositada em

lâmina, umedecida com água destilada e observada em microscópio óptico com aumento de 400x, sem adição de corantes.

4.2.3 Determinação de patulina em sucos industrializados

As amostras de suco (38 amostras) foram homogeneizadas por agitação, as embalagens abertas assepticamente e três alíquotas de 25 mL foram retiradas para análises em repetição, sendo o restante mantido sob refrigeração como contraprova até o final dos ensaios e tratamento dos resultados.

4.2.4 Comprovação da eliminação de patulina por fermentação

4.2.4.1 Fermentação do suco comercial

Saccharomyces cerevisiae (LALVIN ICV D47) foi cultivada em Erlenmeyers testes de 100 mL contendo 50 mL de suco de maçã comercial contaminados com 4,5 e 7,0 µg de patulina/mL (SUMBU; THONART; BECHET, 1983). O inóculo consistiu de 25 g de levedura seca ativa/hL de suco de maçã e o sistema foi incubado a 25°C sem agitação, o que promoveu o metabolismo fermentativo, durante 6 dias. Todos os fermentadores estavam adaptados com uma mangueira para saída de gás produzido, o qual era mergulhado em um recipiente contendo uma solução de álcool e água para impedir a entrada de oxigênio e microrganismos contaminantes. A patulina foi devidamente extraída e quantificada. Fermentadores contendo apenas o suco e a toxina, preparados de forma estéril, serviram como controle da degradação da toxina pelo tempo.

4.2.4.2 Obtenção e fermentação do suco de maçã

As maçãs da cv. Gala, selecionadas e lavadas, foram trituradas em processador de pequeno porte (Máster super - Walita[®]) e o suco foi extraído em prensa hidráulica a 3kgf/cm² (1194 para 15 toneladas – Eureka[®]) 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 frascos âmbar testes de 60 mL contendo 40 mL de suco de maçã contaminados com 7,0 µg de patulina/mL (SUMBU; THONART; BECHET, 1983). O inóculo consistiu de 25 g de levedura seca ativa/hL de suco de maçã e o sistema foi incubado à temperatura ambiente (25 a 36°C) sem agitação para promover o metabolismo fermentativo, durante 10 dias. Todos os frascos estavam adaptados com uma mangueira para saída de gás produzido, o qual era mergulhado em um recipiente contendo uma solução de metabissulfito (3%) para impedir a entrada de oxigênio e microrganismos contaminantes. Frascos contendo *S. cerevisiae* e suco serviram como controle do crescimento da levedura.

4.2.4.2.1 Crescimento de *S. cerevisiae*

O crescimento de *S. cerevisiae* foi avaliado procedendo à contagem de células vivas em câmara de Neubauer juntamente com corante azul de metileno (1%) para corar as células mortas.

4.2.4.2.2 Análises químicas do mosto em fermentação

Os teores de açúcares redutores totais foram determinados pela metodologia clássica de Somogyi e Nelson após a hidrólise da sacarose, tendo sido expressos os resultados como glucose em g/100mL (NELSON, 1944).

O teor alcoólico foi determinado por ebulliometria (Ebuliômetro 3300, Metalurgia Leonardo Ltda), que se baseia na quantificação de álcool da amostra pela diferença de temperatura de ebulição da amostra quando comparado à temperatura de ebulição da água.

Nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl ($f = 6,25$), onde se determina a matéria nitrogenada total da amostra que é convertida à amônia por adição de ácido sulfúrico concentrado e aquecimento (AOAC, 1984).

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 0,020 a 0,350 µg/mL, com um coeficiente de correlação linear de 0,999. Nas condições de trabalho, o tempo de retenção da patulina foi de 7:44 min, como pode ser observado na Figura 05B. O desvio padrão do branco da amostra, de 2,23, foi utilizado para calcular o limite de detecção de patulina, 6,7 µg/L, e o limite de quantificação, 33,5 µg/L.

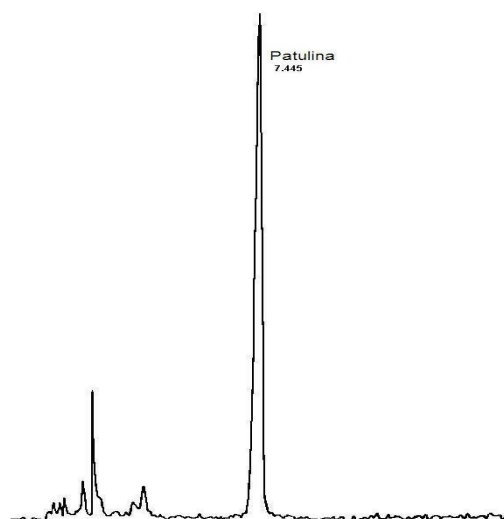
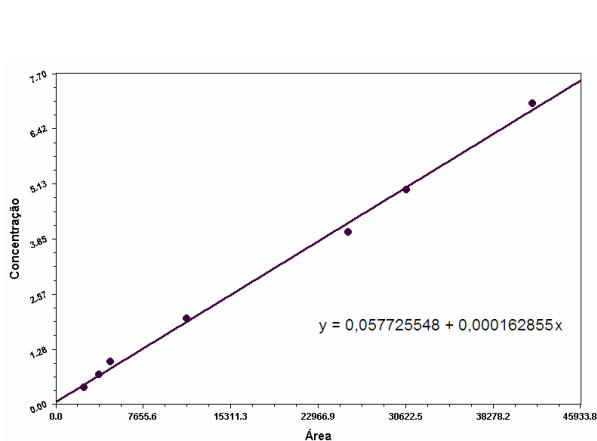


Figura 05A – Curva de calibração de patulina.

Figura 05B – Cromatograma de padrão.

Na Tabela 01 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 $86,24\% \pm 2,72$.

Tabela 01 – 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	

Fernandez-Trevejo, Verdes e Espinosa (2001) fizeram uma curva de calibração semelhante 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 obtiveram foi de 82,51%, a partir de níveis de contaminação de 0,020, 0,050 e 0,100 µg/mL.

5.2 PATULINA EM MAÇÃS CONTAMINADAS

Penicillium spp é o fungo contaminante de maior importância quando se trata de maçãs, por ser de maior frequência com que é detectado em todas as etapas do cultivo, causando podridões no fruto (DOMBRINK; BLACKBURN, 2005). ***Penicillium expansum***, considerado o principal parasita de lesões, causa podridão de coloração azul na parte externa da maçã, forma esporulada, e bege ou marrom-clara no tecido, deixando o fruto aguado e mole (HEFNAWY; ABOU-ZEID, 2003).

Em análise macroscópica e microscópica realizada na superfície de frutos *in natura*, observou o crescimento de bolores com coloração azul esverdeada indicando estrutura esporulada. A observação microscópica permitiu a identificação do fungo filamentososo do gênero ***Penicillium*** conforme apresentado na Figura 06, sugerindo a presença de patulina.

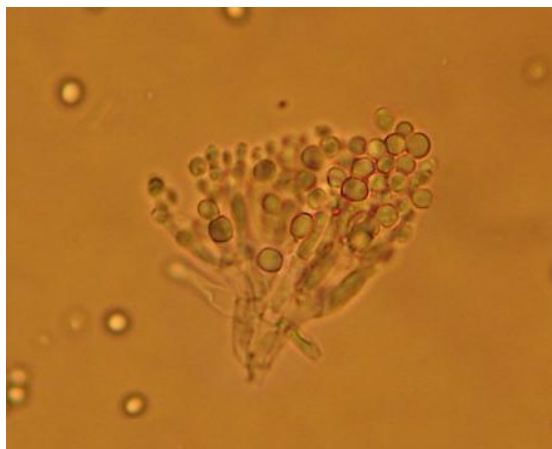


Figura 06 – Aspecto microscópico de bolor crescido sobre a superfície de maçã deteriorada (aumento de 400X).

Procedendo à quantificação de patulina em maçãs *in natura*, todas as 22 amostras mostraram-se positivas, com níveis variando de 0,1 a 120,4 $\mu\text{g/g}$ no tecido deteriorado e de 0,02 a 5,02 $\mu\text{g/g}$ no tecido sadio (Tabela 02) (Figura 07), concordando com Beretta et al. (2000), que encontraram a toxina em 80,7% dos 26 frutos analisados, sendo estes orgânicos e não orgânicos.

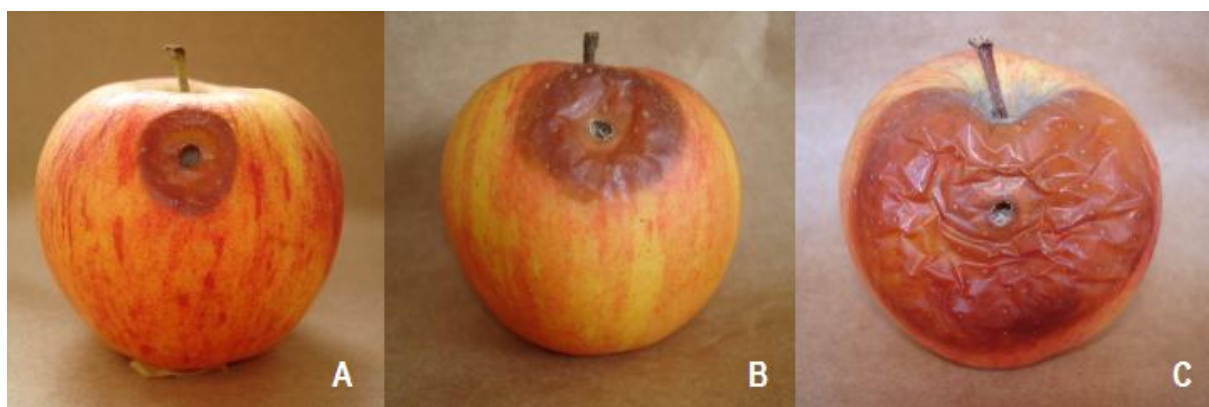


Figura 07 – Aspecto de maçãs com diferentes graus de podridão causada por fungos deteriorantes. (A) 2,5% de podridão. (B) 7,8% de podridão. (C) 38,6% de podridão.

Nenhuma das cultivares apresentou diferença significativa entre as médias de porcentagens de podridão, segundo teste de Tukey ($P < 0,05$). A média da concentração de patulina apresentou-se mais elevada na cultivar Gala, indicando uma maior intoxicação

mesmo quando as porcentagens de podridão dos frutos eram os mesmos das demais cultivares (Tabela 02).

Tabela 02 – Incidência de patulina em maçãs deterioradas, cultivar Fuji, Gala e Red star.

Amostra	Podridão		Tecido deteriorado		Tecido sadio		Tecido sadio	
	(g)	(%)	Quantidade de patulina (µg)	Concentração de patulina (µg/g)	(g)	(%)	Quantidade de patulina (µg)	Concentração de patulina (µg/g)
<u>Maçãs Cultivar Fuji</u>								
01	3,54	2,3	2,41	0,68	6,8	4,4	0,48	0,07
02	8,5	4,5	3,40	0,40	12,5	6,6	0,25	0,02
03	14,7	8,9	78,35	5,33	18,6	11,3	2,79	0,15
04	24,6	14,2	604,10	24,56	29,5	17,0	51,00	1,73
05	31,2	17,9	855,80	27,43	32,4	18,6	80,30	2,48
06	39,5	24,2	993,40	25,15	41,7	25,5	116,30	2,79
07	43,9	30,6	575,10	13,10	41,1	28,6	148,80	3,62
08	64,4	38,8	6,37	0,10	61	36,7	133,00	2,18
09	86,7	47,3	12,70	0,15	84,3	46,0	86,80	1,03
	35,23*	20,97*	347,96*	10,77*	36,44*	21,64*	68,86*	1,56*
<u>Maçãs Cultivar Gala</u>								
01	5,4	2,5	552,96	102,40	9,8	4,5	43,05	4,38
02	7,2	3,2	18,40	2,56	12,4	5,5	1,61	0,13
03	11,4	7,8	144,80	12,70	18,3	12,5	17,75	0,97
04	17,9	12,0	630,10	35,20	22,7	15,2	36,80	1,62
05	24,8	19,2	1180,50	47,60	25,6	19,8	60,70	2,37
06	34,9	27,5	3744,80	107,30	35,9	28,3	136,80	3,81
07	45,3	38,6	5454,10	120,40	45,8	39,0	189,10	4,13
08	51,6	43,7	6130,10	118,80	50,3	42,6	252,50	5,02
09	65,8	50,3	7609,80	115,65	61,0	46,6	291,00	4,77
	29,37*	22,76*	2829,51*	73,62*	31,32*	23,79*	114,37*	3,02*
<u>Maçãs Cultivar Red star</u>								
01	9,4	4,0	1,92	0,20	13,0	5,6	0,34	0,03
02	33,2	17,3	33,86	1,02	29,4	15,3	4,41	0,15
03	61,9	29,7	486,50	7,86	43,7	21,0	38,90	0,89
04	95,7	46,4	1846,70	19,3	54,2	26,2	114,30	2,11
	50,05*	24,35*	592,24*	7,10*	35,07*	17,04*	39,49*	0,79*

* = média dos valores da coluna para cada cultivar.

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 detectou-se concentrações preocupantes de patulina, que atingiram 5,02 µg/g de tecido (Tabela 02), acima do limite estabelecido pela FDA de 50 µg/Kg (RICHARD et al., 2003). Essas concentrações de patulina detectadas no tecido sadio se apresentaram-se crescentes com o aumento no diâmetro da podridão, exceto na cultivar Gala, onde as quantidades de toxina diminuíram à medida que diminuiu a patulina da porção deteriorada, porém, apresentaram proporção com a concentração de patulina presente na podridão. 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.

A cultivar Fuji apresentou maior quantidade de patulina na porção deteriorada, de 993,4 µg, quando esta atingiu 39,5 g, porém apresentou maior concentração de patulina/g de podridão (27,43 µg/g) quando a infecção era de 31,2 g. A cultivar Gala apresentou maior quantidade de patulina, 7609,80 µg, quando a porção deteriorada chegou a 65,8 g, porém apresentou maior concentração de patulina/g de podridão (120,4 µg/g) quando a infecção era de 45,3 g.

Foram observadas diferenças na concentração de patulina em relação à porcentagem de podridão do fruto. A cultivar Fuji apresentou contaminação intermediária de patulina que variou de 0,10 (traços) a 27,43 µg/g, sendo detectada uma concentração menor em frutos com podridão superior a 17,9% (Figura 08a). Nessas frutas com elevado grau de podridão, de 24,2 a 47,3%, e reduzida concentração de patulina quando comparadas às demais, de 25,15 a 0,15 µg/g, respectivamente, por microscopia óptica observou-se o aparecimento de leveduras (dados não mostrados), sugerindo um processo de eliminação da toxina ocasionada por esse microrganismo, conforme discutido anteriormente. Rychlik e Schieberle (2001) e Ross et al.

(1998) relataram o mesmo ocorrido em suas pesquisas, onde o aparecimento de fungos e a redução na concentração de toxina foram simultâneos.

Na porção sadia detectou-se toxina em quantidades proporcionais às quantidades apresentadas na porção deteriorada, porém, nos frutos que apresentaram maior porcentagem de podridão, os quais continham menos toxina quanto comparados aos demais, a patulina do tecido sadio não apresentou redução proporcional, mantendo-se elevada.

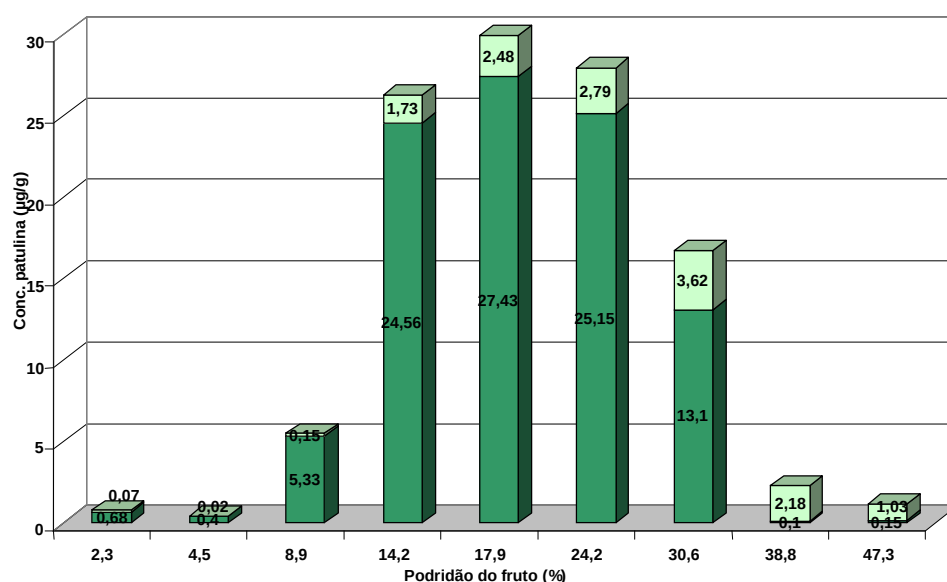


Figura 08a – Concentração de patulina em maçãs cultivar Fuji. □ concentração de patulina no tecido sadio; ■ concentração de patulina no tecido deteriorado.

As maçãs da cultivar Fuji apresentaram uma tendência na forma de curva hiperbólica (Figura 08b) quando correlacionados a patulina com a podridão do fruto, onde a quantidade de patulina inicial apresentou-se baixa, aumentando à medida que aumenta a podridão, atingindo um máximo de 993,40 µg de patulina. Essa toxina diminuiu após um peso de 24,2 g de tecido deteriorado, juntamente com o aparecimento de leveduras, sendo decrescente até o peso de podridão analisado de 86,7 g.

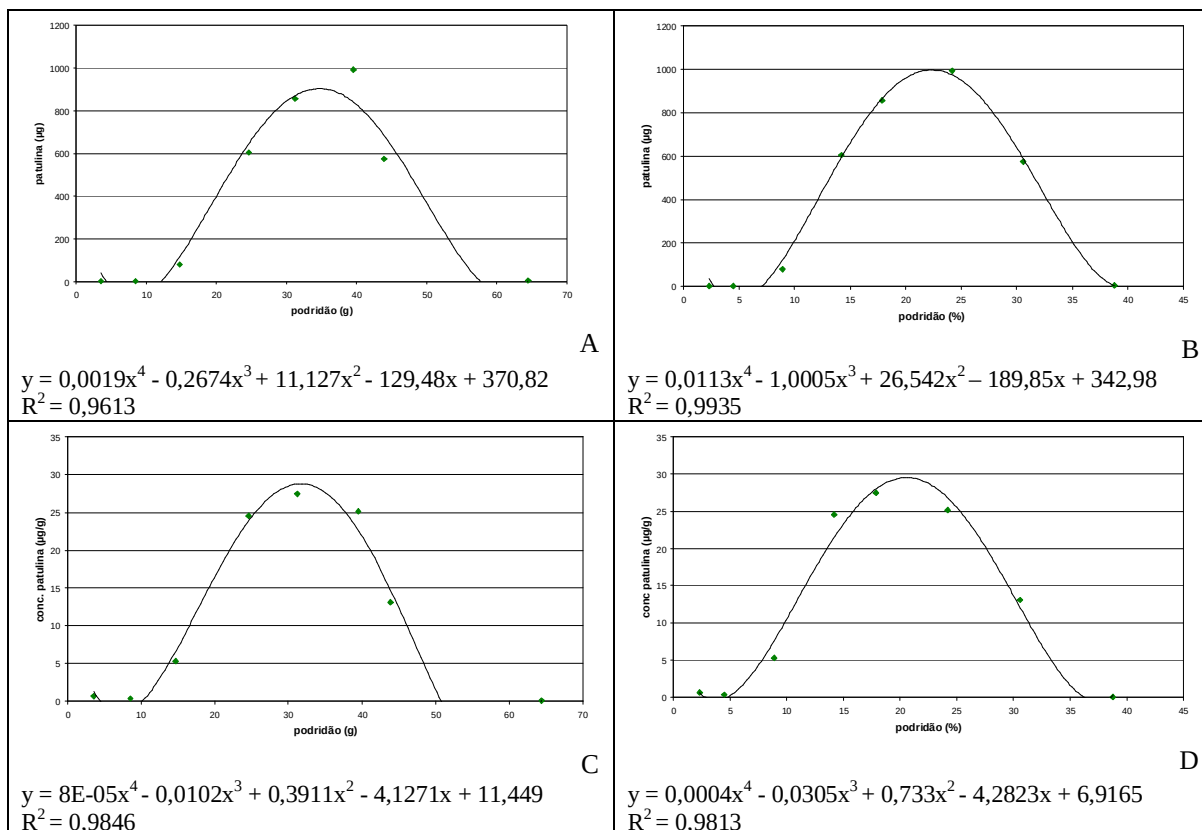


Figura 08b – Curvas de tendências das maçãs cultivar Fuji relacionando, (A) quantidade total de patulina com quantidade de tecido deteriorado (B) quantidade total de patulina com porcentagem de tecido deteriorado (C) concentração de patulina com quantidade de tecido deteriorado (D) concentração de patulina com porcentagem de tecido deteriorado.

As maçãs da cultivar Gala apresentaram maior contaminação, atingindo 120,40 µg/g, quando comparada aos frutos das demais cultivares (Figura 09a), sugerindo uma maior vulnerabilidade do fruto à infecção fúngica. Ross et al. (1998) também encontraram maior incidência de patulina nessa cultivar, com concentrações máximas de 6,4 µg/mL de patulina em suco produzido com maçãs inoculadas com *Penicillium variable*.

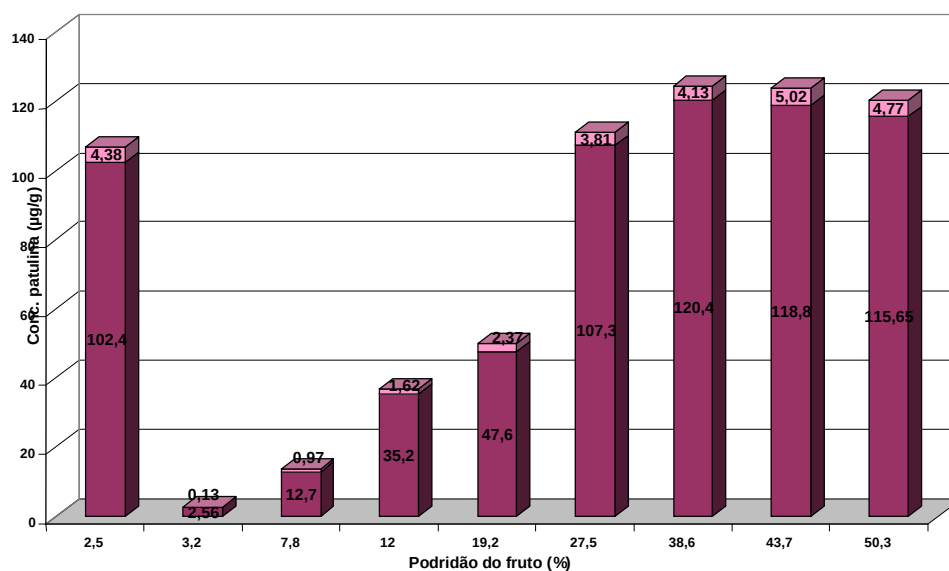


Figura 09a – Concentração de patulina em maçãs cultivar Gala. ■ concentração de patulina no tecido sadio; ■ concentração de patulina no tecido deteriorado.

Na porção sadia analisada dos frutos da cultivar Gala, foi encontrada toxina em quantidades proporcionais ao tecido deteriorado, chegando a conter 291,00 µg de patulina no fruto contendo maior podridão.

No fruto da cultivar Gala com apenas 2,5% de podridão foi observada uma grande concentração de patulina (Figura 09a), sugerindo a presença de uma cepa de *Penicillium sp.* altamente toxigênica. Na porção sadia desse fruto foi encontrada 43,05 µg de patulina em 9,83 g de tecido são.

De acordo com os resultados encontrados nas maçãs da cultivar Gala (Figura 09b), percebeu-se uma tendência crescente na quantidade de patulina em relação à podridão encontrada, onde a quantidade de patulina foi proporcional à podridão apresentada pelo fruto, descartando-se a primeira amostra, a qual continha concentrações elevadas de toxina.

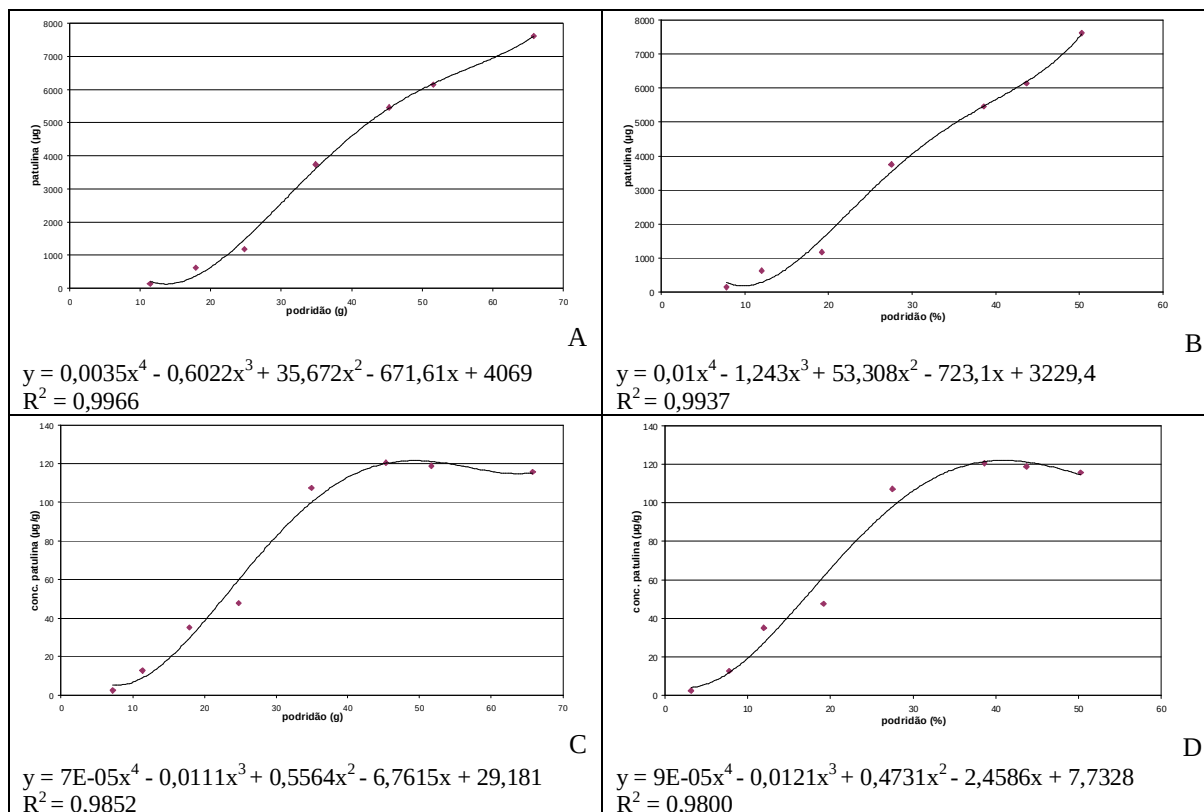


Figura 09b – Curvas de tendências das maçãs cultivar Gala relacionando, (A) quantidade total de patulina com quantidade de tecido deteriorado (B) quantidade total de patulina com porcentagem de tecido deteriorado (C) concentração de patulina com quantidade de tecido deteriorado (D) concentração de patulina com porcentagem de tecido deteriorado.

A cultivar Red star apresentou contaminação crescente de patulina até a podridão máxima analisada de 46,4% (Figura 10a), chegando a 19,30 µg/g, porém baixa quando comparada às demais cultivares. A porção sadia de todos os frutos também continham concentrações crescentes de toxina, chegando a conter 2,11 µg/g.

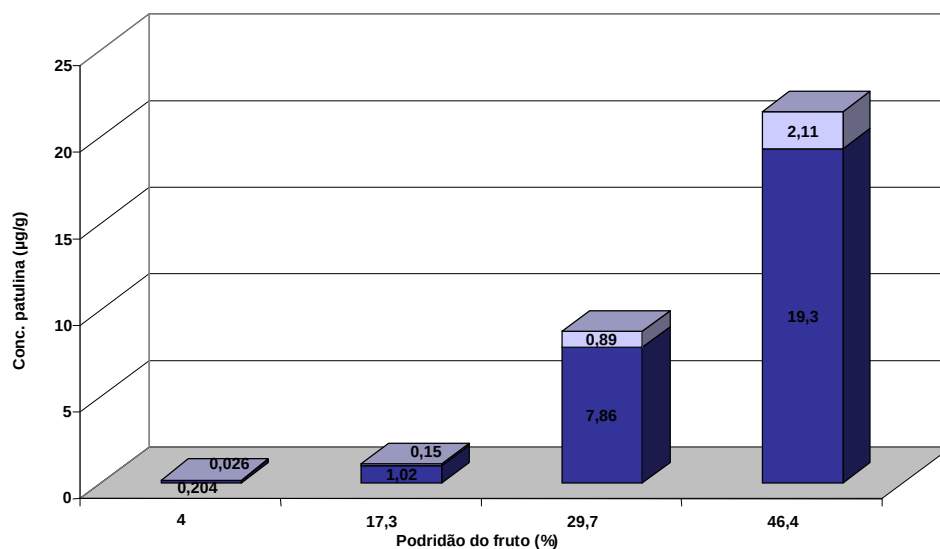


Figura 10a – Concentração de patulina em maçãs cultivar Red Star. □ concentração de patulina no tecido sadio; ■ concentração de patulina no tecido deteriorado.

As maçãs da cultivar Red star apresentaram as curvas de tendência passando por todos os pontos (Figura 10b), resultando em um $R^2 = 1$, devido ao reduzido número de amostras analisadas. Essas curvas apresentaram proporção na relação podridão x patulina, atingindo quantia máxima de 1846,70 µg de patulina quando o peso da podridão era de 95,7 g.

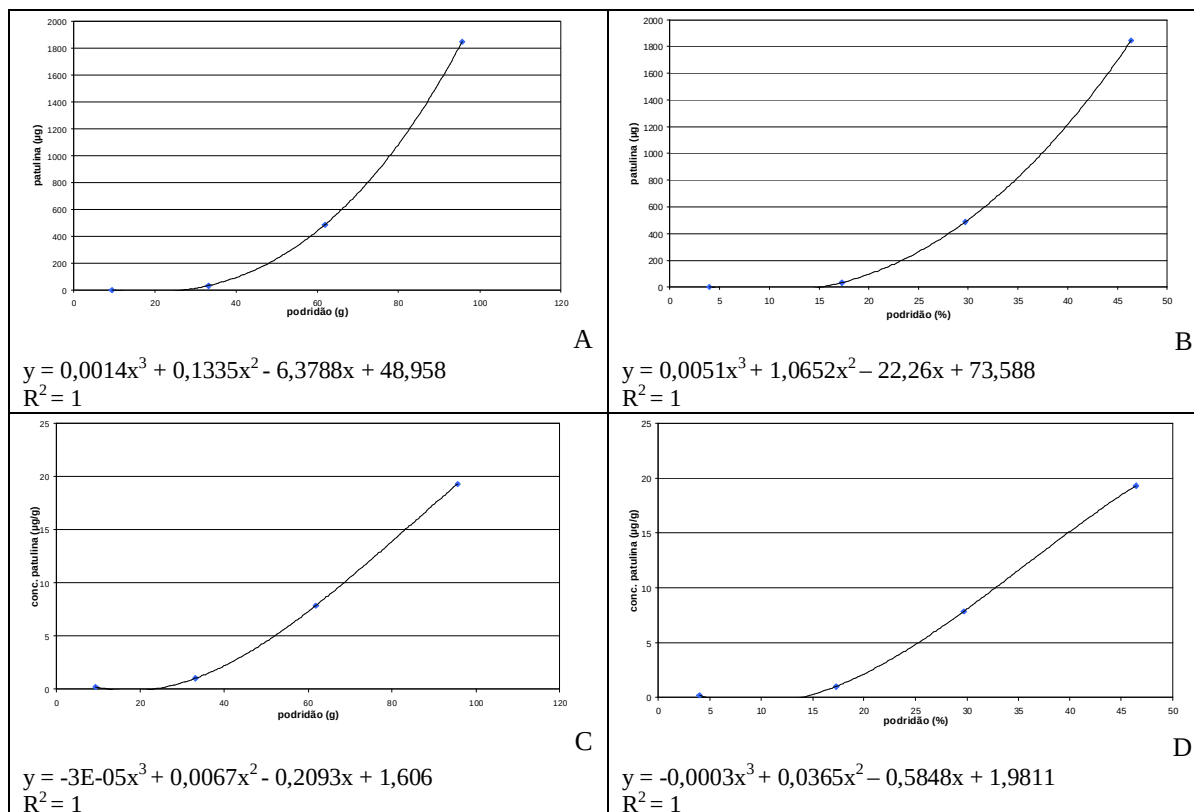


Figura 10b – Curvas de tendências das maçãs cultivar Red star relacionando, (A) quantidade total de patulina com quantidade de tecido deteriorado (B) quantidade total de patulina com porcentagem de tecido deteriorado (C) concentração de patulina com quantidade de tecido deteriorado (D) concentração de patulina com porcentagem de tecido deteriorado.

5.3 DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM SUCOS DE MAÇÃ

Considerando que quando a matéria-prima disponível para produção de sucos é a desqualificada para consumo *in natura*, incluindo os frutos que apresentam partes deterioradas, que em sua maioria estão infectados por fungos potencialmente toxigênicos, existe a possibilidade de detectar patulina em sucos comerciais, uma micotoxina teratogênica e termoestável que permanece em produtos processados estabilizados microbiologicamente com tratamento térmico (SYLOS, RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Tendo em vista que a presença de patulina em sucos de maçãs reflete a utilização de matéria-prima desqualificada, procedeu-se uma investigação em produtos comercializados na Região Sul do Brasil.

A julgar por 38 amostras analisadas, a qualidade dos sucos mostrou-se satisfatória, pois não foram encontrados níveis detectáveis dessa toxina, considerando-se o limite de detecção da técnica de 6,7 µg/L de amostra e um grau de recuperação de 86,24%. Embora a amostragem tenha sido casualizada e pequena, os resultados obtidos sugerem que a patulina não seja um problema em sucos de maçã comercializados na Região Sul do país, mostrando que a matéria-prima usada para o processamento é aparentemente de boa qualidade. Como 75% dos sucos de fruta estavam sulfitados (dados fornecidos pelas indústrias), conforme permitido pela legislação brasileira, a baixa incidência de patulina também pode ser devido ao dióxido de enxofre e metabissulfito de sódio, capazes de diminuir a concentração de patulina (BURROUGHS, 1977; ROSS, 1995; SYLOS, RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). Uma vez que a presença de patulina está relacionada com a qualidade dos frutos, esse problema parece ser mais pronunciado em anos que a safra é baixa ou pela má qualidade dos frutos decorrentes do clima. Para não diminuir a produção e evitar a falta dos produtos no mercado, as indústrias utilizam frutos com grau de deterioração muito pronunciada, passível de estarem contaminados com patulina.

Sylos e Rodriguez-Amaya (1999) avaliaram a presença de patulina em 30 amostras de sucos de maçã comercializadas em 1998 e não encontraram concentrações detectáveis em 29 amostras analisadas. Apenas uma amostra continha patulina, mas não excedia os limites estabelecidos pela OMS e FDA (50 µg/L), podendo ser observado que a boa qualidade do suco comercializado no Brasil se mantém. Esses resultados, que foram obtidos com um nível de precisão semelhante, confirmam as conclusões deste trabalho, que são altamente positivas quanto à qualidade do suco de maçã produzido e comercializado no país.

Por outro lado, a determinação de patulina em produtos processados foi relatada em outros países. Uma pesquisa realizada com 42 amostras comerciais de suco de maçã e 23 de suco concentrado de maçã no Irã em 2002, 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). Anon (1999) detectou patulina com níveis superiores a 50 µg/L em 2,5% de amostras de sucos de maçã em Londres. Na Turquia, Gokmen e Acar (1998) encontraram 215 amostras de suco de maçã concentrado contaminados com patulina em valores variando de 7 a 376 µg/L. De 100 amostras de suco de maçã analisadas na Espanha, 82 estavam contaminadas com a toxina, sendo que sete apresentaram níveis acima de 50 µg/L (PRIETA et al., 1994) e no Reino Unido, em 23% das 328 amostras de sucos analisadas entre 1989/1990, apresentaram níveis de patulina entre 51 e 1130 µg/L (BURDA, 1992). Embora se tratem de relatos antigos que refletem safras mais antigas ainda, pode ser observada que os riscos e perigos da ingestão de patulina pelo consumo de suco de maçã são bem menores de que na Inglaterra, na Turquia e na Espanha, países que caracterizam por bons programas de controle de qualidade na área de alimentos.

A alta incidência de patulina nos frutos *in natura* indica a possibilidade da utilização de matéria-prima de má qualidade no processamento. Por outro lado, a ausência da toxina nas amostras de sucos comerciais se justifica pela instabilidade desta durante a sulfitagem, processo este não realizado nos frutos destinados ao consumo *in natura* (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

5.4 COMPROVAÇÃO DA ELIMINAÇÃO DE PATULINA POR FERMENTAÇÃO

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 03 são apresentados os resultados de um experimento conduzido com suco de maçã comercial pronto para consumo ao qual foi adicionada patulina e *Saccharomyces cerevisiae* para confirmar a redução ou a eliminação de patulina juntamente com o crescimento de células de leveduras.

Tabela 03 – Concentrações de patulina determinadas durante experimento cinético com suco de maçã comercial contendo patulina e inoculado com *S. cerevisiae*.

Tempo (h)	4,500 µg de patulina/mL		7,000 µg de patulina/mL	
	Com <i>S. cerevisiae</i>	Sem <i>S. cerevisiae</i>	Com <i>S. cerevisiae</i>	Sem <i>S. cerevisiae</i>
0	4,500	4,500	7,000	7,000
8	4,220	4,330	6,884	6,891
19,5	2,983		6,524	
24	2,268		4,986	
30	1,454		4,655	
37	1,204		3,785	
48	0,751	4,325	2,974	6,888
74	0,397		1,249	
97	0,228		0,797	
120	0,208		0,640	
143	0,148	4,262		6,764

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

Os teores de patulina nos ensaios onde foram adicionados inicialmente 4,500 µg/mL de patulina permaneceram estáveis no período inicial de 8 horas e após este tempo, até 37 horas, diminuíram rapidamente até 1,204 µg/mL, o que representa uma redução de 73,35%. O processo continuou gradativamente com eliminação da toxina, porém de forma lenta, estabilizando num teor residual de 3,3% (0,148 µg de patulina/mL) após 143 horas de fermentação (Figura 11).

No experimento contendo 7,000 $\mu\text{g/mL}$, a toxina começou a ser eliminada após 19,5 horas de incubação. Após esse período, a eliminação da toxina ocorreu em maior intensidade até 74 horas, quando a concentração de patulina passou de 7,000 para 1,249 $\mu\text{g/mL}$, representando uma diminuição de teor de 82,15%. O processo continuou gradativamente com eliminação em baixa taxa de eliminação mantendo um teor residual próxima a 10% (0,148 μg de patulina/mL) da inicial após 120 horas de cultivo.

No experimento foram realizados dois ensaios controles nos quais não foi detectada diminuição dos teores iniciais de patulina.

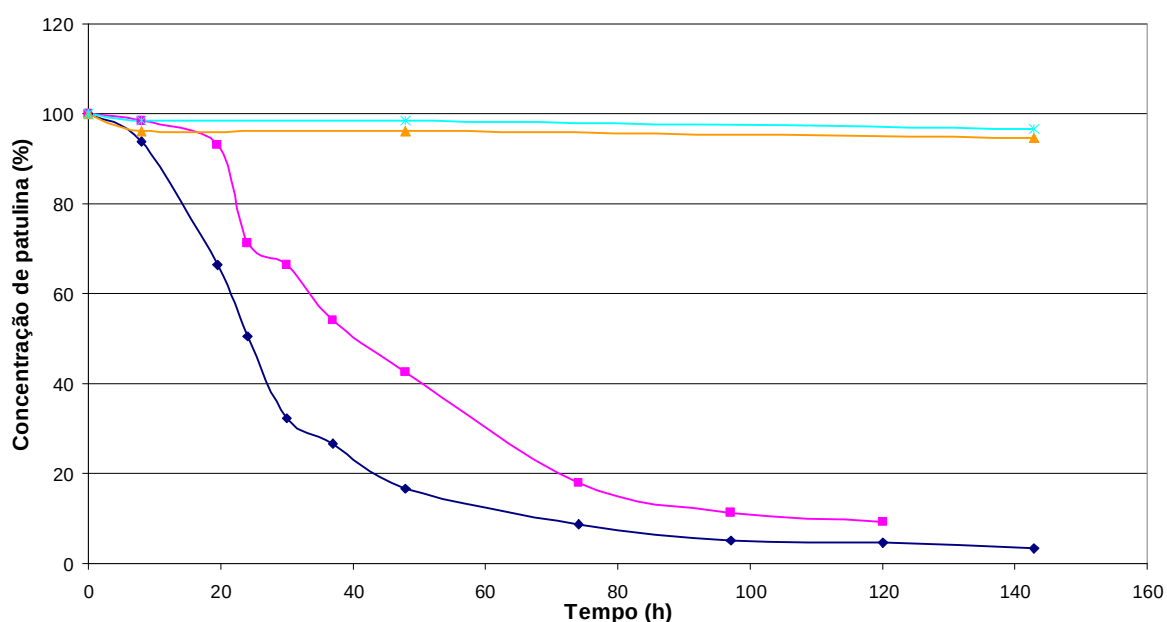


Figura 11 – Eliminação de patulina por *S. cerevisiae*, —◆— concentração inicial 4,500 μg de patulina/mL, —■— concentração inicial 7,000 μg de patulina/mL, —▲— controle da degradação pelo tempo (4,500 μg de patulina/mL) e —*— controle da degradação pelo tempo (7,000 μg de patulina/mL).

Ao comparar os dois experimentos, contendo 4,500 e 7,000 μg de patulina/mL (Figura 11), é possível observar que nas primeiras 8 e 19,5 horas, respectivamente, não foi eliminada. Após esse período a toxina passa a ser eliminada, com uma velocidade dependente da dose. No ensaio contendo 4,500 $\mu\text{g/mL}$ a velocidade de eliminação no período entre 8 e 37

horas é de 0,115 µg/mL.h tendo sido eliminado 67%, enquanto no ensaio 7,0 µg/mL no período entre 19,5 e 60 horas, é de 0,078 µg/mL.h. e eliminação de 75%. Ou seja, com concentrações maiores de patulina a velocidade de sua eliminação é mais lenta. Os teores residuais dos dois experimentos ficaram abaixo de 10% após 120 horas de cultivo, sendo 4,6% (0,208 µg de patulina/mL) no primeiro experimento e 9,15% (0,641 µg de patulina/mL) no segundo experimento.

Karlovsky (1999) citou a desintoxicação de patulina por leveduras durante os processos fermentativos. Harwig et al. (1973) eliminaram a patulina 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 de sucos contaminados utilizando leveduras industriais para produção de sidras e tempo de fermentação de 12 dias.

O desaparecimento 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 ciclo-heximida fosse adicionada 3 horas após a adição de patulina, a velocidade e a taxa de degradação seria reduzida, porém não suspensa.

A seguir foi utilizado suco despectinizado de maçã com adição de 7,000 µg de paulina/mL para a condução de um experimento de fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, tendo sido monitorado a quantidade de células vivas e a concentração de patulina (Tabela 04).

Tabela 04 – Degradação de patulina por *S. cerevisiae* e efeito da toxina sobre o crescimento da levedura.

Tempo (h)	Células vivas de <i>S. cerevisiae</i> (células/mL)		Patulina (µg/mL)
	Com patulina	Sem patulina	
0	$3,60 \times 10^6$	$3,60 \times 10^6$	7,00
13	$6,70 \times 10^6$	$1,11 \times 10^7$	4,72
24	$2,50 \times 10^7$	$2,92 \times 10^7$	2,52
40	$4,68 \times 10^7$	$1,08 \times 10^8$	1,68
120	$8,17 \times 10^7$	$1,17 \times 10^8$	0,00
240	$4,86 \times 10^7$	$7,65 \times 10^6$	0,00

Meio utilizado: suco de maçã. Cultivo estático sob condições anaeróbias a temperatura ambiente (25 a 36°C).

A eliminação da toxina neste experimento apresentou diferenças com relação ao anterior, não tendo sido detectada uma fase inicial (19,5 horas) de concentração constante, por outro lado, não foi observado nenhuma quantidade residual de patulina adicionada ao final de 120 horas. Estes resultados são ilustrados na Figura 12, e pode ser explicitada a velocidade de eliminação como 0,173 µg/mL.h numa primeira fase (30 horas) e 0,020 µg/mL.h numa segunda fase (90 horas). O processo fermentativo à temperatura ambiente (25 a 36°C) pode ter influenciado o crescimento da levedura e a eliminação da toxina, tendo estado em temperaturas que variaram de 25 a 36°C.

A eliminação da toxina ocorreu mais rapidamente do que nos experimentos preliminares juntamente com um rápido crescimento das células, resultado da temperatura mais elevada durante o decorrer dos experimentos. No tempo de 13 horas, o meio continha 67% (4,72 µg/mL) da patulina inicialmente adicionada, chegando a 24% (1,68 µg/mL) em 40 horas de cultivo. Nos tempos de 120 e 240 horas, a toxina não foi mais detectada.

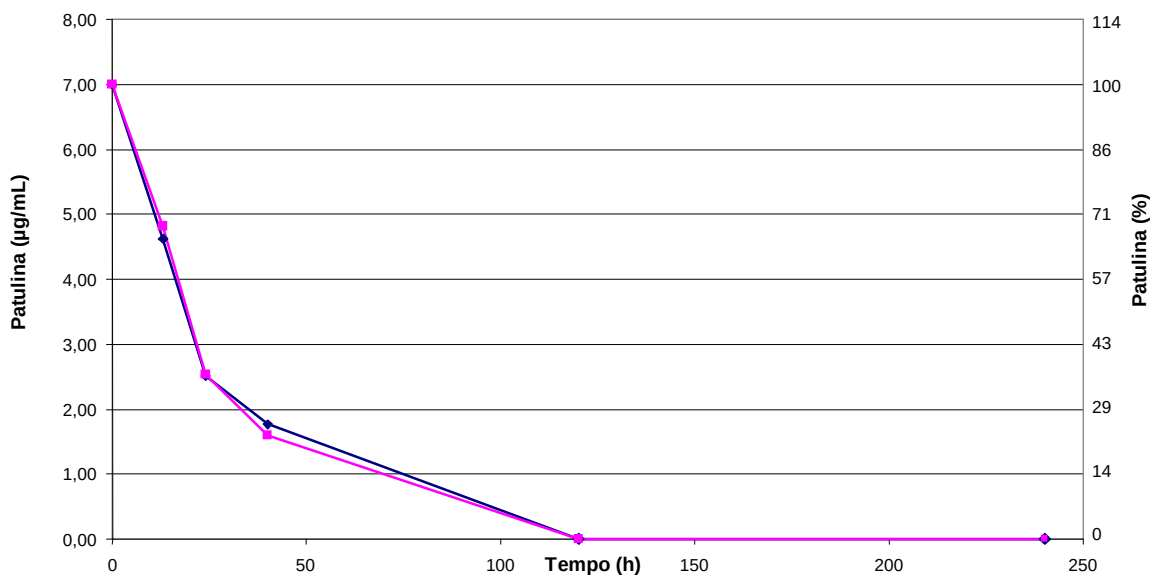


Figura 12 – Concentração de patulina no meio de fermentação inoculado com *S. cerevisiae*, em duplicata.

A contagem de células vivas mostrou que no experimento sem patulina, as leveduras atingiram segundo ciclo exponencial ($1,17 \times 10^8$ células vivas/mL) e uma acentuada fase de morte celular quando comparada ao experimento com toxina, com cerca de $4,86 \times 10^7$ células vivas/mL ao final de 240 horas de fermentação, diferente do experimento contendo toxina onde a contagem atingiu um máximo de $8,17 \times 10^7$ células vivas/mL no tempo de 120 horas e a fase de morte celular foi menos pronunciada.

As leveduras do meio contendo patulina apresentaram maior tempo de adaptação e menor crescimento durante todas as fases de crescimento devido ao efeito antimicrobiano da micotoxina, também citado por Sumbu; Thomart e Bechet (1983).

O aumento da fase de adaptação ou a ocorrência de uma inibição temporária tem 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* podem ser percebidas essas 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 (SUMBU; THOMART; BECHET, 1983; MOSS; LONG, 2002).

A presença de patulina diminuiu o número máximo de células vivas de levedura medida através de contagem de células, de $1,17 \times 10^8$ células vivas/mL no cultivo sem patulina e tempo de 120 horas, para $8,17 \times 10^7$ células vivas/mL no cultivo contendo patulina, e a fase de morte celular apresentou-se em menor intensidade sendo observada uma menor fase de declínio celular na curva de crescimento quando comparada ao controle (Figura 13).

Sumbu; Thomart e Bechet (1983) mostraram essa relação entre dose da toxina e inibição inicial do crescimento quando cultivou leveduras em meios contendo patulina em concentrações máximas adicionadas de 50 µg/mL.

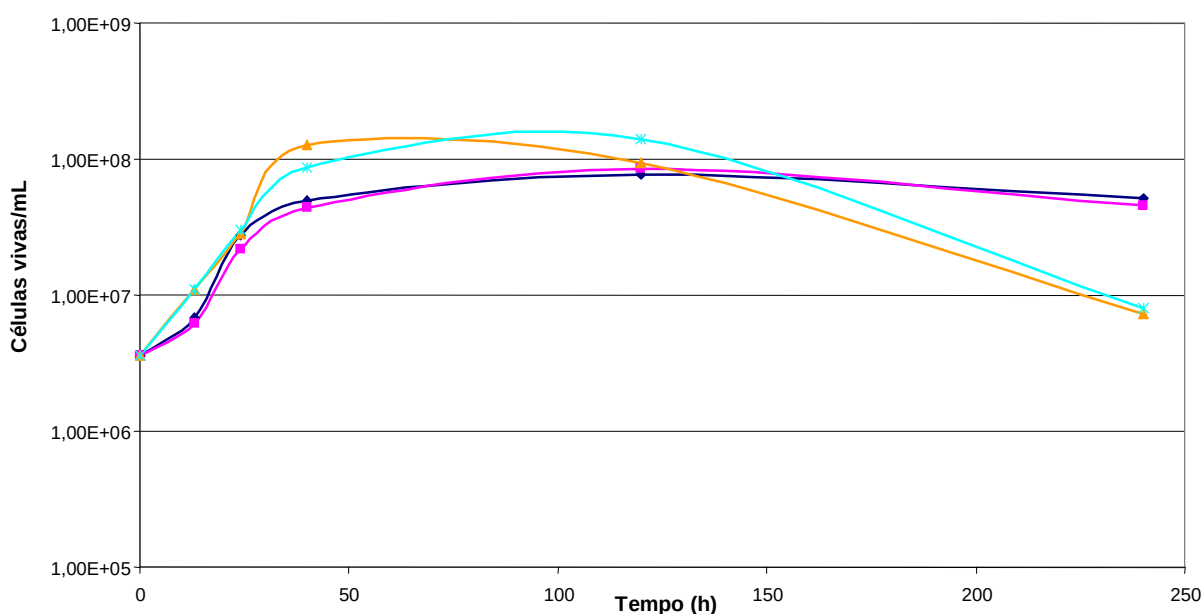


Figura 13 – Evolução do número de células vivas de *S. cerevisiae* em meio com (—◆— ; —■—) e sem patulina (—▲— ; —*—), em duplicata.

Foram analisados três parâmetros da fermentação, a diminuição do açúcar redutor total e a do de nitrogênio, bem como a produção de álcool, sendo os resultados explicitados na Tabela 05.

Tabela 05 – Parâmetros analisados durante as fermentações.

Tempo (h)	Açúcar total redutor (g/100mL)		Nitrogênio (mg/Kg)		Álcool (°GL)	
	Com patulina	Sem patulina	Com patulina	Sem patulina	Com patulina	Sem patulina
0	13,75	13,75	362 a	362 a	0,00	0,00
13	12,00	12,07	326 a	352 a	1,04	1,01
24	9,88	9,95	273 a	303 a	2,14	1,97
40	5,78	5,75	202 a	226 a	4,57	4,54
120	0,05	0,05	110 a	164 b	7,86	7,99
240	0,03	0,01	108 a	162 b	7,88	8,02

Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Meio utilizado: suco de maçã. Cultivo estático sob condições anaeróbias a temperatura ambiente (25 a 36°C).

Os teores de açúcar nos ensaios de fermentação contendo patulina, ou não, foram praticamente os mesmos, demonstrando que o consumo pelas leveduras foi semelhante, não tendo sido observado neste experimento qualquer efeito inibitório da toxina. A concentração inicial de açúcar redutor total foi de 13,7 g/100mL, não foi observado nenhum período de adaptação, sendo rapidamente consumido em 120 horas, ou seja, na metade do tempo de duração do experimento, deixando um valor residual inferior a 0,04 g%.

É possível observar que houve uma coincidência entre o crescimento celular, o consumo de açúcar e a eliminação de patulina quando se comparam estes parâmetros em 40 horas, onde o crescimento era exponencial e o consumo de açúcar e eliminação da toxina estavam em maior intensidade. Da mesma forma, a maior contagem de células vivas obtida (120 horas) ocorreu quando os teores residuais de açúcar e de patulina já eram praticamente nulos.

A produção de álcool também avaliada nos experimentos foi crescente até o final da fermentação e apresentou similaridade com o consumo de açúcar. A concentração máxima

alcançada foi de 8,02 °GL no fermentado sem patulina, e de 7,88 °GL no fermentado contendo patulina, porém os dois fermentados apresentaram semelhante produção alcoólica durante todo o processo.

Os teores de nitrogênio determinados durante os dois ensaios demonstraram que houve um consumo mais pronunciado nas primeiras 120 horas de fermentação (Figura 14), permanecendo então estável até o final do experimento, com teores residuais mais baixos nos ensaios contendo patulina (108 mg/Kg), o que representa 30% do inicial. O ensaio conduzido sem patulina apresentou um teor residual de nitrogênio de 162 mg/Kg, equivalente a 44,4% (Tabela 05).

Os compostos utilizados como fontes de carbono e de nitrogênio são, do ponto de vista quantitativo, os principais nutrientes utilizados pelas leveduras, por isso deve-se considerar que o fluxo destes nutrientes e a interação mútua entre eles devem interferir com vários processos metabólicos. Outro aspecto importante a ser considerado é a finalidade da utilização de uma molécula de nutriente pela célula (CRUZ et al, 2001).

O mecanismo de defesa da levedura para crescer em meio contendo patulina está associado à produção de uma proteína capaz de eliminar a toxina (SUMBU; THONART; BECHET, 1983), sendo assim, era esperado que o consumo de fontes de nitrogênio fosse maior no fermentado com patulina já que esta acaba por estimular a produção de compostos nitrogenados.

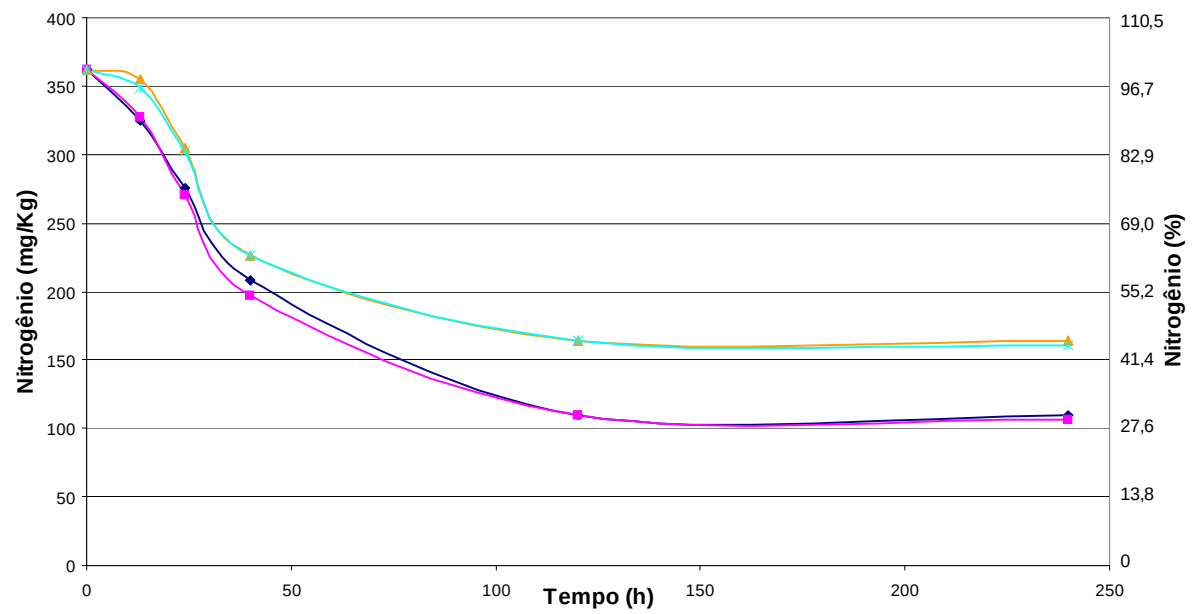


Figura 14 – Concentração de nitrogênio no meio de fermentação com (◆ ; ■) e sem patulina (▲ ; *) em duplicata.

6 CONCLUSÕES

A metodologia de quantificação da patulina por CLAE foi padronizada, apresentando recuperação de 86,24%, limite de detecção de 6,7 µg/L e de quantificação de 33,5 µg/L.

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

Em 38 amostras de sucos de maçã comerciais não foram detectada patulina.

A patulina adicionada no mosto inoculado com *S. cerevisiae* foi totalmente eliminada em 120 horas.

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.
- ANON. Survey of apple juice for patulin. **MAFF Food Surv. Inf. Sheet**, n. 173, London: HMSO, 1999.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official method 974.18. Patulin in apple juice – Thin-layer chromatographic method. Official methods of analysis. Washington. **J. AOAC**, DC, v.57, p.61, 2000.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official method of analysis. Virginia, Willians. **J. AOAC**, s.ed, p.988, 1984.
- ARGENTA, L. C. Concentração de etileno interno e maturação de maçãs cvs. Gala, Golden delicious e Fuji. **Rev. Brás. Frut.**, v.15 n.1, p.125-132, 1993.
- BAERT, K.; CHITUNDU, K.; DE MEULENAER, B.; DEVLIEDHERE, F. Incidence of patulin in organic and conventional apple juice marketed in Belgium. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, XI, 2004. **Anais...** 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.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, p.497-451, 2003.
- 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.
- BISSEUR, J.; PERMAUL, K.; ODHAV, B. Reduction of patulin during apple juice clarification. **J. Food Protect.**, v.64, n.8, p.1216-1219, 2001.
- 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.

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.

BYE BYE MOLD – Mold Inspection and Testing, Certified Mold Inspectors. Disponível em: <<http://byebyemold.com>> Acesso em: 29/11/05

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.

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.

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.

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.

CRUZ, S. H.; CASSIO, F.; LEÃO, C.; ERNANDES, J. R. O efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no transporte de amônio em *Saccharomyces cerevisiae*. **Eclet. Quím.** São Paulo, v.26, p.157-173, 2001.

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.

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.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 12/06/2004.

IBRAF - INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Novos horizontes para a fruticultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>> Acesso em: 16/04/2005.

FAO - FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em 17/03/2005.

FERNÁNDEZ-TREVEJO, E. O.; ARIAS VERDÉS, J. A.; SERSA ESPINOSA, R. 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.

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

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.

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

GOKMEN, V.; ACAR, J. Incidence of patulin in apple juice concentrates products in Turkey. **J. Chromat.**, v.815, p.99-192, 1998.

GONÇALEZ, 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.

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.

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.

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

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.

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. **Braz. J. Microbiol.**, v.33, p.269-273, 2002.

KOZLOWSKA, K.; JERUSZKA, M.; MATUSZEWSKA, I.; ROSZKOWSKI, W.; BARYLKO-PIKIELNA, N.; BRZOZOWSKA, 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.

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.

LAIDOUI, 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.

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.; 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.

LUGAUSKAS, A.; STAKENIENE, J. Toxin producing micromycetes on fruit, berries, and vegetables. **Annals Agric. Env. Med.**, v.9, p.183-197, 2002.

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.

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.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Brasil deve aumentar exportação de manga para o Japão em julho**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/pls/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons?p_id_publicacao=3536> Acesso em 17/05/2005.

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

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.

NELSON, N. J. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v.153, p.375-380, 1944.

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.

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

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.

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.

ROSS-URBANO, G.; HIROOKA, E. Y. Aspectos relevantes sobre riscos da produção de patulina em maçã. **Semina**, v.20, n.1, p.79-86, 1999.

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.

SCUSSEL, V. Patulina. In: **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis-SC: Insular, 1998. p.47-48.

SHARMA, R.P. Immunotoxicity of mycotoxins. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 892-897, 1993.

SHILIHA, 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.

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

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.

TODA FRUTA. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>> Acesso em: 20/12/05.

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

VALENTE SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.1, p. 79-84, 2001.

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

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.

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.; DEMIATE, I. M.; CHERUBIM, R. A. Brazilian apple juice industry. **Fruit Process.**, Schönborn, v.5, n.5, p.10-14, 1995.

WOSIACKI, G.; CHERUBIM, R. A.; HILGEMBERG, C. Characterization of the apple juice from new varieties growing in Brazil. **Fruit Process.**, Schönborn, v.6, n.8, p.306-310, ago. 1996.

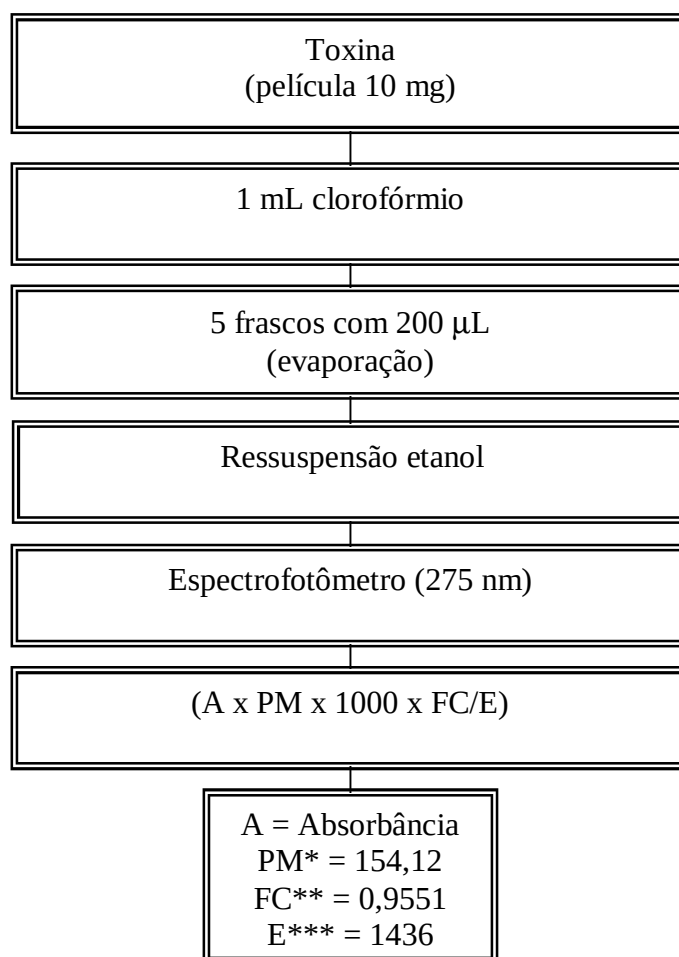
WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C. Brazilian apple production – a few years later. **Fruit Process.**, Schönborn, v.10, n.12, p. 472-475, dez. 2000.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C.; DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Apple varieties growing inn subtropical áreas. The situation in Santa Catarina – Brazil. **Fruit Process.**, Schönborn, v.12, p.19-28, jan., 2002.

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.

APÊNDICES

Apêndice 1



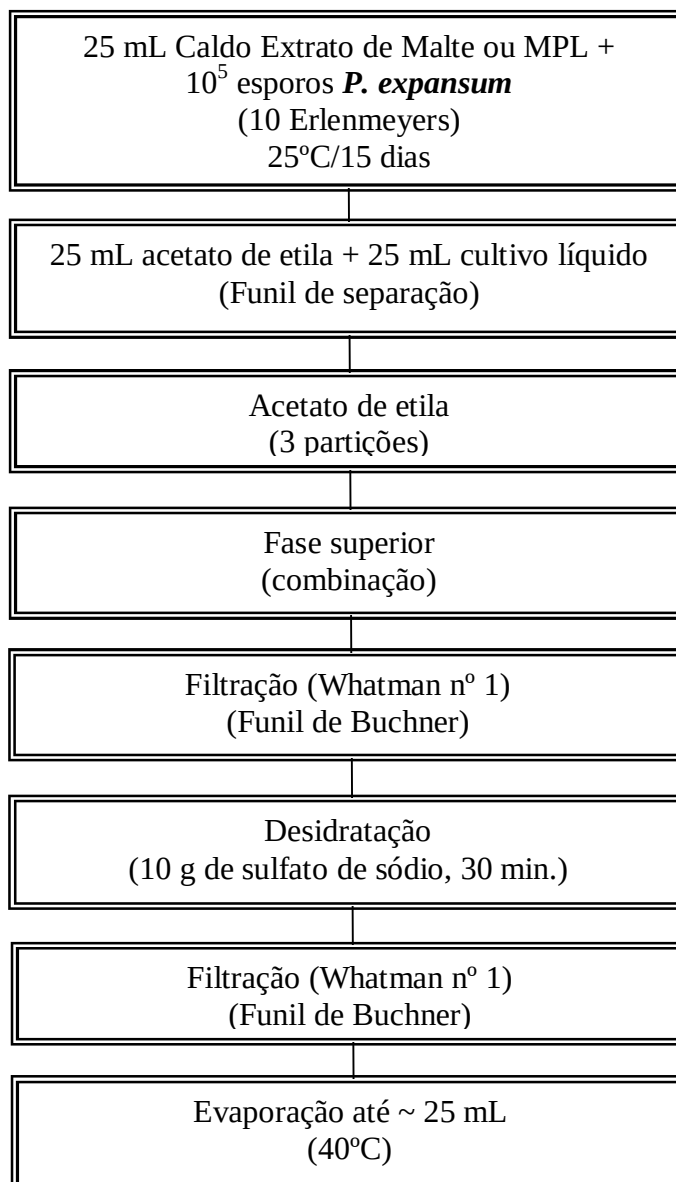
Fluxograma 1 -Quantificação de patulina padrão por espectrofotômetro (AOAC, 2000).

* PM = Peso molecular

** FC = Fator de correção

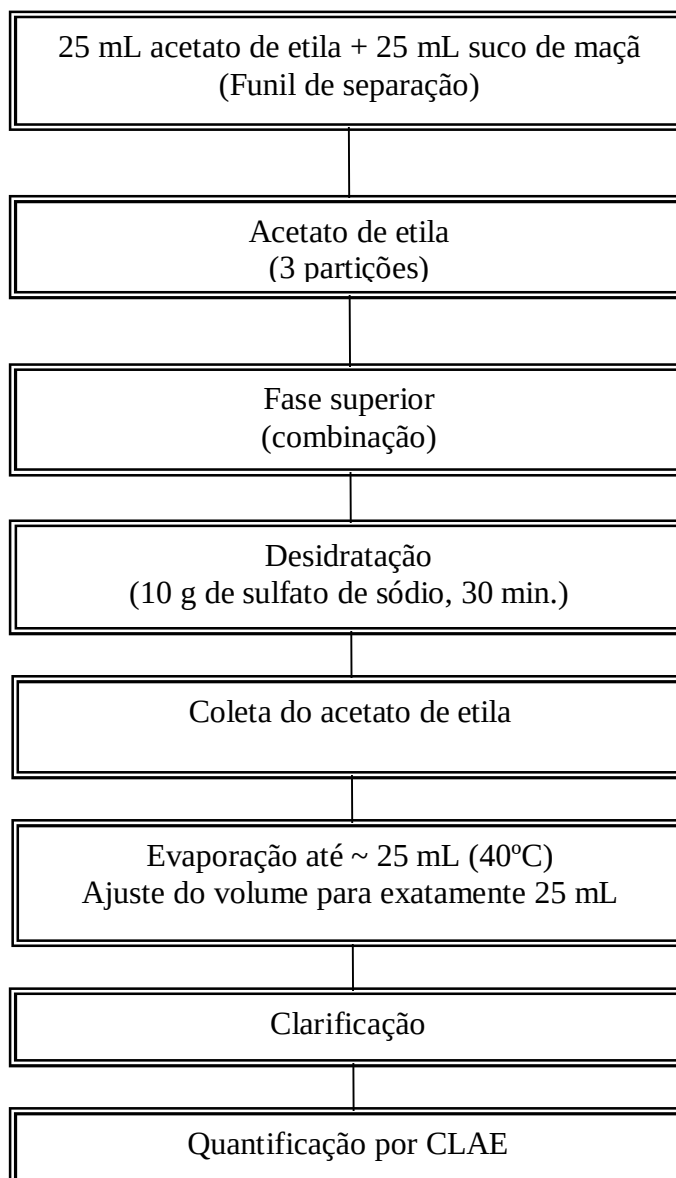
*** E = Absortividade

Apêndice 2

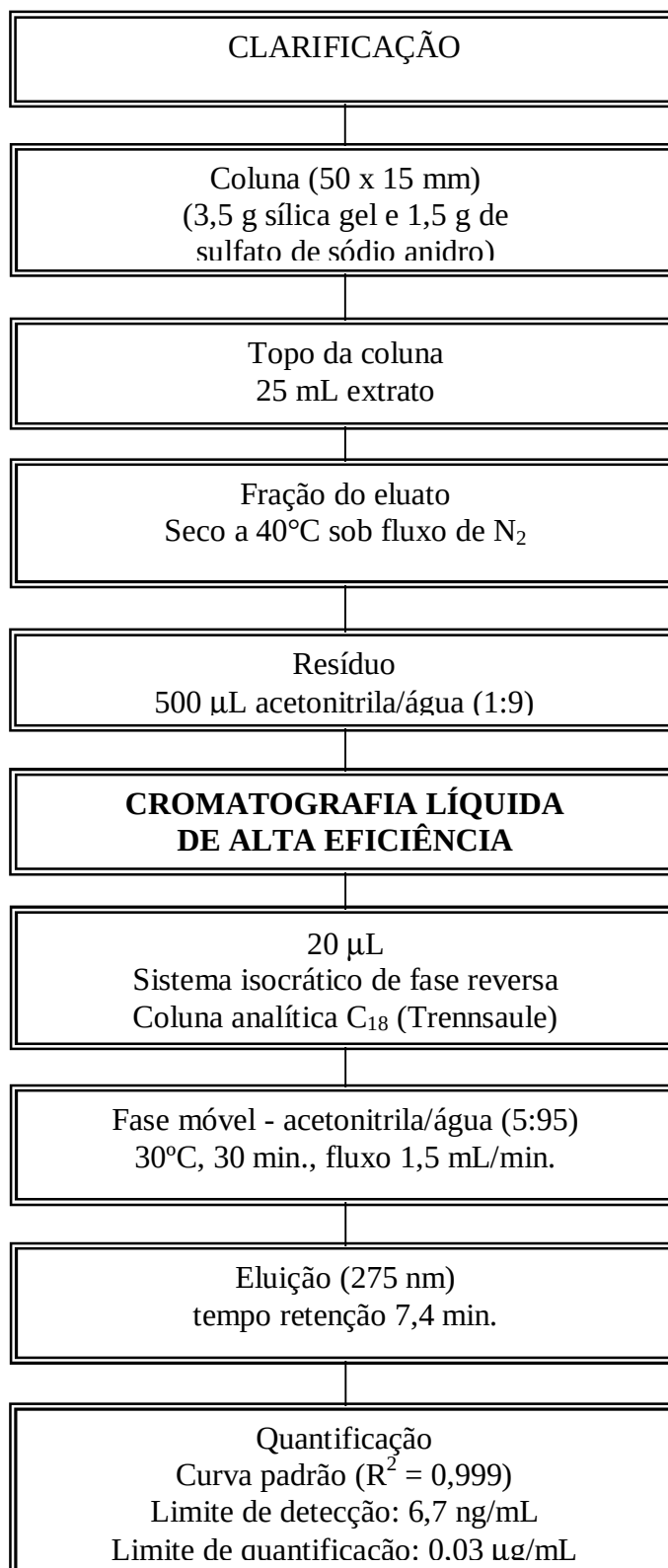


Fluxograma 2 - Extração de patulina do cultivo de *P. expansum* a 25°C por 15 dias.

Apêndice 3

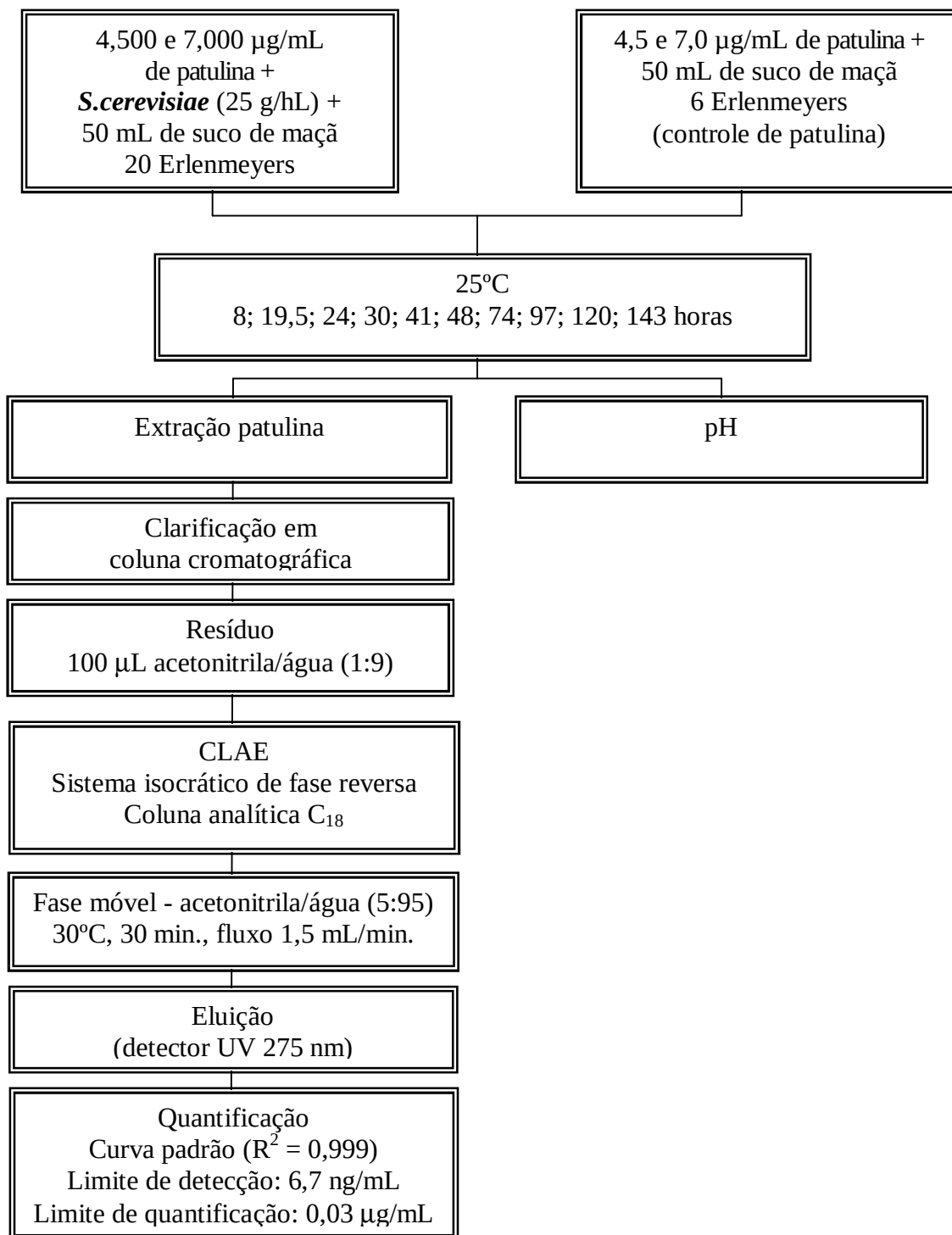
**Fluxograma 3 - Extração de patulina de sucos comerciais de maçã (AOAC, 2000).**

Apêndice 4



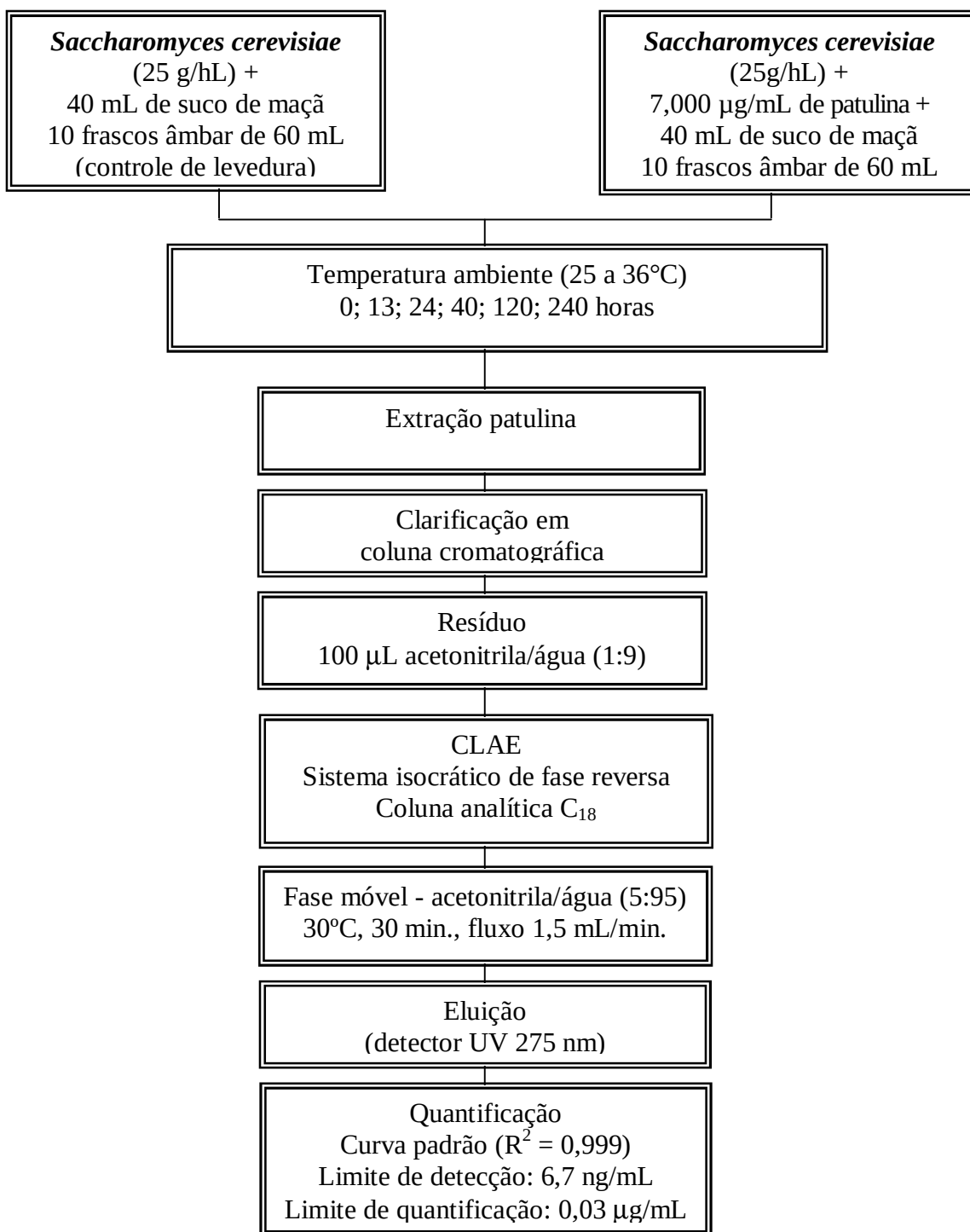
Fluxograma 4 - Clarificação do extrato em coluna cromatográfica e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Apêndice 5

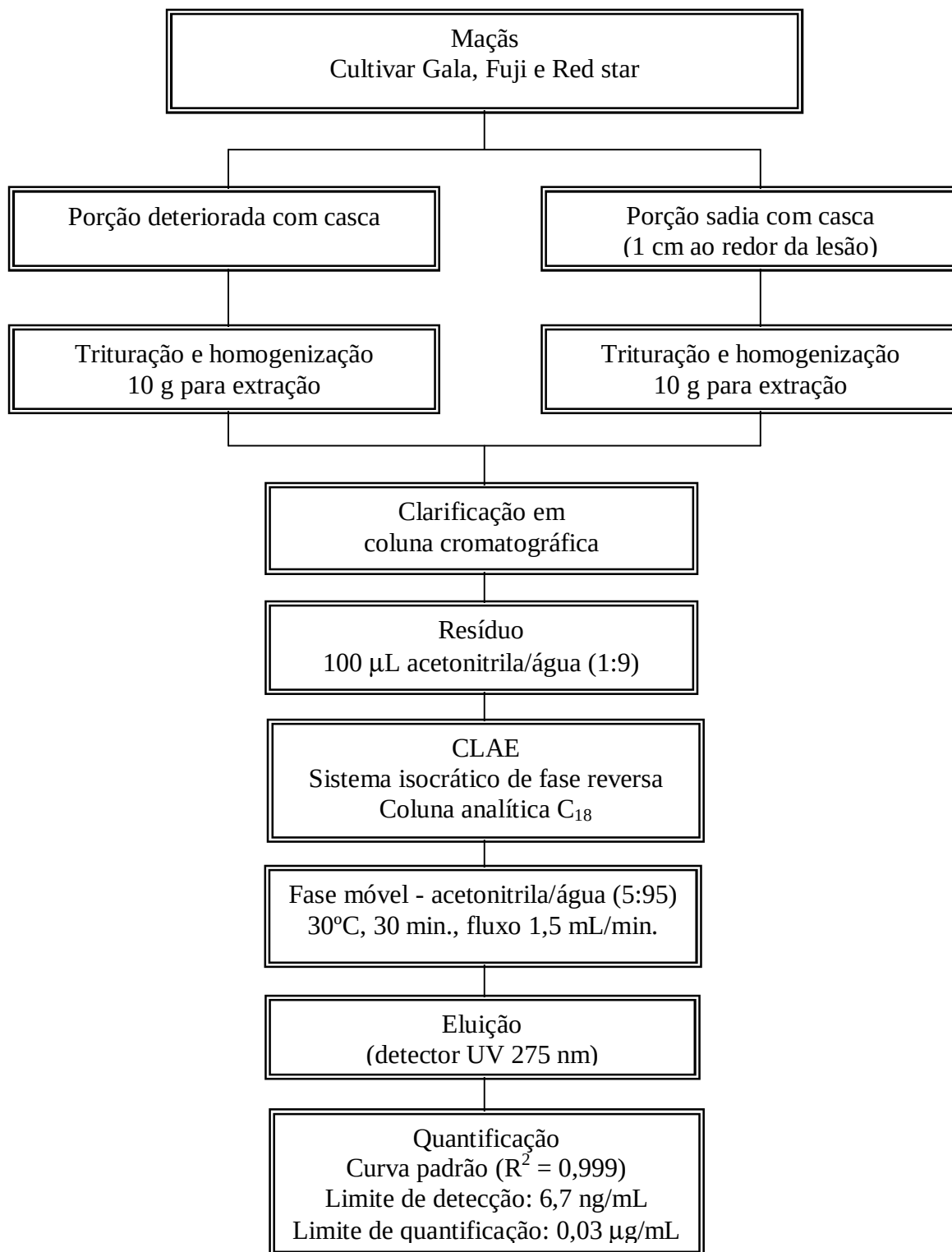


Fluxograma 5 – Comprovação da eliminação de patulina por *Saccharomyces cerevisiae*.

Apêndice 06

Fluxograma 6 - Eliminação de patulina por *Saccharomyces cerevisiae*.

Apêndice 07

**Fluxograma 7 – Quantificação de patulina em maçãs *in natura*.**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)