

TATIANE BASSO

QUANTIFICAÇÃO DE PATULINA EM SUCOS DE MAÇÃ DISPONÍVEIS NO
MERCADO SUL BRASILEIRO

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, JULHO DE 2019

TATIANE BASSO

QUANTIFICAÇÃO DE PATULINA EM SUCOS DE MAÇÃ DISPONÍVEIS NO
MERCADO SUL BRASILEIRO

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, JULHO DE 2019

TATIANE BASSO

QUANTIFICAÇÃO DE PATULINA EM SUCOS DE MAÇÃ DISPONÍVEIS NO
MERCADO SUL BRASILEIRO

Atesto a originalidade do trabalho,

Assinatura da Aluna:

(Tatiane Basso)

Trabalho apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Clínica.

Sumário

A patulina, uma micotoxina, pode ser produzida por alguns géneros de fungos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo a principal espécie produtora *Penicillium expansum*. Este fungo costuma estar presente em maçãs danificadas fisicamente, pelo que estas não são colocadas à venda de forma *in natura*, mas destinadas à indústria de sucos. Há vários anos que os cientistas procuram estudar, entre outros, os efeitos mutagénicos, carcinogénicos e teratogénicos, que o consumo continuado de patulina, pode causar à saúde humana. Sendo os produtos à base de maçã, como os sucos por exemplo, alimentos utilizados por todas as faixas etárias no Brasil e no mundo, diversos estudos em países distintos têm tido como objetivo detetar a presença de patulina em produtos alimentares comercializados à população, avaliando as suas quantidades, comparativamente aos valores máximos de consumo recomendados pelos órgãos regulamentadores de cada país. Estas pesquisas tem demonstrado que mesmo com toda a tecnologia e conhecimento da atualidade, muitos países apresentam presença de patulina em seus produtos, sendo às vezes, em valores muito acima do esperado. No Brasil, apenas no ano de 2011 foi definido um valor máximo de patulina aceitável, e há poucos estudos que investiguem a presença da toxina nos sucos de maçã consumidos pela população. O objetivo deste trabalho buscou quantificar a ocorrência de patulina em sucos de maçã comercializados na região Sul do Brasil. Para esse efeito foi estudado 15 sucos de marcas distintas, recorrendo-se a uma técnica de extração da patulina por cromatografia em fase gasosa acoplada a um detector de massas após um processo de derivatização. Não foram encontrados resíduos de patulina, pela técnica referida, em nenhuma das amostras avaliadas, o que depõe a favor da qualidade dos sucos de maçã comercializados no Brasil.

Palavras-chave: Micotoxina. Patulina. Qualidade. Maçãs. Sucos

Abstract

Patulin, a mycotoxin, can be produced by some genus of fungi such as *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, being the main producing specie *Penicillium expansum*. This fungus is usually present in apples physically damaged, so that they are not offered for sale as a supermarket fruit but are intended for the juice industry. For several years, scientists have sought to study, among others, the mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects that the continued consumption of patulin can cause to human health. Since apple products, such as juices, for example, are being used by all age groups in Brazil and worldwide, several studies in different countries, have aimed to detect the presence of patulin in foods commercialized to the population by evaluating the quantities recommended by the regulatory bodies of each country. This research has shown that even all the knowledge and technology of today, many countries have patulin present in their products, sometimes in values much higher than expected. In Brazil, only a maximum value of acceptable patulin was defined in 2011, and there are just few studies investigating the presence of patulin in apple juices consumed by the population. The objective of this work was to evaluate the occurrence of patulin in apple juices marketed in the southern region of Brazil. For this purpose, 15 apple juice brands were studied, using a patulin extraction technique by gas chromatography coupled to a mass detector after a derivatization process. No patulin residues were found, by the referred technique, in any of the samples evaluated, which is in favor of the quality of the apple juices marketed in Brazil.

Key-words: Mycotoxin. Patulin. Quality. Apples. Juice.

Agradecimentos

Embora a dissertação de mestrado seja um projeto individual, a autora da mesma nunca seria capaz de concretizar sem o apoio de várias pessoas que de uma forma ou de outra, auxiliaram e incentivaram e, por isso, presto os meus mais sinceros agradecimentos:

À minha família, por sempre acreditar nos meus projetos, me incentivando emocionalmente e auxiliando, sem medir esforços, para a realização dos meus sonhos. Agradeço especialmente ao meu esposo Vinícius e minha mãe Jeanete, sem os quais, nada disso seria possível.

À minha querida amiga e colega desta jornada, Fabiana Salvatori Guedes, por me ensinar todos os dias sobre dedicação, coragem, decência. Por ser minha companheira e melhor amiga para o lazer e o dever. Sem ela, sem dúvida eu teria desistido no início do caminho.

À minha orientadora, Doutora Fátima Cerqueira, por acreditar neste trabalho e mesmo à distância, cuidar de tudo nos detalhes, contribuindo sempre para o melhor.

À minha coorientadora, Doutora Luciana Grazziotin Rossato Grando, que abraçou junto comigo este grandioso desafio, e mesmo não tendo nenhuma obrigação de fazê-lo, respondeu prontamente a todos os meus questionamentos, me instruindo e guiando ao longo do caminho. Abriu as portas da Universidade de Passo Fundo para que o trabalho fosse realizado, não poupou esforços para que eu tivesse toda a estrutura necessária. Não tenho palavras para agradecer-la.

À Farmacêutica e mestranda, Natália Freddo, integrante do Grupo de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas e Toxicológicas, por estar ao meu lado durante todo o processo prático, auxiliando com seus conhecimentos e sendo um refúgio amigo nos momentos de preocupação.

À Doutora Maria Tereza Friedrich, professora e responsável pelo Laboratório de Cromatografia da UPF, por mesmo em vista de sua aposentadoria, ter se comprometido a permanecer no laboratório até a finalização do trabalho.

A todos os professores do mestrado em Microbiologia Clínica, os quais agregaram muito em minha formação.

E em especial, ao meu avô Ivar Basso, que este ano partiu deste mundo para morada de Deus. Dedico a você esta vitória. Obrigada por tudo, te amarei eternamente.

A todos, um muito obrigado!

*“Por vezes sentimos
que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
Madre Teresa de Calcutá*

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
1. Fungos e Micotoxinas	3
i. Aflatoxina	9
ii. Ocratoxina	10
iii. Fumonisinias	11
iv. Zearalenona	12
v. Tricoteceno	13
2. Patulina	29
i. Fungos que Produzem Patulina	16
ii. Efeitos Tóxicos da Patulina	17
iii. Principais Alimentos Contaminados	20
iv. Aspectos Relevantes para a Produção da Patulina em Alimentos	21
v. Medidas de Controle Para Prevenir a Contaminação por Patulina	23
vi. Regulamentação e Limites de Patulina em Alimentos	25
vii. Métodos para a Detecção e Quantificação de Patulina	31
3. Produção de Maçã e Suco de Maçã no Brasil	49
III. ENQUADRAMENTO METODOLÓGICO	37
1. Objetivos do estudo	37
i. Objetivo Geral	37
2. Local de Desenvolvimento	37
3. Método Analítico	38
i. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massa	38
4. Material e Métodos	41
i. Reagentes	41
ii. Amostras	42
iii. Extração da Patulina	43
iv. Derivatização	43
v. Detecção e Quantificação da Patulina por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectro de Massa	43
IV. RESULTADOS	60

V. DISCUSSÃO	63
VI. CONCLUSÃO	70
VII. BIBLIOGRAFIA	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais micotoxinas com importância alimentar.....	8
Tabela 2: Limite máximo tolerável de patulina nos Estados Unidos (EUA), Europa (EU) e Brasil (BR).....	26
Tabela 3: Pesquisas realizadas no Brasil sobre patulina em sucos de maçã e outras frutas.....	27
Tabela 4: Ocorrência de patulina no mundo, nos últimos 10 anos.....	28
Tabela 5: Percentual de amostras que excederam a legislação para presença de patulina em estudos nos últimos 10 anos.....	30
Tabela 6: Método analítico, LOQ e LOD utilizados para ocorrência de patulina em trabalhos no Brasil (todos) e no mundo (últimos 10 anos)	33
Tabela 7: Descrição dos reagentes com respectivas procedências.....	41
Tabela 8: Descrição das amostras.....	42
Tabela 9: Quantidade de patulina encontrada nas amostras.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da patulina.....	15
Figura 2: Mofo azul causado por <i>Penicillium expansum</i>	17
Figura 3: Fluxograma da maçã, da colheita ao comércio.....	36
Figura 4: Estados brasileiros onde as amostras foram recolhidas.....	37
Figura 5: Ilustração de um aparelho de cromatografia gasosa.....	40
Figura 6: Aparelho de GC-MS utilizado no estudo	44
Figura 7: Curva padrão de patulina.....	45
Figura 8: Pico cromatográfico da patulina.....	46
Figura 9: Cromatograma e espectro de massas da patulina.....	46

ABREVIATURAS

Ao longo da presente dissertação de mestrado irão emergir algumas abreviaturas, nomeadamente:

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Agricultural Chemists*

APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

APPI – Fotoionização por Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*)

ATA – Intoxicação Alimentar *Aleukia*

a_w – Atividade de Água

BEN – Nefropatia Endêmica dos Balcãs (*Balkan Endemic Nephropathy*)

BSTFA – *N, O*-Bis (trimethylsilyl) Trifluoroacetamide

CEPA – Centro de Pesquisa em Alimentação

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DON – Desoxinivalenol

EC – Comissão Regulatória Europeia (*European Commission Regulation*)

EFSA – *European Food Safety Authority*

EI – Ionização Eletro Spray (*Electrospray Ionization*)

EU – União Europeia (*European Union*)

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FDA – *Food and Drug Administration*

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GC-MS – Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectro de Massa (*Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)

GSH – Glutathione

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada à Detecção Ultravioleta (*High Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Absorption Detector*)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (*International Agency for Research on Cancer*)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

LC – Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)

LOD – Limite de Detecção (*Limit of Detection*)

LOQ – Limite de Quantificação (*Limit of Quantification*)

MS – Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry*)

NIR – *Near-infrared*

OTA – Ocratoxina A

PPL – Lipase Pancreática de Porcos (*Pig Pancreatic Lipase*)

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RS – Rio Grande do Sul (Estado)

SC – Santa Catarina (Estado)

SD-LLLME – *Single Drop liquid-liquid-liquid Microextraction*

TCTC – Tricotecenos

TEER – Resistência Elétrica Transepitelial (*Trans epithelial Electrical Resistance*)

TLC – Cromatografia de Camada Fina (*Thin Layer Chromatography*)

TMCS – Chlorotrimethylsilane

UPF – Universidade de Passo Fundo

UV – Ultravioleta

ZEA – Zearalenona

WHO – *World Health Organization*

I. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são conhecidas como metabólitos secundários secretados por diversos tipos de fungos, podendo serem expostas aos seres humanos, principalmente através da ingestão (Saleh e Goktepe, 2019). De acordo com Saleh e Goktepe (2019), a patulina é uma micotoxina identificada pela primeira vez na década de 40 sob o nome de tercinina, na época, sendo um possível agente antimicrobiano. A sua atividade como antimicrobiano era bastante promissora, uma vez que demonstrava ser até dez vezes mais eficaz no tratamento de infecções por *Bacillus* sp. do que a Penicilina G. (Gaucher, 1979). No entanto, alguns anos depois, seus aspectos tóxicos se tornaram evidentes, tanto em plantas quanto em animais, impedindo seu uso clínico como antibiótico (Steiman et al., 1989). A patulina é produzida por diversos tipos de fungos, sendo *Penicillium expansum* o seu principal produtor (Saleh e Goktepe, 2019). *Penicillium expansum* pode infectar diferentes frutas e vegetais, mas tem preferência por maçãs sendo os produtos alimentícios à base dela as principais fontes de exposição à patulina para os seres humanos (Saleh e Goktepe, 2019).

Estudos de longa data realizados em animais já demonstravam preocupação quanto a segurança da ingestão de patulina pelos seres humanos, uma vez que foi evidenciado que a intoxicação aguda da micotoxina poderia levar a complicações de saúde como hiperemia gástrica e duodenal, distensão abdominal, lesões histopatológicas incluindo ulceração e inflamação do estômago e do intestino (McKinley e Carlton, 1980; McKinley et al., 1982) além de distúrbios gastrointestinais como náuseas e vômitos (Drusch e Ragab, 2003). A toxicidade do consumo de patulina foi descrita pela primeira vez em animais roedores (Broom et al., 1944), tendo também demonstrado capacidade mutagênica para cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e também em ratos (Mayer e Legator, 1976; Schumacher et al., 2006), teratogênica para embriões de galinha (Ciegler et al., 1976), possivelmente carcinogênica em ratos e células mutantes de *Bacillus subtilis* (Dickens e Cooke, 1965; Ueno e Kubota, 1976; Gaucher, 1979) e imunossupressora em ratos e coelhos (Escoula et al., 1988).

No entanto, com base na falta de dados toxicológicos em humanos, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) considerou a patulina no Grupo 3 sendo não classificado como carcinogênico para humanos (IARC, 2015). Porém, segundo estudos mais recentes, esta classificação precisa ser revista, pois a cada ano novos relatos surgem sobre a carcinogênese e toxicidade desta micotoxina (Pfenning et al., 2014; Al Wright; 2015; Ostry et al., 2017)

Muitos países, como o Brasil, os Estados Unidos, e os países pertencentes à União Europeia, estipularam valores máximos aceitáveis de patulina em sucos de maçã de 50 µg/kg (FDA, 2000, EC, 2006, ANVISA, 2011). Na Europa, produtos sólidos de maçã como compota e puré, receberam valores ainda mais baixos (25 µg/kg) e se os mesmos se destinarem a crianças jovens (rotulados e vendidos como tal), sendo suco, produtos sólidos compotas e puré (todos de maçã) o valor máximo aceitável passa para 10 µg/kg (EC, 2006). No entanto, níveis preocupantes de contaminação por patulina têm sido registrados em diversos países, principalmente em produtos feitos a partir de maçãs, e ocasionalmente em outros alimentos (Funes e Resnik, 2009; Shephard et al., 2010; Barreira et al., 2010; Yuan et al., 2010; Guo et al., 2013; Oroian et al., 2014; Zouaoui et al., 2015; Oteiza et al., 2017; Hammami et al., 2017; Torović et al., 2018; Iqbal et al., 2018; İçli, 2019). Portanto, um acompanhamento mundial dos níveis de patulina nos alimentos deve ser considerado (Vidal et al., 2019).

No sentido de desenvolver a dissertação de mestrado na área de Microbiologia Clínica, escolheu-se este tema no seguimento do interesse da formação acadêmica da aluna, que é na área de Nutrição. Esta pesquisa intitulada “Quantificação de patulina em sucos de maçã disponíveis no mercado sul brasileiro”, procurou quantificar a ocorrência da micotoxina patulina em amostras de sucos de maçã produzidos no Brasil e vendidos em supermercados localizados na região sul do país. A autora objetivou avaliar a qualidade dos sucos oferecidos aos consumidores sul brasileiros quanto a presença da micotoxina. Este trabalho foi realizado analisando todas as 15 marcas de sucos de maçã disponíveis nos maiores supermercados dos dois estados, utilizando um método analítico extremamente sensível e adequado, conhecido como cromatografia em fase gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS), após uma fase de derivatização.

II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. Fungos e Micotoxinas

Os fungos são divididos em pluricelulares (cogumelos e bolores) e unicelulares (leveduras). Cerca de 100.000 espécies já foram descritas na literatura, sendo a cada ano descobertas mais de 4.000 novas espécies (Santos, 2015). Estima-se que a diversidade do reino seja de 5 milhões de espécies, representando depois dos insetos, o grupo de organismos mais diverso do planeta (Santos, 2015). Seu habitat natural são principalmente o solo ou matéria vegetal morta. Alguns fungos são parasitas de plantas, enquanto outros podem ser patogênicos tanto para os humanos quanto para os animais. Além disso, muitos fungos também podem beneficiar a vida humana, através de seus processos fermentativos e da síntese de antibióticos (Madigan, 2016).

Fungos são organismos eucariotas, heterotróficos e de forma geral são quimiorganotróficos, apresentando necessidades nutricionais relativamente simples, sendo a maioria aeróbia (Santos, 2015). Os fungos filamentosos, também chamados de bolores são extremamente comuns na natureza, podendo ser utilizados tanto na medicina quanto na indústria. Exemplos destas utilizações podem ser baseadas, no caso da medicina, em fungos como *Penicillium notatum* para produção penicilina (Foster et al. 1943) ou *Tolypocladium inflantum* para síntese de ciclosporina a qual é uma droga imunossupressora utilizada principalmente para reduzir a probabilidade de rejeição em órgãos transplantados (Doutre, 2002). No caso da indústria, podemos citar principalmente a indústria de alimentos a qual produz diversos produtos como pães, bebidas como cerveja e vinho entre outros, a partir do uso de dezenas de fungos leveduriformes distintos (Takahashi et al., 2017). Apesar da sua utilização positiva em alguns aspectos, os fungos também podem estar presentes em diversos alimentos de forma negativa, contaminando-os e causando a sua deterioração, podendo trazer perdas econômicas para a indústria e também tornarem-se um problema de saúde pública, trazendo doenças para os seres humanos (Vecchia e Fortes, 2007). A exposição aos fungos em hospedeiros animais pode originar as doenças conhecidas como micoses, já

no caso de toxinas via trato digestivo e respiratório são conhecidos como micotoxinoses (Bennett e Klich, 2003).

Para que os fungos se desenvolvam de forma adequada, os produtos primários do metabolismo produzidos por eles são essenciais. Para os produtos secundários, os quais são formados mais ao final da etapa exponencial de crescimento, estes já não são tão relevantes para o crescimento ou metabolismo do fungo (Food Ingredients Brasil, 2009). Uma das formas que os fungos encontram para reduzir a quantidade de precursores que não são necessários para o seu metabolismo, é a produção de micotoxinas (Food Ingredients Brasil, 2009).

Os termos *Mykes* (grego) que significa fungo e *Toxicum* (latim) que denota tóxico ou veneno, deram origem a palavra micotoxina (Jay, 2005). Por definição, as micotoxinas são consideradas metabólitos secundários sintetizados por gêneros distintos de fungos filamentosos (Bennett e Klich, 2003). Entre suas principais características estão o baixo peso molecular, heterogenicidade química e um amplo espectro de toxicidade sendo capaz de atuar em pequenas quantidades (Bennett e Klich, 2003). Seu baixo peso molecular torna a ocorrência desta substância natural praticamente inevitável. Ela pode entrar na cadeia alimentar em diferentes fases do processo, podendo contaminar o alimento de forma direta, a partir da plantação, ou de forma indireta, através do crescimento de fungos nos alimentos (Alshannaq e Yu, 2017).

O estudo das micotoxinas teve início em 1962 na sequência de uma crise veterinária atípica, que resultou na morte de mais de 100.000 aves, principalmente perus, nos arredores de Londres (Bennett e Klich, 2003). Na ocasião, foi descoberto que a ração dos animais, que era baseada em amendoim, estava contaminada com um fungo, chamado *Aspergillus flavus*, o qual gerava um metabólito secundário denominado de aflatoxina, causando a morte dos animais. O surto ficou conhecido como “*turkey X disease*”, tendo as micotoxinas a partir de então, uma grande expressividade no meio científico (Bennett e Klich, 2003).

Entre os maiores produtores de micotoxinas em alimentos estão os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Juntos, eles produzem mais de 300 tipos diferentes de micotoxinas, como as aflatoxinas, ocratoxina, fumonisinas, zearalenona, tricotecenos e patulina, sendo estas consideradas as seis mais importantes no que respeita à saúde humana e as que causam os maiores problemas de segurança alimentar (Alshannaq e Yu, 2017). De acordo com Tola e Kebede (2016) existem algumas divisões entre os fungos produtores de micotoxinas: no grupo 1 estão os que invadem o alimento antes da colheita, mais conhecidos como fungos do campo, e no grupo 2 os que contaminam após a colheita, chamados de fungos de armazenamento. Há também uma subdivisão dentro do grupo 1 com três tipos diferentes de fungos considerados toxicogênicos: a) os fitopatógenos, como por exemplo *Fusarium graminearum*; b) fungos que se desenvolvem em plantas senescentes ou também estressadas, como *Fusarium moniliforme* e, por vezes, *Aspergillus flavus*; e c) fungos que colonizam a planta anteriormente a colheita predispondo os produtos (frutas, verduras, vegetais, cereais, entre outros) à contaminação por micotoxinas, como por exemplo *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus flavus* (Tola e Kebede, 2016).

Os efeitos tóxicos causados pela ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas são quase exclusivamente sistêmicos, sendo os efeitos tóxicos desencadeados em tecidos e órgãos muito distantes do local de entrada (Oga et al., 2014). Mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e citotoxicidade são algumas das complicações de saúde reportadas às micotoxinas (Ciegler et al., 1976; Schumacher et al., 2006; Liu e Wu, 2010; De Ruyck et al., 2015; IARC, 2015; Raiola et al., 2015; Mostrom, 2016). Segundo Oga et al. (2014), estima-se que mais de 90% de todos os tipos de cancro observados na população humana resultem de exposição a agentes químicos, sendo 50% destes, provocados por substâncias químicas presentes em alimentos. O maior perigo reside na exposição a baixas concentrações da substância de forma continuada, por um longo período de tempo, causando um efeito cumulativo no organismo (Oga et al., 2014).

Interessados no propósito de identificar o perigo das micotoxinas em relação ao cancro, a Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC), localizada em Lyon, França,

criou uma classificação para o risco de carcinogénese para as principais micotoxinas (Ostry et al., 2017). Este programa teve início em 1969, sendo ampliado ao longo dos anos. Hoje conta com o apoio de um grupo de cientistas independentes, que consideram todas as informações relevantes sobre o consumo de micotoxinas e carcinogénese, avaliando e classificando as evidências mais e menos relevantes sobre este assunto (IARC, 2015).

A classificação das micotoxinas pela IARC em relação ao cancro é dada da seguinte forma: “Grupo 1 (carcinogénicos para humanos)”, “Grupo 2A (provavelmente carcinogénicos para humanos)”, “Grupo 2B (possivelmente carcinogénico para humanos)”, “Grupo 3 (não classificado como sendo carcinogénico para humanos)”, “Grupo 4 (provavelmente não carcinogénico para humanos)” (Ostry et al., 2017, p. 67).

Além da carcinogénese, estudos relacionam o consumo de micotoxinas com o desequilíbrio da microbiota intestinal, podendo ocasionar alterações importantes no sistema imunitário (Assunção et al., 2016; Liew e Redzawan, 2018). “A mucosa intestinal é a primeira barreira biológica encontrada pelas toxinas presentes na dieta, podendo assim ser exposta a teores elevados destas substâncias (...)” (Assunção et al., 2016, p. 26). A exposição a longo prazo às micotoxinas também pode produzir mudanças significativas na composição da microbiota e na atividade metabólica (Liew e Redzawan, 2018).

Um estudo de revisão realizado por Robert et al. (2017) teve como objetivo resumir os principais efeitos das micotoxinas em relação à saúde humana (desoxinivalenol, aflatoxina B1, ocratoxina A, fumonisinas B1, zearalenona e patulina) na barreira intestinal. A revisão demonstrou que já são bastante documentados os efeitos de alteração da integridade das células epiteliais intestinais relativamente ao consumo destas micotoxinas, mas por outro lado, ainda pouco investigados os seus efeitos deletérios quando avaliada a microbiota de uma forma mais global (Robert et al., 2017). O autor se refere aos problemas intestinais reportados às micotoxinas de forma a separar os efeitos relacionadas ao epitélio do intestino (barreira física), ao muco (barreira química) e a microbiota (barreira biológica) (Robert et al., 2017).

Para as micotoxinas desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas B1 e zearalenona a revisão demonstrou que já existem alguns trabalhos que investigam os problemas causados pelas três diferentes formas de barreiras intestinais relacionadas ao consumo destas micotoxinas. Para a aflatoxina B1, somente a barreira física e biológica já foram estudadas e para a patulina, só há estudos que relacionam o consumo da micotoxina à barreira física e química, não tendo até o momento estudos conclusivos sobre os efeitos da patulina na microbiota humana (Robert et al., 2017).

Como exemplos destes efeitos, em relação ao epitélio intestinal, podemos destacar para a toxina desoxinivalenol a diminuição na absorção de glicose (através da supressão do transportador de glicose SGLT1), em estudo realizado em frangos (Awad et al., 2011); o aumento de danos ao DNA e a diminuição nas vilosidades, ambas observadas em ratos (Payros et al., 2017); para a ocratoxina A, a indução de dano oxidativo em células humanas GES-1 (Jia et al., 2016); para as fumonisinas B1, diminuição na altura das vilosidades e aumento nos escores lesionais de porcos (Grenier et al., 2012); e para zearalenona, diminuição na taxa de sobrevivência de células IPEC-J2 em porcos (Wan et al., 2013). Para as alterações reportadas ao muco, alguns exemplos são a diminuição na produção de mucina e diminuição de mRNA de MUC1, MUC2 e MUC3 em células humanas (desoxinivalenol) (Pinton et al., 2015); hiperplasia de células caliciformes (Brown et al., 1992); diminuição na expressão de mRNA de MUC2 no duodeno; aumento significativo na composição de monossacarídeos (fumonisinas B1) (Antonissen et al., 2015). Já para a microbiota, alguns exemplos são, no caso da zearalenona, redução no total de bactérias aeróbicas cultiváveis em porcos (Piotrowska et al., 2014); e para a ocratoxina A, aprimoramento da família *Lactobacillaceae* e diminuição da diversidade α -microbiana de ratos (Guo et al., 2014).

Para a patulina, alguns exemplos do seu impacto no epitélio intestinal foram observados em células humanas Caco-2, entre eles a diminuição da viabilidade celular (Mahfoud et al., 2002); a redução da resistência elétrica transepitelial (TEER - *Transepithelial Electrical Resistance*) (McLaughlin et al., 2009; Kawauchiya et al., 2011; Assunção et al., 2016); e também o aumento da citotoxicidade e da morte celular (Tannous et al., 2017). Ainda a nível epitelial, mas em um modelo experimental feito a partir de

explante de cólon de ratos, alterações morfológicas da mucosa e diminuição da TEER também foram documentadas (Mohan et al., 2012). Ainda referente a barreira física, pesquisadores observaram um aumento na apoptose celular em estudo feito em explante de jejuno de porcos (Maidana et al., 2016). Para a barreira química relacionada ao muco intestinal, Maidana et al. (2016) também encontrou efeitos negativos, relatando uma redução no número de células caliciformes das vilosidades e criptas.

Além da relação com a saúde, as micotoxinas, também têm um impacto significativo na economia em muitos países. Muitas vezes, produtos que são enviados do Brasil para exportação são rejeitados pelos países importadores pela presença de micotoxinas, e acabam sendo consumidos pela população brasileira (Sabino, 2014). Este é um dos motivos que levou a que autoridades brasileiras concluíssem que era necessário implementar programas para reduzir a contaminação por micotoxinas. Como exemplo destes programas, podemos citar a prática da agricultura moderna (baseada em uso de tecnologias, características do mercado agrícola, investimentos, gestão, e apoio governamental) bem como o processamento de alimentos regulado pela legislação (Sabino, 2014).

Como já citado, as seis principais micotoxinas encontradas em alimentos são aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenonas, tricotecenos e patulina. Na tabela 1 é possível observar estas micotoxinas seguidas das principais espécies de fungos que as produzem bem como os principais alimentos que elas contaminam.

Tabela 1: Principais micotoxinas com importância alimentar

Micotoxina	Espécie de Fungo	Principais alimentos contaminados
Aflatoxina B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Milho, trigo, arroz, sorgo, cevada, oleaginosas (pistache, amêndoa, nozes, amendoim) figo, semente de algodão e girassol, especiarias
Aflatoxina M1 <i>Metabolito da Aflatoxina B1</i>		Leite e produtos à base de leite
Ocratoxina	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Cevada, centeio, milho, aveia, trigo, vinhos, frutas secas, uvas, café, cacau,

	<i>Aspergillus carbonarius</i>	queijo, arroz, feijão, ervilha, carne e o leite
FumonisininasB1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Milho, produtos à base de milho, sorgo, aspargos, trigo, soja, cevada, figo e chá preto
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereais, produtos à base de cereais, milho, trigo, cevada, sorgo e centeio
Desoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereais, produtos à base de cereais
Tricoteceno	<i>Fusarium culmorum</i>	trigo, centeio, milho e aveia.
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Maçã, suco de maçã e concentrado, peras, tomate, figos, cereais, queijos, romã, pêssago, abacaxi, suco de uva branca e vermelha

Adaptado de: Hussein e Brasel, 2001; Bennett e Klich, 2003; Magnoli, 2007; Stoev, 2013; Wu et al., 2013; Pattono et al., 2013; Cunha et al., 2014; Alshannaq e Yu, 2017.

i. Aflatoxina

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas compostas por 20 diferentes tipos de metabólitos secundários, os quais são produzidos principalmente pelo género fúngico *Aspergillus*, sendo as principais espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Liu e Wu, 2010). Desde que foram descobertas como o agente causador da “turkey X disease” na década de sessenta, as aflatoxinas têm sido das micotoxinas mais estudadas no mundo científico, principalmente por seu potencial carcinogénico já comprovado (Pitt e Miller, 2017; Alshannaq e Yu, 2017).

Uma gama de alimentos pode ser infectada por fungos produtores de aflatoxinas, entre eles, cereais como milho, cevada, arroz, aveia e sorgo, oleaginosas como amendoim, nozes, pistache, amêndoas e semente de girassol (Tabela 1) (Bennett e Klich, 2003). O leite também pode ser contaminado com aflatoxina do tipo M1 (Bennett e Klich, 2003).

Entre os problemas de saúde mais conhecidos pelo consumo de alimentos contaminados com aflatoxina, destacam-se os seus efeitos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, imunossupressores, sendo o fígado o principal órgão atingido (Newberne e Butler, 1969; Peers e Linsell, 1973; Eaton e Groopman, 1994; Bennett e Klich, 2003; Ostry et

al., 2017). Os efeitos carcinogênicos podem ser tanto agudos quanto crônicos, tanto em humanos quanto em animais (Bennett e Klich, 2003).

As aflatoxinas, incluindo os tipos B1, B2, G1, G2 e M1, são as únicas toxinas até o momento classificadas no grupo 1 do IARC, comprovadamente carcinogênica em humanos, demonstrando principalmente, alto risco de causar carcinoma do fígado (Ostry et al., 2017).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2011, foram estabelecidos níveis aceitáveis de aflatoxinas em alimentos para os brasileiros. Alguns exemplos dos limites máximos toleráveis (LMT) contemplados no documento, são as aflatoxinas M1 (leite e queijos: 0,5 até 2,5 µg/kg), e aflatoxinas B1, B2, G1, G2 (cereais, feijões, castanhas, frutas desidratadas, milho, cacau, fórmulas infantis e alimentos a base de cereais para crianças: 1 até 20 µg/kg) (ANVISA, 2011). Na Europa, a Comissão das Comunidades Europeias, através da Comissão Regulatória (EC) de 2006, também regulamentou o consumo de diversos alimentos, dividindo as aflatoxinas em grupos: M1 (0,025 até 0,050 µg/kg), B1 (0,10 até 8 µg/kg) e B1, B2, G1 e G2 (4 a 15 µg/kg) (EC, 2006).

ii. Ocratoxina

Descoberta em 1965 na África do Sul, a ocratoxina é produzida por fungos como *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e também por outras espécies do género *Penicillium*. A micotoxina mais importante e também mais tóxica conhecida dentro deste grupo é chamada de ocratoxina A (OTA) (Duarte et al., 2010).

A OTA é encontrada em diversos géneros alimentícios, como milho, trigo, cevada, centeio, café, arroz, aveia, feijão, ervilha, frutas secas, suco de uva e também no vinho (Tabela 1) (Magnoli, 2007). Além dos alimentos vindos da agricultura, produtos da pecuária também podem estar contaminados com esta toxina, entre eles, destacamos a carne e o leite (Stoev, 2013).

Os efeitos negativos na saúde devido à ingestão de OTA acima dos limites tolerados já eram relatados em estudos antigos, por causar nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em humanos (Pitt, 2000). Além disso, genotoxicidade, neurotoxicidade, teratogenicidade e embriotoxicidade também já foram reportados tanto em humanos quanto em animais (Mantle, 2002). Outra doença relacionada com o consumo de OTA é a nefropatia endêmica dos Balcãs (BEN - *Balkan Endemic Nephropathy*), doença crônica do túbulo intersticial, que já foi reportada há alguns anos, afetando pessoas que vivem no sudoeste europeu (Pfohl-Leszkowicz, 2009).

Atualmente, segundo a classificação da IARC, a OTA faz parte do grupo 2B, posição essa que representa possibilidade de ser carcinogênica para humanos. Porém, segundo Ostry et al. (2017), quando avaliados os estudos mais recentes, publicados nos últimos 5 anos, não seria inapropriado reclassificá-la para o grupo 2A (provavelmente carcinogênico em humanos), dando-lhe um *upgrade*.

De acordo com a ANVISA, os LMT para OTA em alimentos variam de 2 µg/kg para alimentos a base de cereais destinados a crianças, vinho e suco de uva, 10 µg/kg para cereais, feijão e café torrado, até 30 µg/kg para especiarias como pimenta, gengibre e noz moscada (ANVISA, 2011). A Comissão das Comunidades Europeias estabeleceu os limites de OTA, um pouco mais baixos que o Brasil, variando entre 0,50 e 10 µg/kg para diversos alimentos (EC, 2006).

iii. Fumonisin

O gênero *Fusarium*, principalmente as espécies *Fusarium verticillioides*, e *Fusarium proliferatum* são os principais produtores do grupo de micotoxinas conhecido como fumonisin (Yazar e Omurtag, 2008). Até o momento, já foram descritos 28 diferentes tipos de fumonisin, sendo classificadas em quatro grupos (A, B, C e P). A mais comum é conhecida como B1 (FB1), representando 70 a 80% de todas as fumonisin (Rheeder et al., 2002).

A FB1 é normalmente encontrada nos grãos de milho (Reddy et al., 2010). Além do milho, outros alimentos comumente contaminados são o trigo, soja, sorgo, cevada, aspargos, figo e chá preto (Tabela 1) (Bennett e Klich, 2003). Nos Estados Unidos, estimou-se que 80% da plantação de milho estivesse contaminada com *Fusarium proliferatum* (Yazar e Omurtag, 2008). Na China, a percentagem foi ainda maior, contabilizando 98,1% de contaminação nas amostras da produção de milho em 2014 (Li et al., 2015 b).

A FB1 é a fumonisinas mais prevalente na alimentação humana e foi classificada pela IARC no grupo 2B, o que significa que ela é possivelmente carcinogénica em humanos (Ostry et al., 2017). Estudos de longa data já demonstravam associação de cancro de esófago com o consumo de grãos de milho contaminados com micotoxinas em regiões da África, China e Itália (Peraica et al., 1999).

De acordo com a ANVISA, o consumo máximo de fumonisinas B1 e B2 tolerados em alimentos são de 1000 µg/kg para amido de milho e produtos derivados do milho e 200 µg/kg para alimentos a base de milho destinado a crianças (ANVISA, 2011). A Comissão Regulatória Europeia, também estabeleceu limites para B1 e B2, variando entre 400 e 2000 µg/kg (EC, 2006).

iv. Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina também produzida pelo género *Fusarium*, principalmente pela espécie *Fusarium graminearum*. Possui uma estrutura química similar ao estrogênio, induzindo efeitos desta hormona em animais (Bennett e Klich, 2003).

ZEA é frequentemente encontrada como contaminante em alimentos como trigo, milho, sorgo, cevada e centeio (Tabela 1), sendo a contaminação do milho mais comum nos Estados Unidos e a do centeio e aveia mais recorrente em países Europeus (Hussein e

Brasel, 2001). A contaminação do trigo já foi relatada tanto nos Estados Unidos quanto na Europa (Hussein e Brasel, 2001).

Segundo a IARC, a ZEA foi classificada no grupo 3, demonstrando efeito limitado como carcinogénico em humanos (Ostry et al., 2017). Porém, uma série de complicações de saúde estão relatadas na literatura, destacando-se importantes transformações no sistema reprodutor de ratos, coelhos e porcos que se manifestam como infertilidade, inchaço do útero e vulva e atrofia de ovários (Kowalska, 2016).

A ANVISA determina um limite tolerável de 20 µg/kg de ZEA para os alimentos feitos a base de cereais destinados à alimentação infantil sendo crianças de primeira infância e lactentes, 100 µg/kg para farinha de trigo e arroz e 150 µg/kg para a farinha de milho (ANVISA, 2011). Na Europa, os valores apresentam-se bastante semelhantes, seguindo 20 µg/kg para alimentos destinado a crianças, chegando até 200 µg/kg para farinha de milho e derivados (EC, 2006).

v. Tricoteceno

As primeiras informações sobre os tricotecenos (TCTC) provém de meados de 1890, na Sibéria, onde havia relatos de sintomas como dores de cabeça, vômito e vertigem relacionados com o consumo de grãos (Pestka e Smolinski, 2005). Em 1932 os TCTC foram reconhecidos como a causa da intoxicação alimentar *aleukia* (ATA) na extinta União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (Yazar e Omurtag, 2008). A partir de então, mais de 150 tipos diferentes de TCTC foram descobertos (Yazar e Omurtag, 2008).

Segundo Wu et al. (2013), assim como as fumonisinas e a ZEA, os TCTC são produzidos principalmente por fungos do género *Fusarium* e são comumente encontrados em cereais como trigo, centeio, milho e aveia (Tabela 1). Estas micotoxinas dividem-se em grupos, conhecidos como A, B C e mais recentemente, D, sendo estes diferenciados pela sua estrutura química (Wu et al. 2013). Os tipos A e B são os que

causam maiores preocupações para a saúde humana e animal, tanto pela sua grande distribuição global como pela alta toxicidade (Wu et al., 2013).

A toxina T-2 (Grupo A) e o desoxinivalenol (DON) (Grupo B), são os TCTC mais importantes e mais estudados por apresentarem a maior toxicidade e a maior distribuição global, respectivamente (Wei et al., 2017). Segundo a IARC, ambas as toxinas foram classificadas no grupo 3, representando não carcinogenicidade em humanos (Ostry et al., 2017). Alguns dos sintomas causados pela ingestão de DON incluem, febre, tonturas, dor abdominal, náuseas e vômitos além de diarreia e dor de cabeça (Sobrova, 2010).

A ANVISA determinou o LMT para o DON em alimentos, sendo 1000 µg/kg para trigo integral, cevada, 750 µg/kg para arroz e derivados e 200 µg/kg para cereais destinados a crianças (ANVISA, 2011). Assim como no Brasil, para os países Europeus a recomendação de DON para cereais destinados a crianças foi de 200 µg/kg e o valor máximo de 1750 µg/kg foi determinado para farinha de trigo e milho não processados (EC, 2006).

2. Patulina

O estudo da patulina teve início em meados da década de 40, sendo na época investigada como um possível composto antimicrobiano e anticancerígeno e também utilizada para tratar a gripe comum. Naquele tempo era conhecida sob o nome de tercinina (Saleh e Goktepe, 2019).

A sua atividade como antimicrobiano era bastante promissora, uma vez que demonstrava ser até dez vezes mais eficaz no tratamento de infecções por *Bacillus* sp. do que a Penicilina G. (Gaucher, 1979). Na ocasião, a substância era retirada de *Penicillium patulum* (mais tarde chamado de *Penicillium urticae* e, hoje em dia, conhecido como *Penicillium griseofulvum*) (Steiman et al., 1989). No entanto, entre 1950 e 1960, seus aspectos tóxicos se tornaram evidentes, tanto em plantas quanto em animais, impedindo

seu uso clínico como antibiótico (Steiman et al., 1989). A partir da década de 60, a patulina foi reclassificada, sendo conhecida como um metabólito secundário tóxico, de origem fúngica, ou seja, uma micotoxina (Steiman et al., 1989).

A estrutura química da patulina (Figura 1) foi elucidada por Woodward e Singh, em 1949, sendo descrita como um lactona de nome químico 4-hidroxi-4h-furo[3,2-c]pirano-2(6h)-ona (Ciegler et al., 1971).

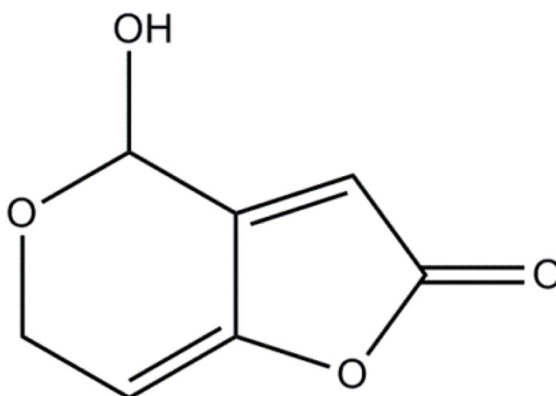


Figura 1. Estrutura química da patulina. Fonte: Ioi et al., 2017.

A patulina, cuja fórmula empírica é $C_7H_6O_4$, composta por carbono (54,55%), hidrogénio (3,92%) e oxigénio (41,52%), tem um peso molecular de 154,0266. A patulina também é conhecida como claviformina, clavatina, clavacina, expansina, penicidina, micoína, leucopina e tercinina (Cole e Cox, 1981).

Apresenta-se como um sólido cristalino, sendo solúvel em acetato de etilo, etanol, clorofórmio e água (Oga et al., 2014). É instável em soluções alcalinas, perdendo a sua atividade em soluções de compostos sulfurosos, sendo estável em soluções ácidas (Oga et al., 2014). É relativamente resistente ao calor, não sendo destruída pela pasteurização (Oga et al., 2014).

i. Fungos que Produzem Patulina

O fungo mais importante na produção de patulina é *Penicillium expansum*. Porém também podemos destacar sua presença em outras espécies de *Penicillium*, como *Penicillium claviforme*, *Penicillium urticae* e *Penicillium patulum* (Barad et al., 2016). Outros gêneros de fungos também são produtores de patulina, destacando-se entre eles as espécies: *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus giganteus*, *Byssoclamys fulva*, *Byssoclamys nivea* e *Alternaria alternata*, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Byssoclamys* e *Alternaria* (Drusch e Ragab, 2003). Em estudo recente, 166 diferentes espécies de fungos demonstraram produzir patulina, entre eles, 77 pertenciam ao gênero *Penicillium*, demonstrando a dificuldade de controle desta micotoxina, uma vez que pode ser produzida por distintos gêneros e espécies (Frisvad, 2018).

Embora a patulina possa ser produzida por diferentes fungos, *Penicillium expansum* apresenta-se como o mais importante deles, sendo capaz de produzir grandes quantidades da micotoxina, sendo esta um contaminante comum de maçãs e produtos alimentícios preparados a partir dela (Barad et al., 2016). Em estudo de revisão realizado por Zhong et al. (2018) também foi demonstrado que *Penicillium expansum* é o principal fungo produtor de patulina em maçãs e em produtos à base dela, sendo também o mais amplamente distribuído nos locais de armazenamento da fruta. Estudos que compararam os genomas de *Penicillium expansum* com uma espécie não produtora de patulina (*Penicillium italicum*), concluíram que *Penicillium expansum* possui o maior número de genes para a produção de metabólitos secundários (Ballester et al., 2015 e Li et al., 2015 a). A espécie *Byssoclamys nivea* também é bastante relevante como contaminante de sucos pasteurizados, por ser o fungo mais resistente ao calor a produzir a micotoxina (Funes et al., 2013).

Penicillium expansum causa o mofo azul (Figura 2), uma podridão parda e macia que com o tempo desenvolve conidióforos azuis esverdeados e conídios. *Penicillium expansum* produz vários metabólitos secundários, além da patulina (Errampali, 2014).



Figura 2: Mofo azul causado por *Penicillium expansum*. Fonte: Alchetron, 2018.

Como um fungo psicrófilico, *Penicillium expansum* cresce bem a 0 °C ou até -2 ou -3 °C. Desta forma, o fungo ainda pode infectar as maçãs durante o processo de armazenamento a frio (Morales et al., 2007).

ii. Efeitos Tóxicos da Patulina

A toxicidade da patulina foi descrita pela primeira vez em animais roedores causando edema grave de pulmão, danos capilares em órgãos isolados (onde a patulina foi perfundida) e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos dilatados, aumentando a formação de edema (Broom et al., 1944). Naquela ocasião, a micotoxina foi considerada muito tóxica para uso terapêutico (Broom et al., 1944). Mayer e Legator (1969) também confirmaram a toxicidade da micotoxina quando expuseram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a doses de 50 µg/ml de patulina por 3 horas, resultando além de toxicidade, em mutação de 60 a 80% da amostra, com apenas 1% de sobrevivência (Mayer e Legator, 1969). A inflamação pulmonar também pareceu ser a causa da morte de ratos que receberam patulina via intubação gástrica numa frequência de três vezes por semana na dose de 1,5 mg/kg (Becci et al., 1981). Na mesma pesquisa, doses menores (0,5 mg/kg) causaram diminuição no ganho de peso dos animais (Becci et al., 1981).

Além da mutação descrita por Mayer e Legator (1969), outro estudo um pouco mais recente investigou a mutação do DNA de células pulmonares de ratos (Schumacher et al., 2006) afim de verificar o potencial da patulina em induzir quebras no DNA,

modificações oxidativas e *cross-links* DNA-DNA, utilizando um ensaio clínico baseado em fluorescência. Os achados foram positivos para os efeitos mutagênicos da patulina, porém seu mecanismo foi considerado desconhecido (Schumacher et al., 2006).

Dickens e Cooke (1965) documentaram o possível efeito carcinogênico da patulina quando administrada com injeções subcutâneas em ratos (Dickens e Cooke, 1965). Sua provável carcinogenicidade também foi demonstrada por Ueno e Kubota (1976) através de um estudo experimental que resultou na capacidade da toxina em atacar o DNA de células mutantes de *Bacillus subtilis* (Ueno e Kubota, 1976). Ainda no ano de 1976, outro estudo demonstrou que a injeção de 68,7 µg de patulina em células embrionárias de galinha causou um efeito letal às células e um efeito teratogênico para embriões de 4 dias (Ciegler et al., 1976).

Outros efeitos estudados sobre a patulina englobam seu potencial imunossupressor e genotóxico (Escoula et al., 1988; de Melo et al., 2012). Seu efeito imunossupressor foi investigado em uma pesquisa utilizando 10 mg/kg da toxina em ratos administrado via tubo estomacal e 2,5 mg/kg em coelhos via intraperitoneal. O trabalho demonstrou uma supressão dos leucócitos e redução dos níveis séricos de imunoglobulinas em ambos os animais além da redução dos linfócitos totais do baço dos ratos (Escoula et al., 1988). Quanto a genotoxicidade, avaliou-se os efeitos da patulina em múltiplos órgãos (cérebro, rim, fígado e bexiga) de camundongos. A patulina foi administrada em doses que variaram de 1,0 a 3,75 mg/kg via intraperitoneal. A dose mais alta de patulina induziu quebra na fita de DNA do cérebro, fígado e rins dos animais (de Melo et al., 2012).

Em humanos, os efeitos agudos do consumo da micotoxina já foram documentados, incluindo principalmente problemas gastrointestinais como náuseas e vômitos uma vez que o consumo da patulina ocorre principalmente por via oral (Drusch e Ragab, 2003). Outros trabalhos realizados em animais evidenciam que a ação aguda da patulina, pode causar hiperemia gástrica e duodenal, distensão abdominal além de lesões histopatológicas incluindo ulceração e inflamação do estômago e intestino (McKinley e Carlton, 1980; McKinley et al., 1982; de Melo et al., 2012).

Embora a toxicidade crônica da patulina em seres humanos não tenha sido demonstrada de forma conclusiva e os efeitos da exposição a longo prazo ainda sejam desconhecidos, limitar a sua concentração nos alimentos é tomado como medida de precaução (Cunha et al., 2014). No entanto, por falta de dados toxicológicos em seres humanos (diferente do que é visto em estudos em animais), desde 1986 a IARC tem afirmado que a patulina não é cancerígena, sendo classificada no Grupo 3 (não classificado como carcinogênico em humanos). Porém, não é descartada a possibilidade desta informação ser modificada no futuro uma vez que esta não carcinogenicidade não pode ser absolutamente confirmada devido a falta de estudos (Al Wright, 2015, Ostry et al., 2017).

Segundo Al Wright (2015), e corroborando com Ostry et al. (2017), as classificações por grupos reportam um passado longínquo, sendo necessário rever estes conceitos à medida que mais relatos surgem sobre a carcinogênese e toxicidade desta toxina. A capacidade da patulina de formar adutos com as quatro bases de ácidos nucleicos, mesmo na presença de glutathione, já demonstra a necessidade de um exame renovado de sua possível carcinogenicidade (Pfenning et al., 2014; Al Wright, 2015).

Apesar de haverem muitos estudos reportando os efeitos negativos da patulina tanto para a saúde humana quanto animal, pesquisas mais recentes parecem estar mudando o enfoque desta micotoxina trazendo agora uma abordagem mais positiva da sua relação com a saúde humana, sendo investigada como um possível tratamento anticancerígeno (Boussabbeh et al., 2015; Abastabar et al., 2017; Monteillier et al., 2018). Um dos primeiros trabalhos com este enfoque foi a investigação do efeito antitumoral da patulina contra a linhagem de melanoma B16F10 após injeção intraperitoneal por 20 dias em tumores implantados em ratos. Como conclusão, os pesquisadores relataram um efeito antitumoral seguido pela inibição da proliferação celular e da regressão do tumor. Este achado fortaleceu o interesse na patulina como um agente anticancerígeno (Boussabbeh et al., 2015).

Outro trabalho realizado *in vitro* (com células HeLa, SW-48 e MRC-5) que buscou determinar pela primeira vez a eficácia da patulina como uma estratégia terapêutica para o cancro cervical e colo retal utilizou diferentes concentrações da toxina e os resultados

obtidos mostraram uma redução significativa na viabilidade celular e na indução de apoptose sugerindo que a patulina pode diminuir significativamente o crescimento tumoral em modelos de cancro cervical e colo retal humano (Abastabar et al., 2017). Também pela primeira vez, autores investigaram o efeito terapêutico de metabólitos isolados de *Penicillium vulpinum* para o cancro de pulmão onde a patulina demonstrou efeitos antiproliferativos, proapoptóticos e de antimigração nas células de adenocarcinoma de pulmão humano (Monteillier et al., 2018).

iii. Principais Alimentos Contaminados

A patulina pode contaminar diferentes géneros alimentícios (Tabela 1), como maçãs, peras, tomates (Cunha et al., 2014), figos, cereais, queijos (Pattono et al., 2013), abacaxi, pêsego, romã, suco de uva branca e uva vermelha (Rahimi e Jeiran, 2015), marmelo (Cunha et al., 2009) e frutos do mar (Vansteelandt et al., 2012). Alimentos derivados de frutas como sucos, geleias e purés, também podem ser contaminados (Cunha et al., 2014).

A maçã e seus derivados são os alimentos que recebem maior atenção a respeito da contaminação por patulina (Fernández-Cruz et al., 2010). Essa ocorrência justifica-se devido as propriedades físico-químicas da fruta, como a atividade de água e o pH das maçãs, ambos favorecendo a germinação dos esporos do fungo (Tannous, 2016). Além destes dois fatores, diferentes origens genéticas e condições de crescimento moldam as características físicas e químicas da maçã, que eventualmente determinam a capacidade de cicatrização de feridas, bem como a susceptibilidade ao desenvolvimento de bolor e patulina em maçãs silvestres ou cultivadas (Zhong et al., 2018).

Um estudo realizado por Snini et al. (2016), demonstrou que os cultivares de maçã que compartilhavam perfis genéticos próximos, mostraram uma resposta semelhante ao ataque do patógeno, mesmo sendo maçãs de qualidades diferentes. Pesquisadores da Universidade do Porto (Portugal), publicaram um estudo onde se pretendeu identificar se havia diferença nos níveis de patulina em maçãs e tomates cultivados de forma convencional e orgânica, onde o resultado não apresentou diferença significativa

(Cunha et al., 2014). Neste mesmo trabalho foram encontrados níveis de patulina em sucos de maçã que variaram de 1,86 a 45,77 µg/kg e também contaminação de patulina em 35,7% das amostras de tomates (Cunha et al., 2014).

iv. Aspectos Relevantes para a Produção da Patulina em Alimentos

O desenvolvimento da patulina correlaciona-se com o aparecimento do já citado mofo azul. O fungo azul da maçã geralmente começa com a invasão de esporos de *Penicillium Expansum* nas lesões físicas sofridas pelas maçãs frescas. Estes cortes podem ser causados na fruta por quedas ao chão, por insetos ou por lesões sofridas pela maçã principalmente durante as operações de colheita e manuseio no pomar, até as etapas finais de processamento dos produtos (Sanzani et al., 2012).

A patulina pode ser encontrada na parte íntegra das maçãs, mas, para que o metabólito secundário seja produzido, é necessário que o fruto esteja danificado por danos físicos ou pela contaminação por insetos ou larvas (Oga et al., 2014). Maçãs que ficaram muito maduras ou permaneceram por muito tempo armazenadas também são bastante susceptíveis (Amiri e Bompeix, 2005). A firmeza de carne do fruto é também uma importante característica sensorial de todas as espécies de maçã, e está associada à resistência do fruto à podridão provocada pelo mofo azul e à produção de patulina. Com o amadurecimento dos frutos, a textura da polpa torna-se mais macia, o que leva a maiores riscos de infecção por patógenos (Wei et al., 2010). Além disso, a presença de *Penicillium* é geralmente mais alta nas instalações de armazenamento das frutas do que se encontra nos campos de plantação (Zhong et al., 2018).

A atividade de água (a_w) das maçãs, a qual representa a água presente no alimento capaz de interagir com microrganismos, apresenta um valor ideal (0,98 – 0,99) para a germinação dos esporos de *Penicillium expansum* (Tannous, 2016). O intervalo de pH da maçã (3,1 – 4,2), conforme já citado, também favorece a colonização pelo fungo e conseqüentemente a produção de patulina (Tannous, 2016; Zong et al., 2015).

A maçã também contém diversos componentes químicos, os quais afetam significativamente sua resistência às doenças fúngicas (Zhong et al., 2018). Os constituintes químicos mais importantes associados ao acúmulo de patulina em maçãs são os níveis de etileno, polifenóis e açúcares (Zhong et al., 2018).

Entre os fatores ambientais, a temperatura de armazenamento demonstra um grande desafio aos produtores de maçã. A patulina foi encontrada de forma exponencial tanto em maçãs armazenadas em temperaturas acima de 20 °C (Salomão et al., 2009) quanto em armazenamento resfriado de 1 – 4 °C (Spadaro et al., 2013), sugerindo uma grande capacidade de adaptação da micotoxina (Garcia et al., 2011).

Uma vez o fruto danificado, ele não costuma ser comercializado *in natura* nos supermercados, mas ainda pode ser destinado à indústria de sucos. Sendo assim, estas maçãs de grau inferior ou impróprias são usadas para processamento de suco ou cidra (Iha, 2006). Para este processo, a remoção de maçãs podres ou danificadas antes da prensagem é fortemente recomendada pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) há muitos anos, como uma medida para reduzir a ocorrência de patulina nos produtos finais (FAO, 2003).

No entanto, mesmo quando as maçãs que apresentam decomposição aparente são excluídas, a patulina tem sido constantemente detectada em produtos de maçã feitos a partir da fruta saudável externamente, as quais parecem apresentar uma podridão interna que não pode ser vista e, portanto, não são omitidas antes de serem processadas para fabricação dos sucos (Sanzani et al., 2012, Soliman et al., 2015).

Um outro recurso utilizado pelos produtores de maçã e que afeta a produção final de patulina é a colheita da fruta durante sua fase pré-climatérica (não amadurecimento) ou no período climatérico (comercialmente maduras) (Kingston, 2010). Após a colheita, os frutos são encaminhados para almoxarifados com atmosfera controlada, o que poderia ajudar a retardar o amadurecimento da maçã e prolongar o prazo de validade, fornecendo fruta fresca ao longo do ano. Esta atmosfera controlada, se refere ao controle interno dos níveis de gás O₂ e CO₂, os quais demonstram ter um papel crucial

no amadurecimento das maçãs e na produção de patulina por *Penicillium expansum* (Kingston, 2010).

v. Medidas de Controle Para Prevenir a Contaminação por Patulina

A contaminação por patulina do fruto, ou seja, da maçã, pode ser diminuída por algumas práticas pré-colheita e pós-colheita que asseguram limitar as infecções por *Penicillium expansum* como, por exemplo, a aplicação de fungicidas, agentes de biocontrole, uso de resistência induzida, boas práticas de colheita, irradiação, água quente, refrigeração, entre outras (Errampalli, 2014).

O teor de patulina encontrado nos alimentos processados finais é geralmente menor do que aqueles encontrados nas matérias-primas, pois estas etapas do processamento podem contribuir ativamente para sua redução, destacando-se ainda procedimentos como clarificação, filtração e tratamento enzimático durante o processo de suco de maçã e fermentação na produção de vinho (Bissessur et al., 2001). De forma geral, controles em todas as etapas do processamento das maçãs, como homogeneização, polpação, pasteurização e embalagem asséptica, contribuem para a redução dos níveis finais de patulina (Janotová et al., 2011).

Em relação à pasteurização, é importante salientar que só elimina o patógeno, mas não a presença de patulina (Sant’Ana et al., 2010). O efeito dos tratamentos térmicos sobre essa micotoxina ainda é controverso, provavelmente devido às diferenças na concentração inicial de patulina em produtos de maçã (Ioi et al., 2017).

Ainda em 1973, Lovett e Peeler, demonstram a redução de patulina em aproximadamente 90% quando expuseram a micotoxina à temperatura de 105 °C durante um período de 29 horas. Porém, considerando a perda de nutrientes e as baixas propriedades organolépticas após um tratamento de alta temperatura por um tempo prolongado, uma esterilização de alta temperatura, com menor tempo de exposição, é mais utilizada na indústria nos dias de hoje, mesmo que sua eficácia seja limitada em

relação à remoção de patulina (Zhong et al., 2018). Além disso, como a patulina é termicamente estável em condição ácida, o pH natural do suco de maçã (3,5) pode ajudar a estabilizar a micotoxina e reduzir a eficácia de qualquer tratamento térmico (Zhong et al., 2018).

Como já foi citado, lavar e remover as partes estragadas das frutas também é uma forma de reduzir a contaminação (Moake et al., 2005). A estabilidade da patulina é ilustrada por sua presença em produtos à base de maçã, como sucos, geleias, alimentos para bebês, mesmo após todo o processo de industrialização sofrido por estes alimentos (Cunha et al., 2009). Uma das práticas mais aceitas como eficaz para redução de patulina em sucos de maçã, a qual já foi descrita brevemente neste texto, é durante a colheita até o processamento evitar utilizar maçãs armazenadas em atmosfera controlada, que é uma forma de estocagem de longa permanência, ou separar e descartar as frutas armazenadas na atmosfera controlada que apresentarem lesões de podridão maiores do que 10 cm² (Baert et al., 2012). Embora eficaz, essa prática é considerada muito cara para ser implementada no processamento industrial (Baert et al., 2012).

Em estudo recente de Liu et al. (2018), testou-se uma nova forma de degradar patulina através de lipase pancreática de porcos (PPL - *Pig Pancreatic Lipase*), obtendo-se sucesso em tal experimento, demonstrando que a degradação desta micotoxina passa por reação enzimática. No trabalho, a completa degradação da patulina ocorreu a pH 7,5, a temperatura de 40 °C, com exposição à PPL por 48 horas. Tal resultado sugere que a PPL possa ser aplicada para degradação de patulina em sucos de frutas e vegetais, além desta lipase ser mais financeiramente acessível do que outras lipases comerciais (Liu et al., 2018).

O uso de leveduras e bactérias são também estudados há vários anos pela sua capacidade de degradar ou inativar a patulina. Estes microrganismos se mostraram eficazes no controle da infecção por bolor azul, como agentes de biocontrole, como por exemplo, *Rhodosporidium kratochvilovae*, *Pichiacaribbica*, *Metschnikowia*, *Lactobacillus plantarum*, *Kodameaeohmer* (Castoria et al., 2005; Cao et al., 2013; Spadaro et al., 2013; Hawar et al., 2013; Dong et al., 2015). Todos eles demonstram

capacidade de proteger as maçãs contra fungos azuis e também prevenir o acúmulo de patulina (Castoria et al., 2005; Cao et al., 2013; Spadaro et al., 2013; Hawar et al., 2013; Dong et al., 2015).

Uma outra forma de controle já descrita na literatura é a utilização de bactérias capazes de absorver a patulina através de componentes da parede celular, exemplos desta atividade foram relatadas em bactérias lácticas (Wang et al., 2015) e *Alicyclobacillus sp* (Yuan et al., 2014), sendo sugeridos pelos autores a adição de alíquotas inativadas pelo calor e liofilizadas destas bactérias, ao suco de maçã, na intenção de remover a patulina (Wang et al., 2015).

De acordo com Zhong et al. (2018), em estudo de revisão, dentre todas as estratégias desenvolvidas para reduzir o mofo azul e reduzir a patulina em produtos de maçã, os microrganismos antagonistas mostraram vantagens superiores e, portanto, foram reconhecidos como promissores agentes de controle biológico na indústria de frutas. No entanto, seu uso seguro está sob estudo devido ao (os) mecanismo (s) de degradação inespecífico (s), bem como a avaliação toxicológica incompleta de subprodutos de degradação ou derivados, necessitando de mais estudos nesta área (Zhong et al., 2018).

vi. Regulamentação e Limites de Patulina em Alimentos

Após a crise veterinária da Inglaterra na década 60, estudos sobre os efeitos das micotoxinas em plantas e animais ampliaram-se, levando à necessidade de se estabelecer normas de controle para as quantidades presentes em alimentos, tendo em vista seu potencial patogênico (Sakata et al., 2011). Muitas agências governamentais internacionais de saúde pública como a *US Food and Drug Administration* (FDA), *World Health Organization* (WHO), FAO, e a *European Food Safety Authority* (EFSA) determinaram os limites toleráveis de ingestão para micotoxinas em alimentos (Alshannaq e Yu, 2017). Para a patulina, a quantidade da micotoxina em produtos de maçã foi considerada como uma medida de qualidade em relação às normas práticas de segurança alimentar em todo o mundo (Zhong et al., 2018).

No ano de 1995, peritos em aditivos alimentares da FAO e da WHO, estabeleceram uma dose diária máxima de patulina fixada em 0,4 µg/kg de peso corporal (WHO, 1995). A partir de então, o nível máximo de patulina foi restrito a não mais que 50 µg/kg em suco de maçã e cidra de maçã pela FDA dos Estados Unidos (FDA, 2000) e Comissão Europeia (EC, 2006). No Brasil, somente em 22 de fevereiro de 2011, através da ANVISA criou-se a primeira Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) sobre os limites de micotoxinas tolerados para comercialização de alimentos através da RDC n. 07/2011, adotando os mesmos valores para patulina do que os órgãos norte americanos e europeus (ANVISA, 2011).

No caso de produtos alimentícios a base de maçã, destinada a crianças jovens e bebês, os limites toleráveis de patulina ficam ainda mais rígidos, aceitando no máximo valores de 10 µg/kg conforme estipulado pela Comissão Europeia (EC, 2006). Os valores detalhados aceitáveis de patulina em alimentos, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Limite máximo tolerável de patulina nos Estados Unidos (EUA), Europa (EU) e Brasil (BR)

Países	Alimentos	Limite Máximo
EUA	“(…) suco de maçã, suco de maçã concentrado e produtos a base de suco de maçã (...)” (FDA, 2000, p. 10)	50 µg/kg (FDA, 2000)
Europa	“Sucos de fruta, sucos de fruta concentrados e néctares de fruta” (EC, 2006, p. 16)	50 µg/kg (EC, 2006)
	“(…) cidra e outras bebidas fermentadas derivadas de maçãs ou que contenham suco de maçã” (EC, 2006, p. 17)	50 µg/kg (EC, 2006)
	“Produtos sólidos de maçã, incluindo a compota e puré (exceto os produtos destinados a crianças)” (EC, 2006, p. 17)	25 µg/kg (EC, 2006)
	“Suco de maçã e produtos sólidos de maçã, incluindo compota e puré, destinados a lactentes e crianças jovens (rotulados e vendidos como tal)” (EC, 2006, p. 17)	10 µg/kg (EC, 2006)
	“Alimentos a base de maçã destinados para bebês” (EC, 2006, p. 17)	10 µg/kg (EC, 2006)
Brasil	“Suco e polpa de maçã” (ANVISA, 2011, p. 5)	50 µg/kg (ANVISA, 2011)

De acordo com Al Wright (2015), os níveis de patulina nos alimentos amostrados na União Europeia (EU) estão, na sua maioria, abaixo dos limites estabelecidos pelos órgãos regulamentadores, ao passo que este não é o caso em diversos outros países. Neste sentido, destaca-se a importância de introduzir e implementar mundialmente medidas regulatórias e maior vigilância dos alimentos (Al Wright, 2015). No Brasil, existem poucos estudos que investigaram a ocorrência de patulina em sucos de maçã (Tabela 3), sendo ainda a maioria destes, de longa data. Pesquisar alimentos preparados à base de maçã comercializados à população, vem de encontro com esta vigilância esperada para avaliar a qualidade dos produtos fornecidos ao consumidor e consequentemente a ingestão de micotoxinas.

Tabela 3: Pesquisas realizadas no Brasil sobre patulina em sucos de maçã e outras frutas

Conteúdo das Amostras	Número de Amostras	% de amostras contaminadas	Referência
Sucos de maçã, uva, abacaxi, mamão, goiaba, banana e manga e frutas <i>in natura</i> (maçã, mamão, pera, pêssigo e manga)	111 (sucos) 38 (frutas)	0,9	Sylos e Rodriguez-Amaya, 1999
Suco de maçã	13	7,7	Prado et al., 2000
Suco de maçã, néctar de maçã e bebida a base de soja contendo suco de maçã	134	3	Ilha e Sabino, 2008
Suco de maçã	16	100	Welke et al., 2009 b
Suco de maçã, suco de soja com maçã e puré de maçã	37	8,1	Sargenti e Almeida, 2010
Suco de maçãs colhidas em árvores e maçãs caídas ao solo (não comercializados)	80 (frutas)	0	Amparo et al., 2015

Trazendo um olhar mais global para ocorrência da micotoxina em diversos países, a contaminação por patulina de produtos feitos a base de maçã, como outras frutas, apresentaram percentuais de contaminação bastante preocupantes (Tabela 4). Por esta razão, mantem-se pertinentes trabalhos que investiguem patulina em produtos

comercializados para a população (Vidal et al., 2019). Ademais, segundo Vidal et al. (2019), durante as últimas décadas, os consumidores tornaram-se mais conscientes sobre a saúde e a qualidade dos alimentos, conseqüentemente, as pesquisas sobre segurança alimentar aumentaram. A avaliação da contaminação por patulina em frutas e legumes tornou-se um fator importante para garantir a qualidade dos produtos (Vidal et al., 2019).

Alguns autores trazem dados alarmantes sobre a contaminação por patulina ao redor do mundo, constatando a presença da toxina em 100% das amostras pesquisadas (Yuan et al., 2010; Hammami et al., 2017; İçli, 2019). Além da contaminação maciça como os trabalhos recém citados, outros estudos assustam trazendo valores máximos de patulina altíssimos em suas amostras como 921 µg/kg (Iqbal et al., 2018), 889 µg/kg (Zouaoui et al., 2015), 1416 µg/kg (İçli, 2019), 1650 µg/L (Shephard et al., 2010), causando preocupação sobre a segurança dos produtos ofertados para o consumo da população. Conforme mostra a tabela 4, todos os trabalhos encontrados na literatura, realizados nos últimos 10 anos demonstram produtos contaminados com patulina, mesmo que em doses abaixo da legislação (Tabela 5).

Tabela 4: Ocorrência de patulina no mundo, nos últimos 10 anos

País	Conteúdo das amostras	Número de amostras	% de amostras contaminadas	Referência
África do Sul	Sucos de maçã	30	33,4	Shephard et al., 2010
Arábia Saudita	Sucos de maçã	17	5,9	Al-Hazmi, 2010
Argentina	Produtos sólidos de maçã e pera (marmelada, geleia, doce em pedaços e puré)	56	22,5	Funes e Resnik, 2009
Argentina	Suco de maçã, laranja, pera, damasco, uva, abacaxi, tangerina, limão e vinho	5958	33,5	Oteiza et al., 2017
China	Produtos a base de maçã (suco puro e misto, comida para bebês)	95	100	Yuan et al., 2010

Quantificação de Patulina em Sucos de Maçã Disponíveis no Mercado Sul Brasileiro

China	Suco de maçã concentrado	1987	97,7	Guo et al., 2013
Irão	Sucos de frutas (maçã, abacaxi, pera, pêssigo, romã, uva verde e vermelha)	161	16,1	Rahimi e Jeiran, 2015
Paquistão	Várias frutas, sucos e <i>smoothies</i>	237	57,4	Iqbal et al., 2018
Portugal	Suco de maçã, puré de maçã	144	23	Barreira et al., 2010
Portugal	Suco de maçã	9	55,6	Cunha et al., 2014
	Puré, geleia e suco de tomate	28	35,7	
Qatar	Maçã (fruta), suco de maçã, compota e suco de maçã para bebês	45	100	Hammami et al., 2017
Romênia	Sucos a base de maçã	50	82	Oroian et al., 2014
Sérvia	Suco de maçã e suco multi frutas	142	51,4	Torović et al., 2018
Tailândia	Suco de maçã, damasco, pêssigo, abacaxi e uva	200	22	Poapolathep et al., 2017
Tunísia	Suco de maçã, pera com maçã, suco misto, geleia de maçã e pera	214	50	Zouaoui, et al., 2015
Turquia	<i>Apple Sour</i> (produto tradicional de Kastamonu, Turquia)	39	100	İçli, 2019

Embora o percentual de amostras contaminadas e os valores máximos de patulina descritos em alguns trabalhos assustem, em relação aos controles frente a legislação a preocupação parece ser um pouco menor. Nos estudos localizados na literatura, somente no Paquistão (Iqbal et al., 2018) e na Turquia (İçli, 2019) os valores da micotoxina encontrados excederam a legislação acima de 30% do total das amostras analisadas. Para este último, o valor foi muito preocupante, indicando necessidade urgente de intervenção de controle de qualidade e segurança dos produtos estudados.

Tabela 5: Percentual de amostras que excederam a legislação para presença de patulina em estudos nos últimos 10 anos

País	% de amostras em que foram detetados valores acima dos permitidos pela legislação (50 µg/kg)	Referência
África do Sul	10	Shephard et al., 2010
Arábia Saudita	ND	Al-Hazmi, 2010
Argentina	ND	Funes e Resnik, 2009
Argentina	8,5	Oteiza et al., 2017
Brasil	8,1	Sargenti e Almeida, 2010
China	16	Yuan et al., 2010
China	0,2	Guo et al., 2013
Irão	2,5	Rahimi e Jeiran, 2015
Paquistão	33,8	Iqbal et al., 2018
Portugal	0	Barreira et al., 2010
Portugal	0	Cunha et al., 2014
Qatar	11	Hammami et al., 2017
Romênia	6	Oroian et al., 2014
Sérvia	0,7	Torović et al., 2018
Tailândia	0	Poapolathep et al., 2017
Tunísia	22	Zouaoui et al., 2015
Turquia	94,9	İçli, 2019

ND: Não determinado

Mesmo que os trabalhos tenham apresentado, na maioria deles, valores inferiores a legislação de 50 µg/kg, vale salientar que esta recomendação é indicada para pessoas adultas, e ocorre que muitas vezes o mesmo suco, puré ou geleia comprado para a família é consumido também pelas crianças, as quais tem um limite tolerável muito menor (10 µg/) segundo alguns órgãos regulamentadores (EC, 2006). Analisando por esta ótica, se as percentagens de valores acima da legislação levassem em conta a quantidade aceita para as crianças, este dado poderia se apresentar de forma bastante diferente. Ademais, analisando os produtos pelo percentual de contaminação demonstra-se que em muitos países a população está cronicamente exposta a pequenas doses de patulina, e sobre este fato, ainda não há clareza dos desfechos (Saleh e Goktepe, 2019).

Como já se sabe, a maçã e os produtos feitos a partir dela são os mais contaminados pela patulina. Em uma pesquisa feita no Irão, mais uma vez se confirmou esta premissa

uma vez que os autores investigaram a presença de patulina em sucos feitos com diversas frutas, sendo o de maçã o que apresentou os valores mais elevados da micotoxina, chegando a 190 µg/L em algumas amostras comparativamente aos valores máximos encontrados nos sucos de abacaxi (0 µg/L), suco de pera (31,1 µg/L), suco de pêsego (35,2 µg/L), suco de romã (8,2 µg/L), suco de uva branca (16,6 µg/L) e uva vermelha (0 µg/L) (Rahimi e Jeiran, 2015). Resultados semelhantes relacionados aos produtos de maçã foram encontrados na Argentina, onde pesquisadores procuraram patulina em produtos sólidos e semi-sólidos (maçã e pera). Os resultados mostraram que 22,5% dos 51 produtos estavam contaminados sendo os maiores níveis encontrados em puré de maçã com 50% de amostras contaminadas (média de 123 µg/kg nas amostras positivas), trazendo novamente a maçã para o foco da contaminação (Funes e Resnik, 2009).

vii. Métodos para a Detecção e Quantificação de Patulina

Vários métodos têm sido desenvolvidos nas últimas décadas para determinar patulina em produtos de maçã, a maioria dos quais são métodos clássicos baseados em cromatografia (Biomedicina Brasil, 2012). Do ponto de vista conceitual, cromatografia se trata da separação de misturas por interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma fase móvel (líquida ou gás) (Biomedicina Brasil, 2012). Além da separação, a cromatografia pode ser acoplada a diferentes técnicas de detecção, sendo capaz de identificar e quantificar moléculas químicas (Biomedicina Brasil, 2012). Entre os métodos cromatográficos mais utilizados para detetar patulina, encontramos a cromatografia de camada fina (TLC - *Thin Layer Chromatography*) ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) com detecção ultravioleta (UV) (Sewram et al., 2000; Moake et al., 2005; Cunha et al., 2014).

A TLC foi um dos primeiros métodos utilizados para detetar a patulina. Esta técnica analítica embora seja rápida e de baixo custo, nos dias atuais sabe-se que se trata de uma técnica rudimentar onde sua capacidade de recuperação é baixa, sua sensibilidade é

inadequada podendo acusar falsos positivos para patulina além da separação da matriz ser frequentemente problemática (Li et al., 2017).

O método oficial adotado pela *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC), uma organização internacional, é baseado na extração líquido-líquido e cromatografia líquida de alta performance acoplada à detecção ultravioleta (HPLC-UV - *High Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Absorption Detector*) (Shao et al., 2012). Porém, existem várias limitações na utilização deste método analítico, incluindo: (a) presença de agentes químicos que são co-extraídos e que interferem na determinação da patulina; (b) baixa seletividade do detector de UV; (c) alto consumo de solvente; (d) necessidade de quantidades relativamente altas de materiais (Shao et al., 2012).

Estas interferências e dificuldades fazem com que métodos como HPLC e TLC não sejam apropriados para análise de patulina em matrizes de alimentos complexos, não sendo capazes de detetar com segurança valores abaixo de microgramas (Cunha et al., 2009).

Entre as metodologias mais seletivas e sensíveis destacam-se a espectrometria de massa (MS - *Mass Spectrometry*) como técnica de detecção, interligada a uma etapa cromatográfica por cromatografia líquida (LC - *Liquid Chromatography*) ou por cromatografia gasosa (GC - *Gas Chromatography*) (Cunha et al., 2009). Quando é utilizada a GC, fazer a derivatização do analito estudado é uma etapa que permite diminuir a polaridade e convertê-lo em um composto volátil (Cunha et al., 2009). A GC-MS (*Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) é relativamente mais acessível que a LC-MS (*Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*), embora esta última não necessite passar pela etapa de derivatização (Cunha et al., 2009; Kharandi et al., 2013). Para confirmação do analito, além da MS, outras técnicas também podem ser utilizadas como por exemplo, técnicas de ionização eletro spray (EI - *Electrospray Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) ou fotoionização por pressão atmosférica (APPI - *Atmospheric Pressure Photoionization*) (Cunha et al., 2009).

Outros métodos para a detecção de patulina têm surgido com o intuito de modernizar e tornar a detecção cada vez mais sensível. Temos como exemplo um método de infravermelho, (NIR - *Near-infrared*) onde esta metodologia baseia-se no aumento da emissão de polarização de fluorescência de um derivado de patulina marcado com fluorescência a anticorpos específicos (Pennacchio et al., 2015). Esta técnica demonstrou ser capaz de detectar quantidades de patulina tão baixas quanto 0,06 µg/L em suco de maçã diluído sem precisar de qualquer pré tratamento para as amostras (Pennacchio et al., 2015).

Com relação aos métodos utilizados nos estudos disponíveis, importa observar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura utilizaram o método analítico HPLC-UV (Tabela 6).

Tabela 6: Método analítico, LOQ e LOD utilizados para ocorrência de patulina em trabalhos no Brasil (todos) e no mundo (últimos 10 anos)

País	Autores	Método Analítico	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)
África do Sul	Shephard et al., 2010	HPLC-UV	10	ND
Arábia Saudita	Al-Hazmi, 2010	HPLC-UV	ND	ND
Argentina	Funes e Resnik, 2009	HPLC-UV	4,7	2,8 (geleia de maçã)
			2,9	1,7 (marmelada de pera)
			6,3	3,8 (puré de maçã)
Argentina	Oteiza et al., 2017	HPLC-UV	10	3
Brasil	Sylos e Rodriguez-Amaya, 1999	HPLC-UV	ND	5
Brasil	Prado et al., 2000	HPLC-UV	ND	<5
Brasil	Ilha e Sabino, 2008	HPLC-UV	7	3
Brasil	Welke et al., 2009 b	TLC-UV	14	-
Brasil	Sargenti e Almeida, 2010	HPLC-UV	0,7	0,2
Brasil	Amparo et al., 2015	HPLC	ND	10
China	Yuan et al., 2010	HPLC-UV	1,8	1,2
China	Guo et al., 2013	HPLC-UV	2,72	0,82
Irão	Rahimi e Jeiran, 2015	HPLC-UV	5	11
Paquistão	Iqbal et al., 2018	HPLC-UV	0,12	0,04
Portugal	Barreira et al., 2010	HPLC-UV	6,9	2
Portugal	Cunha et al., 2014	GC-MS	ND	0,4

Qatar	Hammami et al., 2017	HPLC-MS	5	1
Romênia	Oroian et al., 2014	HPLC-UV	2,2	0,7
Sérvia	Torović et al., 2018	HPLC-UV	1	0,4
Tailândia	Poapolathep et al., 2017	HPLC-MS	1,5	0,5 (maçã, abacaxi, uva)
			2	0,6 (damasco e pêssego)
Tunísia	Zouaoui et al., 2015	HPLC-UV	50	10
Turquia	İçli, 2019	HPLC-UV	0,012	0,004

ND: Não determinado

3. Produção de Maçã e Suco de Maçã no Brasil

Os estados brasileiros de Santa Catarina e Rio Grande do sul são os maiores produtores de maçã do país, retendo 52,6% e 44,8% respectivamente, da produção da fruta. Nos últimos 5 anos o tipo de maçã mais produzido foi do tipo Gala (56%) seguido do grupo Fuji (39%) e 6% de outras qualidades (ABPM, 2019). O mercado da maçã no sul do Brasil tem proporções grandes uma vez que ocupa cerca de 33 mil hectares e emprega em média 148 mil pessoas (ABPM, 2019).

Cerca de 20 a 25% da safra brasileira de maçã é destinada à produção de sucos e, do volume total produzido, a participação do mercado interno vem aumentando, em paralelo à tendência de maior consumo de alimentos saudáveis (ABPM, 2019). Esta foi uma das maiores razões de interesse pelo suco da fruta, uma vez que com a mudança na legislação, que exigiu maior presença de produtos naturais do que artificiais nas bebidas, o líquido extraído da maçã ganhou espaço por ser mais neutro e acessível. Este aumento interno no consumo de suco representa um crescimento de 5% para 15% do produto disponível para população (ABPM, 2019).

A produção de maçãs brasileiras é direcionada na maior parte ao exterior, e a granel, no total, são 66 o número de países que compraram o produto, sendo os cinco principais países a importarem a fruta em 2019, a Índia, Rússia, Irlanda, Portugal e Reino Unido (ABPM, 2019). Os percentuais de exportação para o suco de maçã foram ampliados em comparação aos dados do ano de 2018, ocorrendo crescimento na ordem de 57% no volume total embarcado. O produto foi destinado a 49 países, destacando-se como

principais compradores os Estados Unidos (com quase 63% do total), além de Japão e Alemanha e África do Sul (ABPM, 2019).

A figura 3 ilustra o processo mais comumente utilizado no Brasil a partir da colheita da maçã até sua disposição na forma *in natura* ou como suco industrializado disponível ao consumidor.

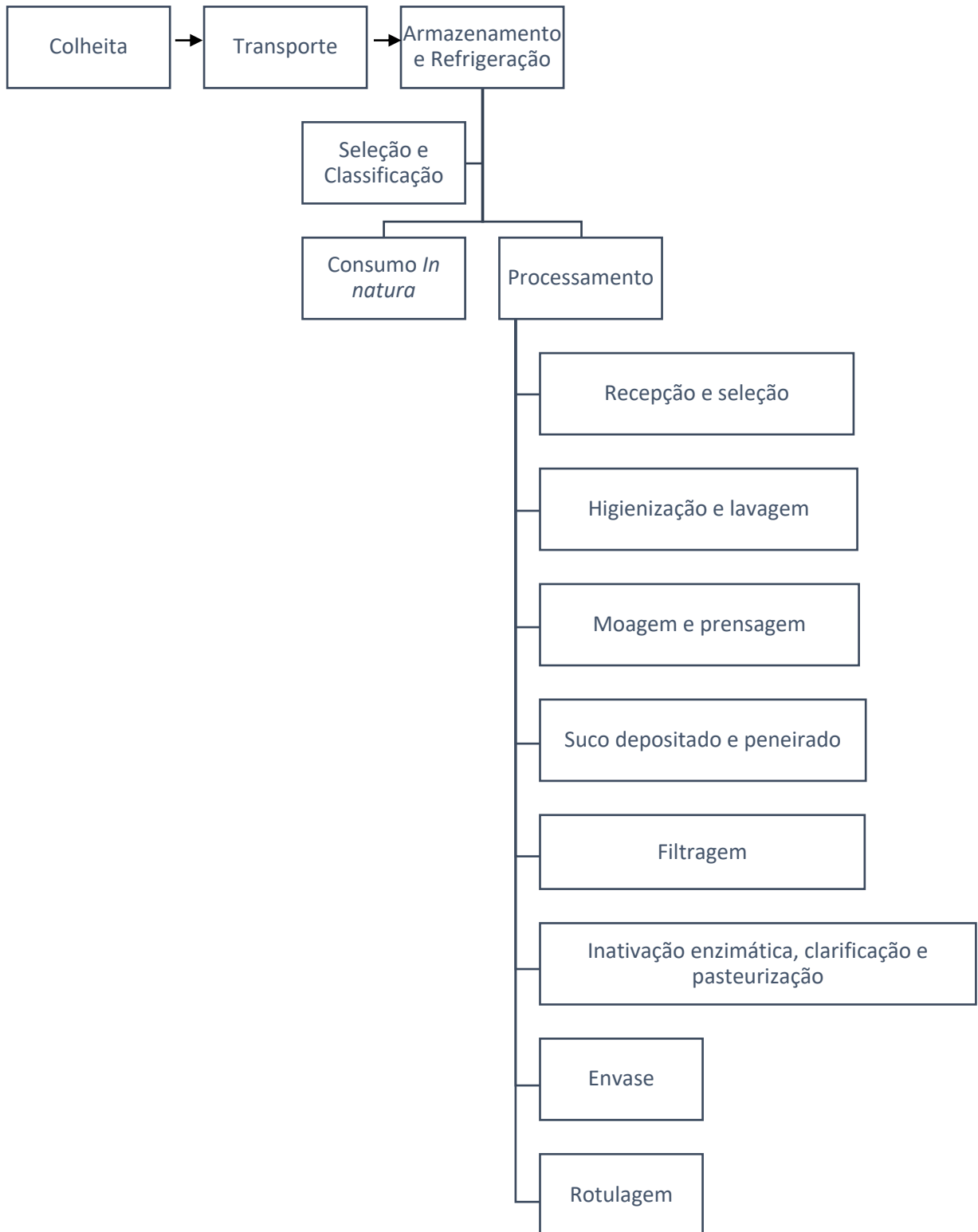


Figura 3: Fluxograma da maçã, da colheita ao comércio. Fonte: Adaptada de Lazzarotto et al., 2016.

III. ENQUADRAMENTO METODOLÓGICO

1. Objetivos do estudo

i. Objetivo Geral

Rastrear a ocorrência e quantificar a micotoxina patulina em sucos de maçã produzidos no Brasil e comercializados no mercado sul brasileiro.



Figura 4: Estados brasileiros onde as amostras foram recolhidas. Fonte: Espaço Educar, 2008.

2. Local de Desenvolvimento

O estudo foi realizado utilizando a infraestrutura da Universidade de Passo Fundo (UPF), localizado na cidade de Passo Fundo (RS), Brasil, dentro do Curso de Farmácia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), no Parque Científico e Tecnológico UPF

Planalto Médio (Módulo II) e nas instalações do Laboratório de Cromatografia, vinculado ao Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA).

3. Método Analítico

i. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massa

A técnica escolhida para realização desta pesquisa foi a Cromatografia em fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS). A GC é caracterizada como uma das mais importantes técnicas atuais para a separação e quantificação de compostos com características físico-químicas muito semelhantes em matrizes complexas (Cunha et al., 2009). Entre estas matrizes complexas, podemos citar o suco de maçã, o qual é uma mistura heterogênea, contendo açúcar, sorbitol, ácido orgânico, aminoácido, compostos fenólicos e elementos minerais, dos quais frutose, sacarose e glicose compreendem cerca de 85% do produto (Markowski et al., 2015).

Recorrendo à GC, podemos separar compostos orgânicos presentes no suco de maçã através da interação diferencial dos seus componentes com uma fase estacionária (sólida) e uma fase móvel (gás) (McNair e Miller, 1997). Para que esta separação ocorra, o analito estudado dentro da amostra deve tornar-se previamente volátil para então dissolver-se no gás e ser arrastado por ele através da coluna. A partir daí os componentes são separados com base na pressão de vapor relativa e afinidade pela fase estacionária (McNair e Miller, 1997). Entre as vantagens da técnica podemos destacar a sua excelente resolução (eficiência), alta capacidade de separação e fácil automação. Entre as desvantagens encontram-se a necessidade de uma rigorosa preparação das amostras e a impossibilidade de análise de substâncias não volatilizáveis e termodinamicamente instáveis (McNair e Miller, 1997).

Acoplado à GC temos o Espectrômetro de Massa ou Detector de Massa (MS), aparelho que tem como principal função confirmar a identificação do analito estudado. O MS funciona a partir da ionização de determinado analito (ião precursor), obtendo-se

fragmentos de massa a partir deste íon, sendo estes posteriormente separados de acordo com a relação massa/carga, proporcionalmente à sua abundância, produzindo, assim, um espectro de massa único e completo para cada molécula (Hoffmann e Stroobant, 2007).

Na análise por MS, os fragmentos de massa gerados são indicativos da estrutura molecular de cada substância, constituindo a chamada impressão digital, que é capaz de diferenciá-la de outras moléculas com estrutura semelhante (Oliveira et al., 2015). O detector é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico o qual mede de forma contínua as propriedades físicas ou químicas da amostra, enviando um sinal para o registro que é diretamente proporcional à concentração do componente na amostra (Oliveira et al., 2015).

Segundo Oliveira et al. (2015), a GC-MS é a técnica analítica mais utilizada em análise toxicológica confirmatória. Ainda de acordo com os mesmos autores, é possível analisar uma grande variedade de compostos como as amostras voláteis, semivoláteis ou volatizáveis, de baixa polaridade, peso molecular de até 500 Da e termicamente estáveis. Além disso, esta técnica apresenta baixo limite de detecção, elevado poder discriminatório e ampla distribuição dos equipamentos em laboratórios do mundo todo (Oliveira et al., 2015).

Através da figura 5 podemos compreender melhor os aparatos que constituem um aparelho GC-MS:

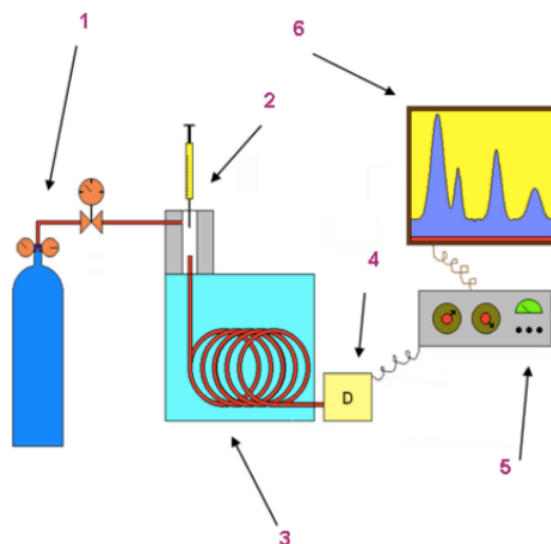


Figura 5: Ilustração de um aparelho de cromatografia gasosa. Fonte: Adaptado de Biomedicina Brasil, 2012.

Conforme ilustrado na figura acima, temos os seguintes elementos essenciais em uma máquina de cromatografia gasosa:

1. Reservatório de gás e controles de vazão/pressão;
2. Injetor de amostra gasosa;
3. Coluna cromatográfica e forno da coluna;
4. Detector de massa;
5. Tratamento (amplificação) de sinal;
6. Registro de sinal (registrador ou computador);

Exemplificando o funcionamento do aparelho, a amostra líquida (solvente) é introduzida no injetor aquecido (através de uma micro-seringa), onde é vaporizada e transferida com o auxílio do gás de arraste (gás hélio, nitrogênio, hidrogênio ou argônio) para a coluna cromatográfica localizada dentro de um forno pré-aquecido (Penteado et al., 2008). Os componentes presentes na amostra são eluídos e conduzidos para o detector conectado na saída da coluna. O detector emite um sinal elétrico que é registrado graficamente sob a forma de picos (cromatograma). Os compostos são separados e saem da coluna em tempos diferentes (Penteado et al., 2008).

O emprego de métodos GC-MS para a determinação de patulina em matrizes complexas de forma direta, é bastante problemático. Em geral, acabam ficando algumas substâncias residuais da matriz as quais possuem um tempo de retenção similar ao da patulina, podendo confundir os resultados. Além disso, devido a este alto ruído químico, a obtenção de um baixo limite de detecção (LOD – *Limit of detection*) é quase impossível (Sforza et al., 2006). Por isso, é necessário derivatizar as amostras.

Derivatizar é transformar a estrutura química de uma substância em outra estrutura semelhante (um derivado), por meio de uma reação química resultando em um analito menos polar, mais volátil, produzindo iões mais específicos (m/z mais alto) (Cunha et al., 2009; Zarate et al., 2017). A conversão dos metabólitos polares/semi-polares em suas contrapartes voláteis oferece boas propriedades cromatográficas, facilitando a análise por GC-MS, resultando numa detecção mais confiável da patulina (Cunha et al., 2009, Zarate et al., 2017).

4. Material e Métodos

i. Reagentes

Na tabela 7, destacamos todos os reagentes com grau analítico utilizados neste estudo.

Tabela 7: Descrição dos reagentes com respectivas procedências

Reagentes	Procedência
Patulina	<i>Sigma Aldrich, USA</i>
N, O-bis-trimethylsilyl trifluoroacetamide (BSTFA) com 1% de cloreto de trimetilsililo (TMCS)	<i>Sigma Aldrich, USA</i>
Acetonitrila	<i>Sigma Aldrich, USA</i>
Acetato de etilo	<i>Proc 9, Brasil</i>
n-hexano	<i>Proc 9, Brasil</i>
Ácido acético glacial	<i>Proc 9, Brasil</i>

ii. Amostras

Foram avaliadas 15 amostras de suco e néctar de maçã (Tabela 8). A amostragem foi feita de forma a contemplar a totalidade de marcas disponíveis nos maiores supermercados localizados nos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), ambos no extremo sul do Brasil (Figura 4). O período de amostragem foi realizado entre os dias 7/03/2019 e 12/03/2019. A composição dos sucos de maçã que apresentavam composição mista, com mais de uma fruta no produto não foram analisados. Em alguns sucos o critério não se aplicou à exclusão de presença de soja.

Tabela 8: Descrição das amostras

Amostra	Indústria	Data de validade	Presença de ácido ascórbico/ácido cítrico na composição
Amostra 1	Brasileira	Setembro/19	Sim/Não
Amostra 2	Brasileira	Outubro/19	Sim/Sim
Amostra 3	Brasileira	Novembro/19	Não/Não
Amostra 4	Brasileira	Janeiro/21	Não/Não
Amostra 5	Brasileira	Fevereiro/20	Não/Sim
Amostra 6	Brasileira	Julho/19	Sim/Não
Amostra 7	Brasileira	Julho/20	Sim/Não
Amostra 8	Brasileira	Novembro/19	Não/Sim
Amostra 9	Brasileira	Julho/19	Sim/Sim
Amostra 10	Brasileira	Dezembro/19	Sim/Sim
Amostra 11	Brasileira	Dezembro/19	Sim/Sim
Amostra 12	Brasileira	Setembro/19	Sim/Sim
Amostra 13	Brasileira	Março/20	Não/Não
Amostra 14	Brasileira	V: -	Sim/Não
Amostra 15	Brasileira	Agosto/19	Sim/Não

Entre os ingredientes descritos nas amostras, a maioria dos sucos apresentou suco de maçã integral ou concentrado como o elemento mais abundante da composição além de água, vitamina C ou ácido cítrico (como antioxidante). Alguns sucos possuíam um composto mais heterogêneo, contendo além dos ingredientes já citados, fibra alimentar açúcar ou edulcorantes, maltodextrina, corante natural caramelo, aroma artificial de

maçã, goma xantana, vitaminas (C, B3, B2, B6 e B12) e minerais (ferro e zinco) e uma amostra também apresentou grão de soja entre os componentes.

iii. Extração da Patulina

A quantificação da patulina foi feita através de uma metodologia adaptada de Cunha et al. (2009) e Kharandi et al. (2013). Antes da injeção das amostras, foi realizada uma curva de calibração utilizando padrões de patulina (pureza superior a 98%) com concentrações entre 60 e 4000 ng/mL.

A extração da patulina foi realizada a partir de 5 mL de cada suco de maçã utilizando 5 mL de uma solução extratora contendo acetato de etila:n-hexano (95:5, v/v). Após agitação vigorosa em vortex por 1 min, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm (Centrífuga CentriBio). O sobrenadante da solução foi utilizado para repetir a etapa de extração por mais duas vezes. A seguir, foi adicionado 150 µL de ácido acético ao sobrenadante final e as amostras foram evaporadas sob corrente de gás nitrogénio (Te-0195, Concentrador Tecvap, Tecnal) durante 30 minutos a uma temperatura média de 55 °C.

iv. Derivatização

Após a extração da patulina, procedeu-se a etapa de derivatização da amostra. Para isso, adicionou-se ao resíduo previamente obtido por evaporação, 300 µL de acetonitrila e 50 µL de BSTFA contendo 1% de TMCS. As amostras foram aquecidas em banho maria a 75 °C durante 30 minutos (Cunha et al., 2009).

v. Detecção e Quantificação da Patulina por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectro de Massa

As amostras derivatizadas foram injetadas num cromatógrafo GC-MS TQ 8030 acoplado a um amostrador automático AOC-20i - analisador de massas tipo triplo

quadruplo (Shimadzu, Japão). O volume de injeção foi de 2,0 μL .



Figura 6: Aparelho de GC-MS utilizado no estudo. Fonte: Da autora

A separação por GC foi conduzida através de uma coluna Elite-5MS (30 m x 0.25 x 0.25, Restek, USA) com um fluxo de 0,92 mL min^{-1} . O gás de arraste foi composto por hélio a uma velocidade linear de 35.7 cm sec^{-1} , fluxo total de 50 mL min^{-1} . A injeção foi feita em um modo de razão de divisão de 50 com uma pressão de 66 kPa e a temperatura do injetor foi de 250 $^{\circ}\text{C}$. O programa de temperatura do forno foi inicialmente de 100 $^{\circ}\text{C}$, aumentando para 220 $^{\circ}\text{C}$ com incremento de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 12 minutos.

A monitorização iónica foi feita no modo SIM (*single ion monitoring*), sendo a quantificação realizada com os seguintes iões: m/z: 226 (quantificador), 211, 198, 183 e 136.

IV. RESULTADOS

Para realizar as análises, o equipamento foi previamente calibrado com sete padrões de patulina na faixa de 60, 125, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 ng/mL. O coeficiente de correlação ($R^2=0,9905$), feito em triplicata, demonstrou a alta linearidade e sensibilidade do método (Figura 7). O limite de quantificação (LOQ- *Limit of quantification*) e o limite de detecção (LOD- *Limit of detection*) foram 60 ng/mL (60 $\mu\text{g/L}$) e 12 ng/mL (12 $\mu\text{g/L}$) respectivamente.

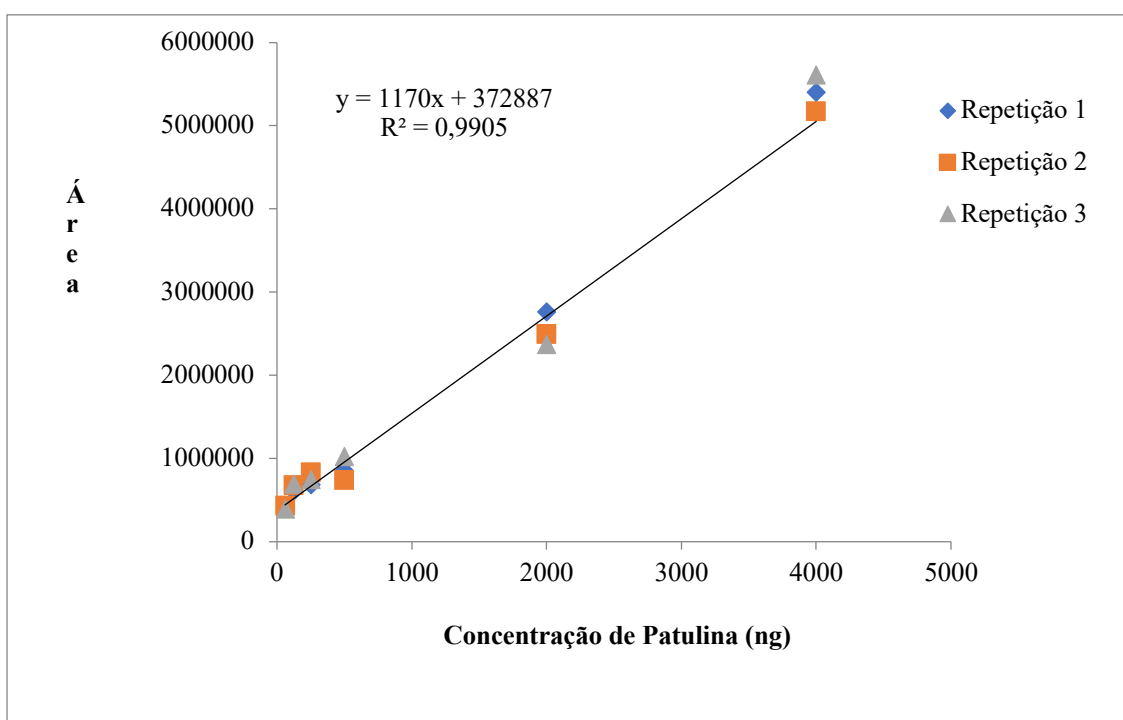


Figura 7: Curva padrão de Patulina (60 a 4000 ng/mL), realizada em triplicata, demonstrando a linearidade e sensibilidade da metodologia.

Nas figuras 8 e 9 é possível visualizar o pico cromatográfico e o cromatograma e espectro de massas da patulina, com um tempo de retenção de 10 min e 20 segundos e iões m/z que confirmam inequivocamente a identidade da patulina.

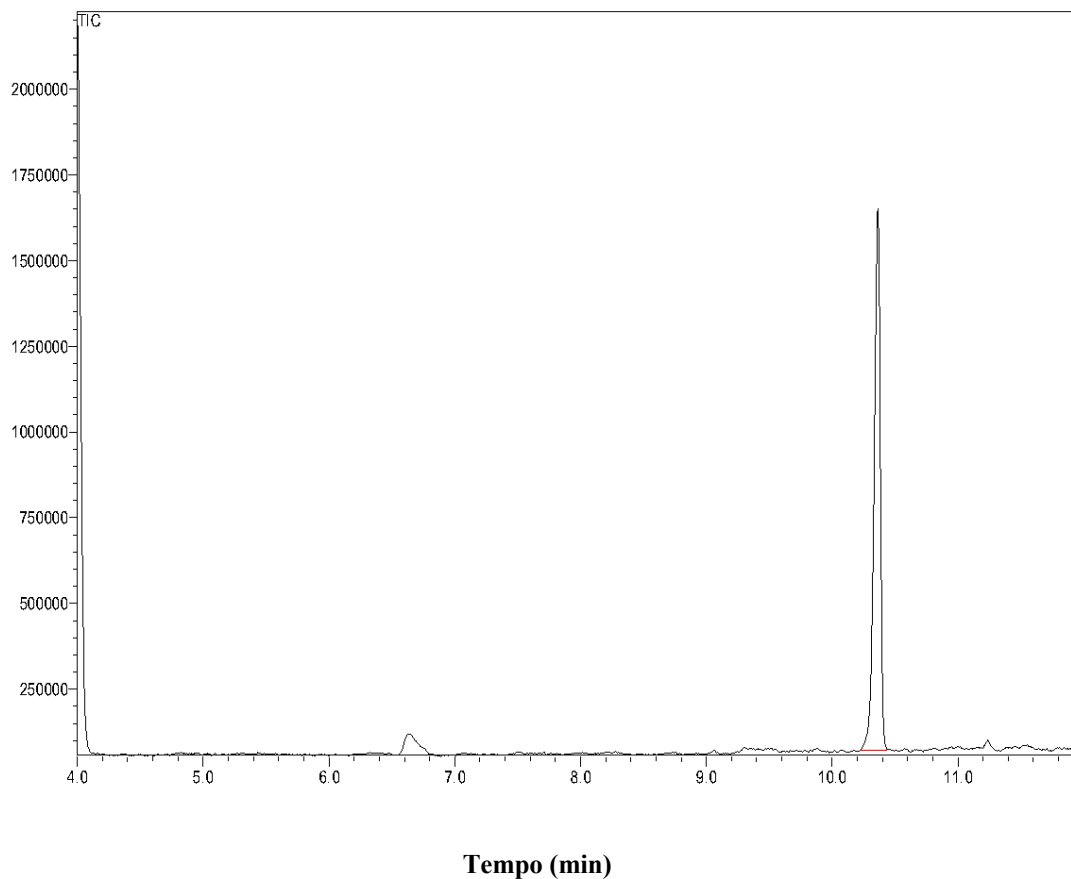


Figura 8: Pico cromatográfico da patulina.

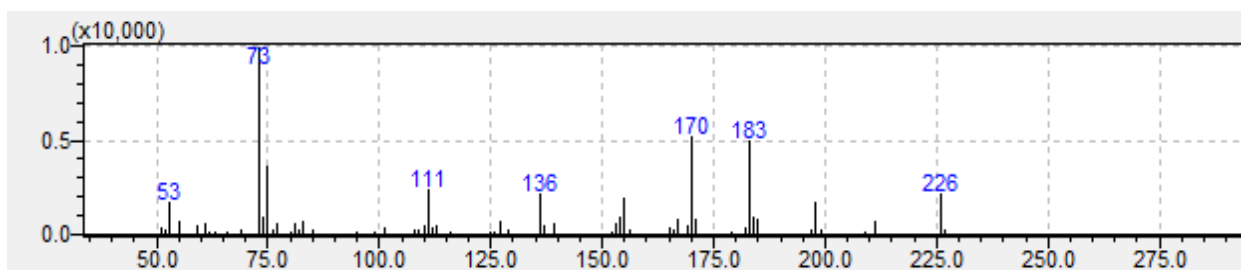


Figura 9: Cromatograma e espectro de massas da patulina.

Como já referido previamente, o LOQ apresentado por este método foi de 60 $\mu\text{g/L}$, e o LOD ainda poderia detetar a patulina com valores de até 12 $\mu\text{g/L}$, demonstrando a alta sensibilidade da técnica. Mesmo com um limite de detecção tão baixo, ao analisar as amostras, não foi evidenciado a presença de patulina em nenhuma das 15 amostras (Tabela 9).

Tabela 9: Quantidade de patulina encontrada nas amostras

Amostras comerciais	Nível de patulina ($\mu\text{g/L}$)
Amostra 1	n.d.
Amostra 2	n.d.
Amostra 3	n.d.
Amostra 4	n.d.
Amostra 5	n.d.
Amostra 6	n.d.
Amostra 7	n.d.
Amostra 8	n.d.
Amostra 9	n.d.
Amostra 10	n.d.
Amostra 11	n.d.
Amostra 12	n.d.
Amostra 13	n.d.
Amostra 14	n.d.
Amostra 15	n.d.

n.d.: não detectado.

V. DISCUSSÃO

A discussão dos resultados pretende dar resposta ao objetivo delineado para este estudo, comparando com resultados de trabalhos semelhantes elaborados em todo o mundo. De acordo com a revisão da literatura e atendendo aos resultados obtidos, foi possível contextualizar o tema desta pesquisa, intersectando os resultados adquiridos nesta investigação com a informação existente acerca desta temática.

O grande contributo deste trabalho foi fazer uma avaliação em larga escala da presença da micotoxina patulina em sucos de maçã produzidos pela indústria brasileira e comercializados nos dois estados mais ao sul do país, utilizando um método altamente sensível conhecido como GC-MS (LOQ e LOD de 60 µg/L e 12 µg/L, respectivamente), onde foi evidenciado ausência da micotoxina em 100% das amostras. A exposição humana e animal às micotoxinas é geralmente avaliada levando-se em conta os dados sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos bem como dados sobre os padrões de consumo da população em questão (Saleh e Goktepe, 2019). Do ponto de vista científico, trazer um retrato da situação patulina *versus* suco de maçã no sul do Brasil, auxilia pesquisadores em todo o mundo, uma vez que esta micotoxina parece estar presente em muitos produtos e países ao redor do globo, sendo um tóxico que apesar da sua descoberta longínqua, ainda precisa ser mais estudado e compreendido acerca de seus efeitos para saúde humana.

Em vista do que já se sabe sobre a patulina, muitos países como Estados Unidos, Brasil e os países pertencentes à União Europeia, estipularam valores máximos aceitáveis de patulina em sucos de maçã de 50 µg/kg (FDA, 2000, EC, 2006, ANVISA, 2011). Na Europa, produtos sólidos de maçã como compota e puré, receberam valores ainda mais baixos (25 µg/kg) e se os mesmos se destinarem a crianças jovens (rotulados e vendidos como tal), sendo suco, produtos sólidos como compotas e puré (todos de maçã) o valor máximo aceitável passa para 10 µg/kg (EC, 2006). No Brasil, como já referido anteriormente, existem poucos estudos sendo a maioria de longa data que investigaram a ocorrência de patulina em sucos de maçã. Em vista disso, estes resultados são bastante relevantes para o mundo científico além de ser inovador, trazendo pela primeira vez um

panorama a respeito da patulina presente nos sucos comercializados à população nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Entre os trabalhos brasileiros, o presente estudo trouxe pela primeira vez um percentual de 0% de contaminação de patulina em sucos de maçã comercializados para a população (LOQ: 60 µg/L e LOD: 12 µg/L). No ano de 1999, autores encontraram uma amostra contaminada pela micotoxina em produtos produzidos e comercializados no Brasil e vendidos no estado de São Paulo, região sudeste do país (Sylos e Rodriguez-Amaya, 1999). Mais de uma década depois, Amparo et al. (2015) buscaram detectar patulina em amostras de suco de maçã feitas em laboratório com o objetivo de comparar a presença de patulina de maçãs de árvores com maçãs caídas ao solo. Este estudo, como o presente trabalho, foi realizado nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e não encontrou contaminação nas amostras (LOD 10 µg/L), mas difere do presente estudo por não ter avaliado sucos disponíveis para a população e sim amostras criadas em laboratório (Amparo et al., 2015).

Os demais trabalhos brasileiros que buscaram determinar a ocorrência de patulina em alimentos encontraram percentagem de 8,1% de contaminação pela toxina em 37 amostras de suco de maçã e purê de maçã (Sargenti e Almeida, 2010), 3% em 134 amostras de suco, néctar, e bebida a base de soja, todos de maçã (Ilha e Sabino, 2008) e 7,7% em 13 exemplares somente de sucos de maçã (Prado et al., 2000). Além disso, a maioria dos trabalhos brasileiros (Sylos e Rodriguez-Amaya, 1999; Prado et al., 2000; Ilha e Sabino, 2008; Welke et al., 2009 b; Sargenti e Almeida, 2010) foram realizados quando ainda não havia legislação vigente no país para a presença de patulina em alimentos a qual só foi definida no ano de 2011 (ANVISA, 2011).

Exceto o trabalho de Welke et al. (2009 b) que encontrou contaminação em todas as amostras (sendo que a totalidade delas foram recolhidas de um único produtor rural), no restante os estudos brasileiros não tem apresentado até o momento grande relevância para a presença de patulina, porém, esta não é uma realidade comum para pesquisas feitas em outras partes do mundo onde a contaminação por patulina tem sido uma constante (Funes e Resnik, 2009; Shephard et al., 2010; Barreira et al., 2010; Yuan et

al., 2010; Guo et al., 2013; Oroian et al., 2014; Zouaoui et al., 2015; Oteiza et al., 2017; Hammami et al., 2017; Torović et al., 2018; Iqbal et al., 2018; İçli, 2019).

Conforme já referenciado na tabela 4, todos os trabalhos encontrados nos últimos 10 anos apresentam alguma percentagem de contaminação, mesmo que abaixo da legislação exigida pelos órgãos regulamentadores (Funes e Resnik, 2009; Shephard et al., 2010; Barreira et al., 2010; Yuan et al., 2010; Guo et al., 2013; Oroian et al., 2014; Zouaoui et al., 2015; Oteiza et al., 2017; Hammami et al., 2017; Torović et al., 2018; Iqbal et al., 2018; İçli, 2019).

De acordo com a tabela 5, as pesquisas realizadas em Portugal (Barreira et al., 2010; Cunha et al., 2014) e Tailândia (Poapolathep et al., 2017) demonstraram 0% de amostras contaminadas em relação aos valores máximos de patulina permitido nestes países que é de 50 µg/kg para sucos (EC, 2006). Porém, apesar de não excederem o limite aceitável, todas apresentaram contaminação pela toxina nos sucos estudados chegando a um percentual de até 55,6% de contaminação no trabalho de Cunha et al. (2014) (Barreira et al., 2010; Poapolathep et al., 2017). Este alto percentual de patulina encontrado nas amostras do estudo feito por Cunha e colaboradores pode ter relação com a técnica utilizada para detecção do analito (GC-MS) sendo esta metodologia uma das mais sensíveis para este tipo de investigação (Vidal et al., 2019).

No entanto, como já referido no enquadramento teórico (Tabela 6), a maioria dos estudos utilizam a técnica analítica HPLC-UV para detetar patulina em produtos. Embora seja a metodologia mais utilizada em pesquisas no ramo da patulina, esta técnica tem algumas limitações em especificidade e sensibilidade em comparação com a identificação por MS. A especificidade é imperativa para identificar corretamente o composto de interesse, como por exemplo o 5-hidroximetilfurimal (HMF), o qual produz interferências e afeta a quantificação da patulina em HPLC-UV, podendo ser confundido com a patulina (Da Silva et al., 2007; Vidal et al., 2019). Ainda segundo Vidal et al. (2019), a falta de sensibilidade e especificidade presente em HPLC-UV pode ser uma desvantagem séria quando se analisam concentrações baixas de analito em matrizes complexas. Portanto, a utilização de métodos analíticos baseados em LC-MS e

GC-MS fornecem uma sensibilidade melhor do que HPLC-UV, sendo estes métodos mais indicados para rastrear a ocorrência de patulina em matrizes complexas (Vidal et al., 2019).

A busca bibliográfica dos trabalhos que investigaram a ocorrência de patulina demonstrou que poucos foram os autores que destoaram da maioria e utilizaram a MS para identificar a toxina. Apenas dois trabalhos (Poapolathep et al., 2017; Hammami et al., 2019) apresentaram identificação de patulina pelo método MS. Relativamente à utilização da técnica GC-MS, somente Cunha e colaboradores utilizaram o método em Portugal (Cunha et al., 2014). Unindo-se a ele, encontra-se o presente estudo que se mostrou inovador e assertivo frente aos métodos analíticos mais indicados para detetar e identificar a micotoxina. No entanto, a presente pesquisa não encontrou patulina em nenhuma das amostras de suco de maçã, apesar da técnica utilizada.

Além da LC/GC-MS uma outra metodologia analítica promissora foi testada recentemente, chamada de *Single drop liquid-liquid-liquid microextraction* (SD-LLLME) combinada com LC-MS. Os autores avaliaram a eficácia da técnica pela primeira vez, obtendo como resultado um método simples e rápido para detetar patulina em matrizes complexas (Li et al., 2018). Devido à simplicidade do SD-LLLME e à alta precisão do MS, este método exibiu vários méritos como curto tempo de preparação das amostras (20 minutos), fácil manipulação, baixo consumo de solvente e alta precisão (Li et al., 2018). Embora o procedimento seja promissor, ainda não há trabalhos publicados que o utilizem para detetar patulina em sucos comerciais.

O resultado encontrado no presente trabalho pode ter relação com alguns cuidados tomados pelos produtores de maçã brasileiros em relação ao controle do mofo-azul, que provoca a deterioração das frutas. Entre as medidas de controle praticadas podemos destacar a remoção imediata dos frutos infectados do pomar e posteriormente sua destruição; durante a colheita, ter o cuidado de não machucar os frutos, pois o fungo inicia a infecção através de feridas na casca; toda a maquinaria e equipamento utilizado para manejo, transporte e armazenamento mantido constantemente higienizado; o armazenamento feito em condições que não favoreçam o desenvolvimento da doença,

se possível em local com baixa temperatura; controle químico com uso de produtos autorizados pelo Ministério da Agricultura, entre outros (Alves, 2019).

Outro dado relevante a ser discutido é a presença de ácido ascórbico na composição dos sucos o qual já foi apontado como um degradante de patulina em sucos de maçã (Ioi et al., 2017). No presente estudo, 56,2% das amostras possuíam ácido ascórbico entre os ingredientes do suco. Num estudo realizado há mais de uma década já foi possível observar a redução da patulina em 70% dos sucos com adição de ácido ascórbico contra 30% nos sucos que não receberam este aditivo, num período de 34 dias (Drusch et al., 2007). Além do ácido ascórbico, um percentual de 47% das amostras apresentou presença de ácido cítrico, o qual também é considerado como um antioxidante (Duarte et al., 2012). Quando somados, o ácido ascórbico e o ácido cítrico estavam presentes em 80% das amostras analisadas.

Mais recentemente, outro trabalho procurou a degradação química da patulina na presença de ácido ascórbico, utilizando padrão de patulina puro com solução aquosa acidificada e suco de maçã contaminado com patulina (obtido pela adição de puré de maçã produzido a partir de maçãs inoculadas com *Penicillium expansum*) (Assaf et al., 2019). Neste contexto, diferentes concentrações de ácido ascórbico foram avaliadas, assim como a presença ou ausência de oxigênio e diferentes temperaturas de armazenamento. A maior redução de patulina (60%) ocorreu no suco de maçã após 6 dias de incubação a 22 °C na presença de oxigênio. Verificou-se também que o tratamento por ácido ascórbico resultou na geração de produtos de degradação menos tóxicos que a patulina (E e Z-ascladiol) (Assaf et al., 2019). Os autores concluíram que a utilização de ácido ascórbico pode melhorar vários aspectos de qualidade do suco como cor (menos escurecimento), valor nutricional, entre outros (Assaf et al., 2019). Por outro lado, segundo Welke et al. (2009 a), apesar do ácido ascórbico demonstrar efeito promissor quanto a degradação de patulina, devido ao baixo conteúdo de oxigênio no *headspace* das embalagens de sucos, a adição de vitamina C antes do enchimento das embalagens não é uma estratégia eficiente de descontaminação (Welke et al., 2009 a).

Encontrar uma maneira eficaz e acessível para reduzir a patulina em produtos, é um grande desafio (Vidal et al., 2019). A incidência de amostras contaminadas nos estudos recentes aponta para a importância de fortalecer as estratégias de controle, principalmente durante o processo de produção de alimentos pois nesta fase, mesmo as micotoxinas sendo altamente estáveis, diferentes fatores podem afetar a sua estabilidade (Vidal et al., 2019). Segundo Acar et al. (1998), ações como limpeza, lavagem, moagem e prensagem indicaram redução de até 55% da patulina. Já o tratamento do produto pronto, como a pasteurização por exemplo, mostrou um efeito positivo, porém limitado na redução da micotoxina no suco de maçã, já que apenas 26% da patulina foi reduzida a 100 ° C por 20 min (Kadalkal e Nas, 2003). Outros métodos apresentaram resultados mais animadores, como por exemplo a irradiação UV (5 min) feita em sucos de maçã, mostrando uma redução significativa (83%) de patulina (Diao et al., 2018) e o tratamento com pressão hidrostática pulsada, a qual demonstrou uma redução de patulina de 62% nos sucos de maçã (Avsaroglu et al., 2015). Ambas as metodologias para diminuir a contaminação pela toxina são técnicas consideradas promissoras para a aplicação na indústria de processamento de frutas e verduras (Vidal et al., 2019).

Além da contaminação nos produtos alimentares, a fração da quantidade total de patulina que está potencialmente disponível para absorção (bioacessibilidade) após a ingestão de alimentos contaminados deve ser considerada na avaliação de seu potencial para interagir com o organismo e exercer seus efeitos tóxicos (Torović et al., 2018). A digestão gastrointestinal simulada é amplamente empregada em muitos campos das ciências alimentícias e nutricionais, já que a realização de testes em humanos é muitas vezes dispendiosa, invasiva e eticamente discutível (Minekus et al., 2014; Torović et al., 2018). Recentemente utilizando um método padronizado de digestão *in vitro*, realizado em três etapas e proposto inicialmente por Minekus e colaboradores, pesquisadores investigaram a bioacessibilidade de patulina obtendo como resultado uma grande absorção especialmente na fase oral (77,8%) e gástrica (79,3%) com uma redução significativa da toxina na fase intestinal, obtendo uma média de 21,6% da quantidade inicial de patulina ingerida chegando ao final do processo digestivo (Torović et al., 2018). Os autores também relataram diferenças na absorção comprando tipos de suco de maçã, apontando ao final que a matriz alimentar bem como o nível de contaminação e a

maneira pela qual os alimentos são contaminados (enriquecidos ou naturalmente), interferem diretamente no fator digestivo (Torović et al., 2018).

As amostras do presente estudo quando comparada as pesquisas encontradas sobre o tema nos últimos 10 anos demonstra-se menor, porém, vale salientar que esta amostragem representou quase que a totalidade dos sucos de maçã disponíveis na região, uma vez que as amostras foram recolhidas nos maiores centros comerciais, onde há disponíveis a maior variedade de marcas, em ambos os estados. É importante salientar também, que muitos dos estudos apresentados nesta discussão também englobaram sucos mistos feitos com outras frutas, como também outros produtos alimentícios como purés de frutas e geleias, podendo assim ter uma amostra maior devido à diversidade de produtos e marcas. Alguns trabalhos também obtiveram amostras expressivas porque foram realizados com um acompanhamento dos resultados ao longo de anos, podendo assim englobar diferentes safras (Barreira et al., 2010; Guo et al., 2013; Oteiza et al., 2017; Torović et al., 2018).

Com inspiração nestas pesquisas aqui discutidas, abre-se a possibilidade de ampliar este trabalho para investigar outros produtos a base de maçã, como purés de fruta destinados a crianças, geleias, cidra de maçã, maçã desidratada. Outra ideia seria abranger também outras regiões do Brasil (norte, nordeste, centro-oeste), uma vez que todos os estudos nacionais sobre patulina foram realizadas nas regiões sul e sudeste do país. Sendo as micotoxinas e a saúde um tema de constante atualização, seria uma perspectiva interessante para dar seguimento à temática deste estudo.

Uma vez que a indústria de alimentos está sempre em busca de aliar a tecnologia, inovação ao consumo de alimentos para facilitar a vida do consumidor, trazendo alimentos que oferecem mais praticidade, é sempre importante atentar para qualidade destes produtos para a saúde e segurança de quem consome. Esta vigilância constante na alimentação é uma das únicas formas de avaliar a ingestão de micotoxinas que podem ser nocivas à saúde dos seres humanos (Zhong et al., 2018).

VI. CONCLUSÃO

Sendo a patulina um metabólito secundário tóxico produzidos por espécies de fungos um contaminante comum em maçãs e produtos feitos a partir dela, investigar sua ocorrência no Brasil pretendeu trazer um contributo para pesquisadores da área. Todas as 15 marcas disponíveis nos maiores supermercados localizados nos dois estados mais ao sul do Brasil foram analisados através do método GC-MS, um dos mais sensíveis para detetar patulina em matrizes complexas como o suco de maçã. Quanto à ocorrência da micotoxina, o resultado foi inédito para o meio científico, apresentando um total de 100% de amostras negativas para presença da micotoxina pelo método utilizado com LOQ e LOD de 60 µg/L e 12 µg/L, respectivamente. Pesquisas sobre o tema no Brasil, são de longa data além de serem descritas com métodos analíticos menos sensíveis do que o realizado no presente trabalho. Os achados também podem contribuir com pesquisas futuras que busquem relacionar as micotoxinas como a patulina, com patologias variadas.

Dado o exposto no enquadramento teórico desta pesquisa, a consistência das evidências coletadas e os resultados dos estudos provam que a exposição à patulina causa comprometimento da barreira intestinal e problemas gastrointestinais (McKinley e Carlton, 1980; McKinley et al., 1982; Drucsh e Ragab, 2003; Mohan et al., 2012; Assunção et al., 2016; Maidana et al., 2016; Tannous et al., 2017). Em modelos animais, os efeitos são ainda mais graves (imunossupressor, tóxico, mutagénico, genotóxico, carcinogénico) embora seus mecanismos exatos ainda requerem investigações adicionais (Broom et al., 1944; Dickens e Cooke, 1965; Ciegler et al., 1976; Ueno e Kubota, 1976; Escoula et al., 1988; Schumacher et al., 2006). Apesar do seu histórico prejudicial à saúde humana e animal, novas pesquisas buscam conhecer os possíveis mecanismos antitumorais desta micotoxina (Boussabbeh et al., 2015; Abastabar et al., 2017; Monteillier et al., 2018). Portanto, a patulina requer atenção e avaliação adicional para seus níveis em produtos alimentícios e riscos para saúde humana, especialmente em populações de risco, incluindo crianças (Saleh e Goktepe, 2019).

Em vista dos resultados apresentados, podemos supor que a indústria brasileira de suco de maçã tem apresentado uma ótima forma de armazenamento e preparo, atentando para a segurança e qualidade no que diz respeito à contaminação pela micotoxina patulina.

VII. BIBLIOGRAFIA

Abastabar, M. et alii. (2017). In vitro antitumor activity of patulin on cervical and colorectal cancer cell lines. *Current Medical Mycology*, 3(1), pp. 25-29.

Acar, J., Gökmen, V., Taydas, E. E. (1998). The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. *European Food Research and Technology*, 207(4), pp. 328-331.

Alchetron Home Page. (2018). [Em linha]. Disponível em <<https://alchetron.com/Penicillium-expansum>>. [Consultado em 15/07/19].

Al Wright, S. (2015). Patulin in food. *Food Science*, 5. [Em linha]. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.10.003>>. [Consultado em 06/02/2019].

Al-Hazmi, N. A. (2010). Determination of Patulin and Ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(4), pp. 353-359.

Alshannaq, A., Yu, J. H. (2017). Occurrence, Toxicity and Analysis of Major Mycotoxins in Food, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(632), pp. 1-20.

Alves, G. (2019). *Penicillium expansum*. *Oxya, Agro e Biociência*. [Em linha]. Disponível em <<http://www.defesavegetal.net/peniex>>. [Consultado em 24/05/2019].

Amiri, A., Bompeix, G. (2005). Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre-and postharvest environments: Consequences for decay development. *Plant Pathology*, 54(1), pp. 74-81.

Amparo, H. C., Gelinski, J. M., Baratto, M. C. (2015). Níveis de patulina em maçãs de pomares dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil. [Em linha].

Disponível em <<https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/ISSB/article/view/7591>>. [Consultado em 12/03/2019].

Antonissen, G. *et alii.* (2015). Mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic component of intestinal barrier in broiler chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(50), pp. 10846-10855.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011). Resolução RDC n.7. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. [Em linha]. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966>. [Consultado em 22/05/2018].

Assaf, E. H. *et alii.* (2019). Effects of ascorbic acid in patulin aqueous solution and in cloudy apple juice. *Mycotoxin Research*, 35(4), pp. 341-351.

Assunção, R. *et alii.* (2016). In vitro characterization of patulin toxic effects on intestinal epithelial integrity and potential cysteine protective effects. *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*, 16(2), pp. 26-29.

Avsaroglu, M. D. *et alii.* (2015). Use of pulsed- high hydrostatic pressure treatment to decrease patulin in apple juice. *High Pressure Research*, 35(2), pp. 214-222.

Awad, W. A. *et alii.* (2011). A diet naturally contaminated with the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON) down regulates gene expression of glucose transporters in the intestine of broiler chickens. *Livestock Science*, 140(1-3), pp. 72-79.

Baert, K. *et alii.* (2012). Evaluation of strategies for reducing patulin contamination of apple juice using a farm to fork risk assessment model. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), pp. 119-129.

Ballester, A. R. *et alii.* (2015). Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. *Molecular Plant Microbe Interact*, 28(3), pp. 232-248.

Barad, S., Sionov, E., Prusky, D. (2016). Role of patulin in post-harvest diseases. *Fungal Biology Reviews*, 30(1), pp. 24-32.

Barreira, M. J., Alvito, P. C., Almeida, C. M. (2010). Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry*, 121(3), pp. 653-658.

Becci, P. J. *et alii.* (1981). Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, 1(5), pp. 256-263.

Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), pp. 497-516.

Biomedicina Brasil Home Page. (2012). [Em linha]. Disponível em <<https://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html>>. [Consultado em 10/05/2019].

Bissessur, J., Permaul, K., Odhav, B. (2001). Reduction of patulin during apple juice clarification. *Journal of Food Protection*, 64(8), pp. 1216-1219.

Boussabbeh, M. *et alii.* (2015). The potential effect of patulin on mice bearing melanoma cells: an anti-tumour or carcinogenic effect? *Tumor Biology*, 37(5), pp. 6285-6295

Broom, W. A. *et alii.* (1944). The pharmacology of patulin. *British Journal of Experimental Pathology*, 25(6), pp. 195-207.

Brown, T. P., Rottinghaus, G. E., Williams, M. E. (1992). Fumonisin mycotoxicosis in broilers: Performance and pathology. *Avian Diseases*, 36(2), pp. 450-454.

Cao, J. *et alii.* (2013). Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), pp. 167-173.

Castoria, R. *et alii.* (2005). Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. *Phytopathology*, 95(11), pp. 1271-1278.

Ciegler, A., Beckwith, A. C., Jackson, L. K. (1976). Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(5), pp. 664-667.

Ciegler, A., Detroy, R., Lillehoj, E. (1971). Patulin, Penicillic Acid, and Other Carcinogenic Lactones. *Microbial Toxins*, 6, pp. 409-434.

Cole, R. J., Cox, R. H. (1981). *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York, Academic Press, pp. 937.

Cunha, S. C. *et alii.* (2014). Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control*, 44, pp. 185-190.

Cunha, S. C., Faria, M. A., Fernandes, J. O. (2009). Determination of patulin in apple and quince products by GC e MS using 13C5-7 patulin as internal standard. *Food Chemistry*, 115(1), pp. 352-359.

Da Silva, S. J. N. *et alii.* (2007). Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(2), pp. 406-413.

De Melo, F. T. *et alii.* (2012). DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), pp. 3548-3555.

De Ruyck, K. *et alii.* (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research-Review in Mutation Research*, 766, pp. 32-41.

Diao, E. *et alii.* (2018). Improving the safety of apple juice by UV irradiation. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), pp. 2005-2011.

Dickens, F., Cooke., J. (1965). Further studies on the carcinogenic action of certain lactones and related substances in the rat and mouse. *British Journal of Cancer*, 19, pp. 392-403.

Dong, X. *et alii.* (2015). Patulin biodegradation by marine yeast *Kodameae ohmeri*. *Food Additives and Contaminants Part*, 32(2), pp. 352-360.

Doutre, M., S. (2002). Ciclosporin. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 129(4), pp. 392-404.

Drusch, S., Kopka, S., Kaeding, J. (2007). Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food Chemistry*, 100(1), pp. 192-197.

Drusch, S., Ragab, W. (2003). Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *Journal of Food Protection*, 66(8), pp. 1514-1527.

Duarte, A. M. *et alii.* (2012). Organic acids concentration in citrus juice from conventional versus organic farming. *Acta Horticulturae*, 933, pp. 601-606.

Duarte, S. C., Pena, A., Lino, C. M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, 27(2), pp. 187-198.

Eaton, D. L., Groopman, J. D. (1994). *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. San Diego, California, Academic Press.

EC - Commission Regulation (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities: Brussels, 364. [Em linha].

Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>>.

[Consultado em 18/07/2018].

Errampalli, D. (2014). *Penicillium expansum* (Blue Mold). Postharvest Decay. *Control Strategies*. [Em linha]. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00006-5>>. [Consultado em 06/01/2019].

Escoula, L. *et alii*. (1988). Patulin immunotoxicology: Effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. *International Journal of Immunopharmacology*, 10(8), pp. 983-989.

Espaço Educar. (2008). [Em linha]. Disponível em <https://www.espacoeducar.net/2008/02/atlas_08.html>. [Consultado em 05/07/2019].

FAO - Code of Practice for the Prevention and Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and Apple Juice Ingredients in Other Beverages (2003). In *CAC/RPC*, 50, pp. 1-6.

FDA – Food and Drug Administration (2000). Patulin in Apple Juice, Apple Juice Concentrates and Apple Juice Products. [Em linha]. Disponível em <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim37.pdf>>. [Consultado em 10/02/2019].

Fernández-Cruz, M. L., Mansilla, M. L., Tadeo, J. L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1(2), pp. 113-122.

Food Ingredients Brasil (2009). As Micotoxinas. [Em linha]. Disponível em <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. [Consultado em 10/02/2019].

Foster, J. W., Woodruff, H. B., Mc Daniel, L. E. (1943). Microbiological Aspects of Penicillin: III. Production of Penicillin in Surface Cultures of *Penicillium notatum*.

Journal of Bacteriology. [Em linha]. Disponível em <<https://jb.asm.org/content/jb/46/5/421.full.pdf>>. [Consultado em 05/07/2019].

Frisvad, J. (2018). A critical review of producers of small lactone mycotoxins: Patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), pp. 73-100.

Funes, G. J. *et alii*. (2013). Application of pulsed light to patulin reduction in McIlvaine buffer and apple products. *Food Control*, 30(2), pp. 405-410.

Funes, G. J., Resnik, S. L. (2009). Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control*, 20(3), pp. 277-280.

Garcia, D. *et alii*. (2011). Intraspecific variability of growth and patulin production of 79 *Penicillium expansum* isolates at two temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), pp. 195-200.

Gaucher, G. M. (1979). Mycotoxins - Their Biosynthesis in Fungi: Patulin and Related Carcinogenic Lactones. *Journal of Food Protection*, 42(10), pp. 810-814.

Grenier, B. *et alii*. (2012). The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B₁ correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochemical Pharmacology*, 83(10), pp. 1465-1473.

Guo, M. *et alii*. (2014). Combination of metagenomics and culture-based methods to study the interaction between ochratoxin A and gut microbiota. *Toxicological Sciences*, 141(1), pp. 314-323.

Guo, Y. *et alii*. (2013). Survey of patulin in apple juice concentrates in Shaanxi (China) and its dietary intake. *Food Control*, 34(2), pp.570-573.

Hammami, W. *et alii*. (2017). Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. occurrence in apples and apple-based products including baby food. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(4), pp. 343-349.

Hawar, S. *et alii.* (2013). Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 34, pp. 502-508.

Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Estados Unidos da América, Wiley.

Hussein, H. S., Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), pp. 101-134.

IARC - International Agency for Research on Cancer (2015). Mycotoxin Control in Low- and Middle-Income Countries. *IARC Working Group Report*, 9, pp. 31-42.

İçli, N. (2019). Occurrence of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in apple sour, which is a traditional product of Kastamonu, Turkey. *Food Additives and Contaminants: Parte A*, 36(6), pp. 952-963.

Ilha, M. H. (2006). Suco de maçã: metodologia analítica para determinação de patulina e qualidade físico-química e microbiológica. [Em linha]. Disponível em <<http://pesquisa.bvsalud.org/tes/pt/lil-434327>>. [Consultado em 20/07/2019].

Ilha, M. H., Sabino, M. (2008). Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. *Food Control*, 19(4), pp. 417-422.

Ioi, D. J. *et alii.* (2017). Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins*, 9(157), pp. 1-18.

Iqbal, Z. S. *et alii.* (2018). Natural occurrence of patulin in different fruits, juices and smoothies and evaluation of dietary intake in Punjab, Pakistan. *Food Control*, 84, pp. 370-374.

Janotová, L. *et alii.* (2011). Effect of processing of apple puree on patulin content. *Food Control*, 22(6), pp. 977-981.

Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre, Artmed.

Jia, X. *et alii.* (2016). Malignant transformation of human gastric epithelium cells via reactive oxygen species production and Wnt/ β -catenin path- way activation following 40-week exposure to ochratoxin A. *Cancer Letters*, 372(1), pp. 36-47.

Kadalkal, Ç., Nas, S. (2003). Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 83(9), pp. 987-990.

Kawauchiya, T. *et alii.* (2011). Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells. *Toxicology Letters*, 205(2), pp. 196-202.

Kharandi, N., Babri, M., Azad, J. (2013). A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS. *Food Chemistry*, 141(3), pp. 1619-1623.

Kingston, C. (2010). Maturity indices for apple and pear. *Horticultural. Reviews*, 13, pp. 407-432.

Kowalska, K., Habrowska-Górczynska, D. E., Piastowska-Ciesielska, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, pp. 141-149.

Lazzarotto, J. J., Girardi, C. S., Zandoná, G. P. (2016). Parâmetros para investimentos na produção de suco integral de maçã com alto padrão tecnológico. [Em linha]. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/155224/1/CircTec133.pdf>>. [Consultado em 22/05/2019].

Li, B. Q. *et alii.* (2015 a). Genomic characterization reveals insights into patulin biosynthesis and pathogenicity in *Penicillium* species. *Molecular Plant-Microbe Interact*, 28(6), pp. 635-647.

Li, F. *et alii.* (2015 b). Fumonisin B₁, B₂ and B₃ in corn products, wheat flour and corn oil marketed in Shandong province of China. *Food Additives and Contaminants. Part B*, 8(3), pp. 169-174.

Li, X. *et alii.* (2017). Determination of trace patulin in apple-based food matrices. *Food Chemistry*, 233, pp. 290-301.

Li, X. *et alii.* (2018). Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 257, pp. 1-6.

Liew, W., Mohd-Redzwan, S. (2018). Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(60). [Em linha]. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00060>>. [Consultado em 12/05/18].

Liu, B., Peng, X., Meng, X. (2018). Effective Biodegradation of Mycotoxin Patulin by Porcine Pancreatic Lipase. *Frontiers in Microbiology*, 9(615). [Em linha]. Disponível em <[doi: 10.3389/fmicb.2018.00615](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00615)>. [Consultado em 17/12/18].

Liu, Y., Wu, F. (2010). Global Burden of Aflatoxin-induced Hepato Cellular Carcinoma. *Environ Helth Perspect*, 118(6), pp. 818-824.

Lovett, J., Peeler, J. (1973). Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. *Journal of Food Science*, 38(6), pp. 1094-1095.

Madigan, M. T. (2016). *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre, Artmed.

Magnoli, C. E. *et alii.* (2007). Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn-based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia*, 163(5), pp. 249-260.

Mahfoud, R. *et alii.* (2002). The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: Mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 181(3), pp. 209-218.

Maidana, L. *et alii.* (2016). Effects of patulin and ascladiol on porcine intestinal mucosa: An ex vivo approach. *Food and Chemical Toxicology*, 98, pp. 189-194.

Mantle, P. G. (2002). Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 50(3), pp. 143-146.

Markowski, J. *et alii.* (2015). Composition of clear and cloudy juices from French and Polish apples in relation to processing technology. *Food Science and Technology*, 62(1), pp. 813-820.

Mayer, V. W., Legator, M. S. (1969). Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(3), pp. 454-456.

McKinley, E. R., Carlton, W. W. (1980). Patulin mycotoxicosis in Swiss ICR mice. *Food and Chemical Toxicology*, 18(2), pp. 181-187.

McKinley, E. R., Carlton, W. W., Boon, G. D. (1982). Patulin mycotoxicosis in the rat: Toxicology, pathology and clinical pathology. *Food and Chemical Toxicology*, 20(3), pp. 289-300.

McLaughlin, J. *et alii.* (2009). The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in Caco-2 cells. *Toxicol In Vitro*, 23(1), pp. 83-89.

McNair, H. M., Miller, J. M. (1997). *Basic Gas Chromatography*. Estados Unidos da América (EUA), Wiley Blackwell.

Minekus, M. *et alii.* (2014). A standardized static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Function*, 5(6), pp. 1113-1124.

Moake, M. M., Padilla-Zakour, O. I., Worobo, R. W. (2005). Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety*, 1, pp. 8-21.

Mohan, H. M. *et alii*. (2012). The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), pp. 4097-4102.

Monteillier, A. *et alii*. (2018). Lung Cancer Chemopreventive Activity of Patulin Isolated from *Penicillium vulpinum*. *Molecules*, 23(636). [Em linha]. Disponível em <doi:10.3390/molecules23030636>. [Consultado em 15/07/2019].

Morales, H. *et alii*. (2007). Patulin accumulation in apples during postharvest: Effect of controlled atmosphere storage and fungicide treatments. *Food Control*, 18(1), pp. 1443-1448.

Mostrom, M. (2016). Mycotoxins: Toxicology. *Encyclopedia of Food and Health*. [Em linha]. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00480-3>>. [Consultado em 22/01/2019].

Newberne, P. M., Butler, W. H. (1969). Acute and chronic effect of aflatoxin B₁ on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Research*, 29(1), pp. 236-250.

Oga, S., Camargo M., Batistuzzo, J. (2014). *Fundamentos de Toxicologia*, São Paulo, Atheneu Editora.

Oliveira, R. J. D, Carvalho, F. D., Bastos, M. L (2015). *Toxicologia Forense*, Lisboa, Editora Pactor.

Oroian, M., Amariei, S., Gutt, G. (2014). Patulin in apple juices from the Romanian market. *Food Additives & Contaminants: Parte B*, 9(2). [Em linha]. Disponível em <<https://doi.org/10.1080/19393210.2013.861518>>. [Consultado em 12/02/2019].

Ostry, V. *et alii.* (2017). Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33(1), pp. 65-73.

Oteiza, M. J. *et alii.* (2017). Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. *Food Science and Technology*, 80, pp. 200-207.

Pattono, D. *et alii.* (2013). Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control*, 33(1), pp. 54-57.

Payros, D. *et alii.* (2017). Food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. *Mbio*, 8(2). [Em linha]. Disponível em <doi:10.1128/mbio.00007-17>. [Consultado em 16/07/2019].

Peers, F. G., Linsell, C. A. (1973). Dietary aflatoxins and human liver cancer - a population study based in Kenya. *British Journal of Cancer*, 27(6), pp. 473-484.

Pennacchio, A. *et alii.* (2015). A near-infrared fluorescence assay method to detect patulin in food. *Analytical Biochemistry*, 481, pp. 55-59.

Penteado, J. C., Magalhães, D., Masini, J. C. (2008). Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Química Nova*, 31(8), pp. 2190-2193.

Peraica, M. *et alii.* (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), pp. 754-766.

Pestka, J. J., Smolinski, A. T. (2005). Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 8(1), pp. 39-69.

Pfenning, C. *et alii.* (2014): The mycotoxin patulin reacts with DNA bases with and without previous conjugation to GSH: implication for related a, b-unsaturated carbonyl

compounds. *Archives of Toxicology*, 90(2). [Em linha]. Disponível em <doi:10.1007/s00204-014-1443-z>. [Consultado em 12/02/2019].

Pfohl-Leszkwicz, A. (2009). Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumors. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60(4), pp. 465-483.

Pinton, P. *et alii*. (2015). Deoxynivalenol inhibits the expression by goblet cells of intestinal mucins through a PKR and MAP kinase dependent repression of the resistin like molecule β . *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(6), pp. 1076-1087.

Piotrowska, M. *et alii*. (2014). The effect of experimental fusarium mycotoxicosis on microbiota diversity in porcine ascending colon contents. *Toxins*, 6(7), pp. 2064-2081.

Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: Which are important? *Medical Mycology*, 38(s1), pp. 17-22.

Pitt, J. I., Miller, J. D. (2017). A Concise History of Mycotoxin Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), pp. 7021-7033.

Prado, G. *et alii*. (2000). Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 59(1/2), pp. 21-25.

Rahimi, E., Jeiran, R. M. (2015). Patulin and its dietary intake by fruit juice consumption in Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(1). [Em linha]. Disponível em <<http://www.tandfonline.com/loi/tfab20>>. [Consultado em 29/01/2019].

Raiola, A. *et alii*. (2015). Risk Analysis of Main Mycotoxins Occurring in Food for Children: An Over-View. *Food and Chemical Toxicology*, 84, pp.169-80.

Reddy, K. R. N., Nurdijati, S. B., Salleh, B. (2010). An overview of plant-derived products on control of mycotoxigenic fungi and mycotoxins. *Asian Journal of Plant Science*, 9(3), pp. 126-133.

Rheeder, J. P., Marasas, W. F., Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), pp. 2101-2105.

Robert, H. *et alii*. (2017). Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota the new targets? *Journal of Toxicology Environmental and Health, Part B*, 20(5), pp. 249-275.

Sabino, M. (2014). Micotoxina em Alimentos. *In*: Oga, S., Camargo M. e Batistuzzo, J. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo, Atheneu Editora, pp. 535-542.

Sakata, R. A. P., Sabbag, S. P., Maia, J. T. L. S (2011). Ocorrência De Aflatoxinas Em Produtos Alimentícios e o Desenvolvimento de Enfermidades. *Enciclopédia Biosfera*, 7(13), pp. 1477-1498.

Saleh, I., Goktepe, I. (2019). The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and Chemical Toxicology*. [Em linha]. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.036>>. [Consultado em 12/02/2019].

Salomão, B. C. *et alii*. (2009). Influence of storage temperature and apple variety on patulin production by *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*, 72(5), pp. 1030-1036.

Sant'Ana, A. S. *et alii*. (2010). Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssochlamysnivea* and *Byssochlamys fulva*. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), pp. 156-163.

Santos, E. R. D. (2015). Material complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos. [Em linha]. Disponível em <<https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1311301/course/section/972329/Drechsler-Santos%202015%20material%20didático%20fungos%20encarte%20EAD.pdf>>. [Consultado em 23/01/2019].

Sanzani, S. *et alii.* (2012). Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), pp. 323-331.

Sargenti, S. R., Almeida, C. A. (2010). Determination of patulin in apple juice by HPLC using a Simple and fast Sample preparation method. *Eclética Química*, 35(2), pp. 14-21.

Schumacher, D. M. *et alii.* (2006). DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. *Toxicology Letters*, 166(3), pp. 268-275.

Sewram, V. *et alii.* (2000). Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 897(1-2), pp. 365-374.

Sforza, S., Dall’Asta, C., Marchell, R. (2006). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Wiley InterScience*, 25. [Em linha]. Disponível em <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mas.20052>>. [Consultado em 24/04/2019].

Shao, S., Zhou, T., McGarvey, B. D. (2012). Comparative metabolomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during the degradation of patulin using gas chromatography–mass spectrometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(3), pp. 789-797.

Shephard, G. S. *et alii.* (2010). Preliminary exposure assessment of deoxynivalenol and patulin in South Africa. *Mycotoxin Research*, 26(3), pp. 181-185.

Snini, S. P. *et alii.* (2016). Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favoring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Molecular Plant Pathology*, 17(6), pp. 920-930.

Sobrova, P. *et alii.* (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3(3), pp. 94-99.

Soliman, S. *et alii.* (2015). Potential mycotoxin contamination risks of apple products associated with fungal flora of apple core. *Food Control*, 47, pp. 585-591.

Spadaro, D. *et alii.* (2013). A new strain of *Metschnikowia fructicola* for postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 75, pp. 1-8.

Steiman, R. *et alii.* (1989). Production of patulin by micromycetes. *Mycopathologia*, 105(3), pp. 129-133.

Stoev, S. D. (2013). Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(9), pp. 887-901.

Sylos, C. M., Rodrigues-Amaya, D. (1999). Incidence of patulin in fruits and fruit juices in Campinas, Brazil. *Food Additives & Contaminants*, 16(2), pp. 71-74.

Takahashi, J. A. *et alii.* (2017). Fungos Filamentos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. *Revista Virtual de Química*, 9(6). [Em linha]. Disponível em <<http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v9n6a15.pdf>>. [Consultado em: 05/07/2019].

Tannous, J. *et alii.* (2016). A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: Effect of temperature, pH, and water activity. *Food Science and Nutrition*, 4(4), pp. 61-622.

Tannous, J. *et alii.* (2017). Patulin transformation products and last intermediates in its biosynthetic pathway, E- and Z-ascladiol, are not toxic to human cells. *Archives of Toxicology*, 9(6), pp. 2455-2467.

Tola, M., Kebede, B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food and Agriculture*, 2(1), pp. 1-12.

Torović, L. *et alii.* (2018). Patulin in fruit juices: occurrence, bio accessibility, and risk assessment for Serbian population. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(5), pp. 985-995.

Ueno, Y., Kubota, K. (1976). DNA attaching ability of carcinogenic mycotoxinin recombination deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Research*, 36, pp. 445-451.

Vansteelandt, M. *et alii.* (2012). Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. *Fungal Biology*, 116(9), pp. 954-961.

Vecchia, A. D., Fortes, R. C. (2007). Contaminação Fúngica em granola comercial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2), pp. 324-327.

Vidal, A. *et alii.* (2019). The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 129, pp. 249-256.

Wan, L. Y. *et alii.* (2013). Individual and combined effects of Fusarium toxins on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in swine jejunal epithelial cells. *Toxicology Letters*, 220(3), pp. 238-246.

Wang, L. *et alii.* (2015). A new insight into the adsorption mechanism of patulin by the heat-inactive lactic acid bacteria cells. *Food Control*, 50, pp. 104-110.

Wei, J. *et alii.* (2010). Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 56(2), pp. 147-154.

Wei, S. *et alii.* (2017). Targeting trichothecene biosynthetic genes. *Methods in Molecular Biology*, 1542, pp. 173-189.

Welke, J. E. *et alii.* (2009 a). Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. *Ciência Rural*, 39(1), pp. 300-308.

Welke, J. E. *et alii.* (2009 b). Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector. *Food Additives and Contaminants*, 26(5), pp. 754-758.

WHO - World Health Organization (1995). Evaluation of certain food additives and contaminants. *Report of the Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives*, Geneva, Switzerland, 859, pp. 36-38.

Wu, Q. *et alii.* (2013). Trichothecenes: structure-toxic activity relationships. *Current Drug Metabolism*, 14(6), pp. 641-660.

Yazar, S., Omurtag, G. Z. (2008). Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Science*, 9(11), pp. 2062-2090.

Yuan, Y. *et alii.* (2010). Patulin content in apple products marketed in Northeast China. *Food Control*, 21(11), pp. 1488-1491.

Yuan, Y. *et alii.* (2014). Patulin reduction in apple juice by inactivated Alicyclobacillus spp. *Letters in Applied Microbiology*, 59(6), pp. 604-609.

Zarate, E. *et alii.* (2017). Fully Automated Trimethylsilyl (TMS) Derivatization Protocol for Metabolite Profiling by GC-MS. *Metabolites*, 7(1). [Em linha]. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372204/>>. [Consultado em 27/05/2019].

Zhong, L. *et alii.* (2018). Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins*, 10(11). [Em linha]. Disponível em <<https://www.mdpi.com/2072-6651/10/11/475>>. [Consultado em 12/02/19].

Zong, Y., Li, B., Tian, S. (2015). Effects of carbon, nitrogen and ambient pH on patulin production and related gene expression in *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 206(3), pp. 102-108.

Zouaoui, N. *et alii*. (2015). Occurrence of patulin in various fruit juice marketed in Tunisia. *Food Control*, 51, pp. 356-360.