

ASPECTOS RELEVANTES SOBRE RISCOS DA PRODUÇÃO DE PATULINA EM MAÇÃ

GISELE ROSS-URBANO¹
ELISA YOKO HIROOKA¹

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

RESUMO: A maçã (*Malus domestica* Borkhausen) é uma das culturas mais difundidas para o consumo "in natura" ou processada, com a oportunidade para o Brasil em ingressar no mercado internacional. Em vista ao novo perfil desta cultura, desenvolveu-se uma revisão conscientizando sobre a patulina, micotoxina mais freqüente em maçã, a fim de minimizar eventuais problemas surgidos com a sua comercialização.

PALAVRAS-CHAVE: maçã, patulina, *Penicillium* spp.

1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas, compostos provenientes de vias metabólicas comumente presentes em fungos, que proliferam em produtos agrícolas destinados a alimentação, acarretam sérios danos a saúde humana e de animais (Goldblatt, 1977; Harison, 1989; Hirooka et al., 1996).

A conferência sobre micotoxinas, promovida por "Food Agriculture Organization / World Health Organization / United Nation Environment Program"-FAO/WHO/UNEP em 1977, comprovou que sete micotoxinas encontram-se comumente contaminando os alimentos: aflatoxina, ocratoxina A, patulina, zearalenona, tricotecenos, citrinina e ácido penicílico (Jelinek et al., 1989; Picci, 1992). Ênfase é dada a aflatoxina, em vista de maior incidência em alimentos destinados a população humana, seguida de ocratoxina A e de patulina (Jelinek et al., 1989; Picci, 1992; Fallik et al., 1996). Entretanto, não se pode descartar o impacto devido a micotoxinas ainda desconhecidas, como ocorreu com fumonisina produzida por *Fusarium moniliforme* descoberta em 1988, que causou grande repercussão, por contaminar praticamente todos os produtos de milho (Hirooka et al., 1996).

Muitos fatores contribuem para a ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar, estando entre principais os eventos biológicos, que favorecidos pela rica composição nutricional, resulta em susceptibilidade dos tecidos vegetais ao ataque fúngico (Goldblatt, 1977). Os fatores ambientais relevantes são representados pela temperatura, umidade, danos físicos e mecânicos, colheita e estocagem dos produtos de origem vegetal (Lacey, 1986). Conseqüentemente, os grãos constituem substratos mais predispostos a contaminação natural, em vista de desenvolvimento dos fungos toxigênicos, seja a nível de campo ou na armazenagem (Taniwaki et al., 1989; Picci, 1992; Hirooka et al., 1996).

Aliado a isto, o avanço tecnológico e o interesse na comercialização de frutas em nível internacional, assim como a estocagem para o consumo, ao longo dos períodos de entressafas introduziu outro problema: o risco da proliferação de fungos em frutos refrigerados, com ênfase a *Penicillium* spp. (Harison, 1989). Salienta-se que neste gênero encontram-se várias espécies produtoras de patulina. Considerando que a maçã (*Malus domestica* Borkhausen) seja uma fruta bastante apreciada, passível de ser submetida a um período razoável de armazenagem, esta constitui alimentos mais susceptível a contaminação pela patulina (Ross, 1995). Os fungos toxigênicos se desenvolvem nas regiões do fruto que sofreram danos por pragas ou ação mecânica, formando focos de apodrecimento (Taniwaki et al., 1989).

Em vista do atual interesse na exportação de frutas brasileiras, o controle sobre armazenagem se torna essencial, para garantir a qualidade e ampliar o mercado consumidor externo. A extensão territorial brasileira permite o cultivo, seja de frutas tropicais ou de clima temperado, cujo ciclo de produção é inverso aos países do Hemisfério Norte. Este potencial favorece a entrada do Brasil no mercado internacional, expandindo-se além do Mercosul, sendo que no ano de 1997, o Brasil iniciou exportação de maçã para Holanda.

Aborda-se, a seguir, tópicos relevantes sobre a maçã e um dos seus principais problemas a nível de estocagem, ou seja, o desenvolvimento de *Penicillium* spp. capaz de produzir micotoxina de destaque, a patulina.

2. PRODUÇÃO DE MAÇÃ NO BRASIL

A maçã (*Malus domestica* Borkhausen), é uma das culturas mais importantes no âmbito mundial, só superada em volume pela videira e cítricos (Barradas & Koller, 1976). O seu consumo, em forma natural ou

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/Universidade Estadual de Londrina - Caixa postal 6001, Londrina, Pr., CEP 86051-970

processada é amplamente difundido, obtendo-se os mais variados produtos derivados, seja suco, polpa, purê, produtos fermentados e desidratados, conservas e doces (Machuca, 1988).

A macieira pertence a família Rosaceae, sub-família Pomoideae (EMPASC, 1986). A nomenclatura científica confere várias denominações específicas para a macieira: *Pyrus malus* Lineu, *Malus pumila* Mitler e *Malus domestica* Borkhausen (Bernardes & Godoy, 1988), sendo esta última, descrita por Borkhausen e proposta em 1803 (Korban & Skirvin, 1984). Sendo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, *Malus domestica* foi a primeira denominação oficial para a macieira cultivada, utilizada até a atualidade (EMPASC, 1986).

Além de ser uma fruta saborosa, a literatura relata participação medicinal de maçã no combate a pressão alta e diarreia (Ushirozawa, 1978). O primeiro efeito se deve a ação diurética, em vista do baixo teor em sódio e alto de potássio e o segundo, devido a presença considerável de pectina, capaz de adsorver os compostos indesejáveis oriundos do metabolismo microbiano (Barradas & Koller, 1976; Fundação Cargill, 1983). A maçã é também indicada para a indústria de alimentos dietéticos, já que a higroscopicidade da pectina reduz a absorção de nutrientes pelo trato gastrointestinal (Ushirozawa, 1978).

Tabela 1. Composição química média em 100g de maçã.

Composição	Food Industry Center (valores)	EMPASC (valores)	Unidades(%)
Umidade	87.70	84.40	g
Carboidratos	14.20	14.50	g
Proteínas	0.40	0.20	g
Lipídios	0.50	0.60	g
Cinzas	0.30	-	g
Potássio	110.0	110.0	mg
Fósforo	12.0	10.0	mg
Cálcio	7.0	7.0	mg
Sódio	4.0	1.0	mg
Ferro	0.50	0.30	mg
Magnésio	-	8.0	mg
Niacina	0.10	0.10	mg
Vit. B ₁ - Tiamina	0.01	0.03	mg
Vit. B ₂ -Riboflavina	0.01	-	mg
Vit. C	-	4.0	mg

Fonte: "Food Industry Center" (E.U.A.), 1988 e EMPASC (S.C.), 1986.

Em consideração ao potencial nutricional e econômico da maçã e seus produtos derivados, o "Food Industry Center" (1988) e a EMPASC - Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária (1986), descreveram as composições químicas médias, descritas na Tabela 1.

O fator determinante no plantio das macieiras numa Região depende do período de baixa temperatura, necessário para o repouso vegetativo e conseqüente quebra de dormência dos brotos (Fundação Cargill, 1983).

No Brasil, as áreas recomendadas para o plantio da fruta situam-se na Região Sul, com a representatividade de 90% da produção nacional (SEAB-Pr 1993/1994).

Tabela 2. Produção brasileira de maçãs, em toneladas.

Ano	S.C.	R.S.	P.R.	S.P.	M.G.	Total
1973/74	1.528	-	-	-	-	1.528
1974/75	5.000	-	-	-	-	5.000
1975/76	8.400	-	-	-	-	8.400
1976/77	11.848	-	-	-	-	11.848
1977/78	10.369	3.349	500	-	-	14.218
1978/79	21.042	5.600	700	11.000	240	38.582
1979/80	27.806	9.000	2.356	9.000	553	48.715
1980/81	37.202	13.500	4.000	11.600	947	67.249
1981/82	73.600	25.000	7.910	17.000	1.300	124.810
1982/83	53.742	21.000	8.000	13.200	1.100	97.042
1983/84	104.852	34.000	13.980	7.000	1.200	161.032
1984/85	133.920	46.000	17.300	8.000	1.200	206.420
1985/86	152.037	65.000	15.727	7.717	1.830	242.311
1986/87	104.202	45.000	23.000	5.000	1.000	178.202
1987/88	203.131	88.000	30.000	20.000	1.200	342.331
1988/89	230.333	102.000	21.497	10.000	1.000	364.830
1989/90	225.556	93.750	23.720	8.000	-	351.028
1990/91	217.218	85.276	23.257	5.000	-	330.751
1991/92	240.000	130.000	23.000	10.000	-	403.000
1992/93	300.000	177.087	26.300	10.000	-	513.387
1993/94	240.000	188.891	22.909	5.000	-	456.800
1994/95	254.000	196.800	28.800	-	-	480.000

*Estimativa

Fonte: ABPM, AFF, AGAPOMI, FRUTIPAR, ACARESC

Elaboração: Instituto CEPA

De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores de Maçã-ABPM, a evolução ocorrida entre 1973 a 1995 mostra que este país sofreu um aumento espetacular, saindo da faixa de 1.500 toneladas para aproximadamente 500.000 toneladas, cujas cifras capacitam a exportação (Tabela 2). Salienta-se que o Estado de Santa Catarina contribui com mais de 50% da produção total, com os valores estabilizados nos últimos anos, na faixa de 240.000 a 300.000 toneladas (Tabela 2).

As cultivares predominantes de maçã (*Malus domestica*) são Gala e Fuji, cuja área de plantio em Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná ocupam 75, 81 e 75%, respectivamente, em relação a outros cultivares (SEAB-Pr, 1993/1994). Apesar destes dois cultivares ocuparem 78% da produção nacional, pequena porcentagem de Golden Delicious também vem conquistando o mercado (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição da produção Nacional por cultivar de maçã em 1995.

Cultivar	%
Gala	40.0
Fuji	38.0
Golden	13.0
Red	3.00
Granny	0.80
Outras	5.20

Fontes: ABPM, DERAL, AGAPOMI, ABFCT, ICEPA -SC, E laboração: Instituto CEPPA, 1995

No Estado do Paraná, o plantio da cultivar Gala é praticado nas regiões de Palmas, Guarapuava, Ponta Grossa e Curitiba, enquanto que a cultura de Fuji abrange maior área, já que permite o cultivo em diversas

regiões do Estado (Fontoura, 1986). Todavia, as condições climáticas restringem a participação da cultura de maçã paranaense na faixa de 20.000 toneladas (tabela 2). Em vista a estes dados cada vez mais promissores para a maçã, inclusive visando exportação, descreve-se a seguir as características gerais sobre os dois cultivares predominantes no Brasil. A oferta de maçã paranaense para o mercado interno inicia-se em janeiro, com a cultivar Gala, sendo que a maior parte da produção é comercializada no próprio Estado, através de Centrais de Abastecimento do Paraná-CEASA (SEAB-Pr, 1993/1994).

3. CULTIVAR GALA

Consiste de um cultivar originário da Nova Zelândia, obtido através do cruzamento de "Kidd's Orange Red" com "Golden Delicious". Caracterizada como árvore de porte médio, a época de floração coincide com a das cultivares Fuji, Willie Sharp e Blackjon, que também servem de polinizadores (Fontoura, 1986).

Os frutos arredondados são de tamanho médio e uniformes, sendo que os exemplares maiores tendem a formato cilindro-cônico. A epiderme de coloração vermelha, ligeiramente estriada com fundo amarelo confere ótima aparência a cultivar, que internamente apresenta polpa amarela, firme, crocante, suculenta, doce e medianamente perfumada. É classificada entre os frutos de conservação regular, com época de maturação no mês de fevereiro e esporadicamente, no final de janeiro (Bernardes & Godoy, 1988).

4. CULTIVAR FUJI

Sendo um cultivar de origem japonesa, resultante do cruzamento de Ralls Janet com a Golden Delicious, constitui uma das principais cultivares daquele país (Ushirozawa, 1978).

Caracterizada como árvore de grande porte e vigorosa, a floração ocorre do final de setembro a meados de outubro, dependendo das condições climáticas. A época de floração coincide com a das cultivares Gala, Blackjon e Willie Sharp, possibilitando polinização cruzada (Fontoura, 1986).

O fruto, de tamanho médio a grande, apresenta formato arredondado ou achatado, sendo a última característica mais acentuada nas regiões com temperaturas elevadas. A epiderme é de cor ligeiramente rajada, com fundo amarelado, de aspecto não muito atrativa. Porém a polpa amarelada, bastante suculenta, crocante, doce e muito firme confere ampla capacidade de conservação. A época de maturação ocorre entre a segunda quinzena de março a primeira de abril (Bernardes & Godoy, 1988).

O aumento na cifra destes dois cultivares repercutiu positivamente, dando oportunidade a industrialização, com o estímulo a comercialização sob a forma de suco e purê (Wosiacki et al., 1992). O fato possibilitou a

ampliação de consumo, tornando-a acessível a todos os níveis sociais (Machuca, 1988; Manica, 1989).

As vantagens da obtenção de suco clarificado são evidentes, já que possibilita a preservação integral das características sensoriais da matéria-prima e conduz a um produto nobre, passível de aceitação no mercado interno, além de permitir exportação para o mercado europeu (Wosiack, 1989).

No processamento de maçãs para produzir suco "in natura" obtém-se rendimento médio de 75% (Machuca, 1988), cujo produto saudável contém açúcares, ácido málico, saponizantes, taninos, pectinas, fibras e proteínas (Beveridge & Harrison, 1986). Em contrapartida, enfatiza-se que os açúcares representados pela frutose, sacarose e glicose constituem a principal fonte de carbono para o desenvolvimento dos fungos micotoxigênicos (Stott & Bullerman, 1975; Damaglou & Campbell, 1985).

O bagaço resultante da extração de suco é utilizado para o preparo de ração animal, assim como matéria-prima para fabricação de alimentos dietéticos, por conter alta concentração de pectinas (Ushirozawa, 1978). A substância caracteriza-se por ácidos poligalacturônicos, contendo uma proporção mínima de ligações ésteres com o grupo metila, que apresentando propriedades coloidais reversíveis, formam géis com açúcar e ácido, cumprindo um papel fundamental na preparação de doces (Berasain, 1986).

5. FUNGOS EM MAÇÃ

Considerando que tanto o suco como bagaço de maçã sejam excelentes fontes nutricionais, a industrialização requer controle de qualidade na matéria-prima, com ênfase a fatores microbiológicos, capazes de influir na sanidade dos produtos obtidos (Ware et al., 1974; Brackett & Marth, 1979-a; Taniwaki et al., 1989).

A literatura, salientando que os fungos causam 80% das doenças em plantas, já é um indicativo do elevado nível de microbiota fúngica na superfície vegetal (Uboldi Eiroa, 1989). Soma-se a isto, capacidade produtora de grande número de metabólitos secundários, incluindo-se o potencial toxigênico (Wyllie, 1993).

Vários agentes fúngicos causam doenças da maçã no campo, não se devendo subestimar a possibilidade de efeito micotoxigênico de metabólitos liberados pelos fitopatógenos, também a humanos (Brackett & Marth, 1979; Hirooka et al., 1996). *Venturia inaequalis* Cooke é responsável pela principal doença de disseminação cosmopolita, a sarna da macieira, cujo processo patológico resulta no desfolhamento prematuro, depauperamento progressivo e um fraco desenvolvimento das gemas frutíferas (Bleicher et al., 1985). A podridão parda, causada por *Monilia fructicola* Honey, é uma doença bastante comum em macieiras, responsável por sérios prejuízos econômicos. A podridão amarga, devido a *Glomerella cingulata* Stonem resulta numa mancha marrom, que ataca o fruto através de regiões afetadas por fendas, queimaduras e

ferimentos (Bleicher et al., 1985). Já a podridão interna do fruto tem como principal via de entrada a cálice, causando deterioração central do fruto, próxima as sementes (Ushirozawa, 1978). O resultado é a queda dos frutos no campo e podridões durante a armazenagem. Os envolvidos são *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp. (Barradas & Koller, 1976; Ushirozawa, 1978), com ênfase a *P. expansum*, o patógeno de destaque em maçãs, a nível cosmopolita (Fallik et al., 1990; Sanderson & Spotts, 1995).

Em vista ao longo período de armazenagem da maçã a baixas temperaturas, torna-se crucial os cuidados necessários para controlar a podridão (Taniwaki et al., 1989). Já é de conhecimento que o principal substrato para a produção de patulina pelas diferentes espécies fúngicas é, sem dúvida, a maçã (Stott & Bullerman, 1975; Frisvald & Filtenborg, 1988; Sanderson & Spotts, 1995).

Vários fatores são responsáveis pelo crescimento e produção de toxina por *P. expansum*, com ênfase a atividade de água em torno de 0.95 e temperatura ideal na faixa de 20 a 25°C (Stott & Bullerman, 1975; Northolt et al., 1978; Bullerman, 1984; Roland & Beuchat, 1984). Entretanto, o perigo se estende, já que *P. expansum* produz toxina mesmo em temperaturas de refrigeração (Buchanan et al., 1974; Ross & Hirooka, 1996), fazendo recorrer ao uso de conservantes, que preservam a qualidade dos frutos e produtos derivados (Leitão, 1990).

Dentre os diferentes tipos de conservantes, o ácido sórbico, sulfitos e benzoatos são empregados para garantir a segurança dos produtos de maçã, cuja designação depende do método de processamento e armazenagem (Leitão, 1990; Hoffman, 1995).

O ácido sórbico e derivados, representados pelo sorbato de potássio, é recomendado para sucos e bebidas no controle de fungos e leveduras, porém pouco eficientes para bactérias (Roland et al., 1984).

No Brasil, o ácido benzóico e derivados são mais utilizados, sendo permitidos em vinte e quatro tipos de alimentos industrializados, devido a boa solubilidade e não interferência no sabor e coloração (Brasil, 1980). Todavia, conservantes recomendados para maçã consistem de compostos sulfurados, em particular o metabissulfito, já que além de efeito antimicrobiano, apresenta propriedade detoxificante sobre patulina (Walker et al., 1995; Ross, 1995). Comparando-se o efeito de sorbato e metabissulfito nas concentrações permitidas pela Legislação brasileira, o metabissulfito foi quem mais efetivamente reduziu patulina em suco de maçã a níveis não detectáveis (Ross, 1995).

6. PATULINA

A patulina é uma micotoxina produzida pelos gêneros *Penicillium*, *Byssochlamys*, *Gymnoascus*, *Paelomyces* e *Aspergillus*, estando entre os principais produtores *P. expansum*, *P. patulum*, *P. aspergillus*, *P. novae zelandiae*, *P. melinii*, *P. vanabile*, *P. roqueforti*, *P. citreonigrum*, *P. chrysogenum*, *P. funiculosium*, *P.*

canescens e *P. aurantiogriseum* (Frisvald & Filtenborg, 1988; Steiman et al., 1989). Outras espécies envolvidas incluem *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus* e *Byssochlamys nivea* (Harison, 1989). Salienta-se a importância do *P. expansum*, em vista da frequência com que é detectado não somente na estocagem de maçãs, mas também de pêras, bananas, uvas e cerejas (Scott et al., 1972; Lindroth & Niskanen, 1978; Taniwaki et al., 1989; Burda, 1992).

Embora a patulina tenha sido isolada em 1943 por Birkinshaw et al., a contaminação natural em maçãs foi primeiramente constatada em 1950 (Scott & Somers, 1968; Stott & Bullerman, 1975; Bracke11 & Marth, 1979; Harison, 1987; Burda, 1992).

A patulina consiste de uma α , β lactona insaturada com fórmula molecular $C_7H_6O_4$, estrutura química {4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]pirano-2-(6H)-ona} e massa molecular de 154,12 daltons (Stott & Bullerman, 1975). A molécula pertence a um grupo de substâncias com dupla propriedade, isto é, simultaneidade de atividade tóxica e antimicrobiana (Mayer & Legator, 1969; Pohland et al., 1970), sendo descrita inicialmente como antibiótico, logo após a descoberta da penicilina (Stott & Bullerman, 1975; Seijas et al., 1989). A toxina se caracteriza como um composto sólido branco e cristalino com ponto de fusão em 110,5°C, absorção máxima em 275 nm, solúvel em água e solventes orgânicos polares, representados por acetato de etila, éter e clorofórmio (Rose, 1979).

A atividade biológica da patulina é instável em meio alcalino ou soluções contendo compostos sulfurosos como cisteína, glutatona e tioglicolato com subsequente degradação e detoxificação, porém ocorre o inverso em meio ácido (Stott & Bullerman, 1975; Stinson et al., 1978). A permanência de concentrações apreciáveis de patulina em sucos com baixo teor de grupos sulfidrilas-SH é condizente com esta constatação, sendo mais um motivo de preocupação para a saúde pública (Scott & Sommers, 1968; Ciegler et al., 1976).

Lovett & Peeler (1973) demonstraram, que concentrações entre 100 a 150 μ g/L de patulina em solução tampão resistiram a destruição térmica a 105 a 125°C, em pH 3.5, 4.5 e 5.5. Os autores observaram destruição da toxina em 90%, à medida que acidificavam a solução, obtendo menores níveis em pH 3.5.

Em suco de maçã, Scott & Sommers (1968) verificaram que exposição a 80°C por 10 ou 20 minutos não destruiu a patulina. O fato é intrigante, já que permite a permanência de quantidade significativa da toxina, após o processamento insuficiente de suco.

Todos os relatos comprovando a termoestabilidade da toxina indicam a necessidade de atenção, em especial durante o processamento de maçãs (Prieta et al., 1992). Uma redução de patulina bastante prática e simples é obtida, procedendo-se controle de qualidade dos frutos destinados ao processamento industrial (Wilson & Nuovo, 1973; Sydenham et al., 1995).

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu 50 μ g/L como sendo concentração máxima permitida para

o suco de maçã (Forbito & Babsicy, 1985; Prieta et al., 1992). Tendências atuais sugerem redução ainda maior no limite, sendo que determinados países adotam níveis de 20 a 30 µg/L, em produtos destinados a alimentação infantil (IUPAC, 1996).

A presença de patulina em maçã e produtos derivados vem sendo motivo de constantes investigações devido a contaminação natural, com relatos atingindo níveis de 10 a 350 µg/L (Brackett & Marth, 1979) e Ware et al. (1974) com níveis de 44 a 309 µg/L em suco de maçã. A incidência foi ainda maior em sucos caseiros, com algumas amostras excedendo 1000 mg/L de patulina (Lindroth & Niskanen, 1978). As cidras também não são isentas de contaminação, já que Wilson & Nuovo (1973) detectaram níveis de até 45mg/L.

No Canadá, os estudos realizados com maçãs naturalmente deterioradas constataram alta incidência de *P. expansum*, sendo que a patulina esteve presente em 46% das amostras (Harwig et al., 1973). Tendo em vista que os frutos eram mantidos sem refrigeração, os resultados claramente indicam que, métodos inadequados de conservação aceleram a produção de patulina. O mesmo ocorreu com amostras de suco de maçã analisadas em Victoria, Austrália, onde 65% das amostras apresentavam-se contaminadas por patulina (Watkins et al., 1990).

No Brasil, não se encontram dados suficientes a respeito de contaminação de patulina em produtos derivados de maçã, visto que há pouco tempo nossa Legislação está sendo reformulada, no que diz respeito a quantidades de toxina permitidas (Machinski, 1994). Entretanto, seja cultivar Gala ou Fuji, propiciaram condições nutricionais adequadas para a produção de patulina, com possibilidade da existência de vários *Penicillium* spp., melhor adaptados ao clima tropical (Ross, 1995).

Em consideração a estabilidade de patulina frente ao processo industrial normal, é importante a inclusão de aditivos detoxificadores no ingrediente dos derivados de maçã. A efetividade de metabissulfito já é um fato comprovado (Ross, 1995), porém estudos mencionam outras alternativas, que eventualmente poderiam funcionar no controle de patulina.

Brackett & Marth (1979b) reportaram o desaparecimento de patulina, após três semanas de estocagem, adicionando-se 2 a 5% de ácido ascórbico em suco de maçã contaminado com 500µg/L de toxina. A velocidade de detoxificação aumentou proporcionalmente a concentração de vitamina C, indicando que determinados componentes alimentares reduziram a quantidade de patulina, devido a reação com grupos sulfidrilas.

Outro processo capaz de eliminar a patulina, bastante promissor seria a detoxificação biológica, com ênfase a microbiota presente na própria maçã (Ross, 1995; Walker et al., 1995). Consequentemente, o possível efeito degradador observado por leveduras contaminantes é interessante, já que desconhece-se linhagens micotoxigênicas entre estes fungos unicelulares (Walker et al., 1995).

Harwig et al. (1973) eliminaram a patulina em suco de maçã, submetido a fermentação de duas semanas por *Saccharomyces* spp. Burroughs (1977) demonstrou que as leveduras destinadas a fabricação de cidras, eficientemente removeram a patulina. Janisiewicz (1996) obteve resultados promissores, investigando ação de duas bactérias antagonistas a *P. expansum*.

7. BIOSÍNTESE DE PATULINA

A patulina é um metabólito secundário sintetizado pela via dos policetidas, cujo processo elimina quatro moléculas de acetil CoA por condensação, que eventualmente ocorrem em excesso intracelular, no estágio idiofase de crescimento.

As diversas espécies de fungos utilizam a frutose, glicose, sacarose e ácido málico como fontes de carbono e produzem Acetil e Malonil-CoA, destinados a biossíntese da patulina (Wyllie, 1993). A via metabólica empregando 6-metil-salicílico, foi elucidada por Bu'lock & Ryan (1969), utilizando glucose marcada com carbono 14, sendo a rota confirmada por Forrester & Gaucher em 1972 (Stott e Bullerman, 1975; Seijas, 1989). Na síntese da patulina, uma molécula de Acetil-CoA combina com três Malonil-CoA, que sofrem reação de redução e descarboxilação, resultando em 6MS. Após o processo de descarboxilação e oxidação, a molécula de 6MS é convertida em m-OH-benzaldeído, que após um rearranjo, resultam numa molécula de patulina (Stott & Bullerman, 1975).

8. TOXICIDADE DA PATULINA

Embora a patulina exerça excelente atividade antimicrobiana de amplo espectro, que atua nas mais variadas categorias taxonômicas (Lee & Rösenthaller, 1986), a alta toxicidade, confirmada em diversos sistemas biológicos veda a comercialização (Steiman et al., 1989).

A toxicidade aguda de patulina "in vitro" tem sido demonstrada nos leucócitos, cultura de fibroblastos e células cardíacas. A dose letal-DL50 varia de 15 a 50 mg/Kg, conforme via de administração e animal empregado para o ensaio (Wyllie, 1993). Por outro lado, a necessidade de DL50 relativamente alta descarta a possibilidade de intoxicações agudas, tendo o alimento naturalmente contaminado como veículo (Machinski, 1994).

Em testes de administração artificial, dentre os efeitos tóxicos agudos causados pela patulina em animais de experimento, destaca-se pulmões edematosos com processos hemorrágicos, além de danos nos capilares hepáticos e baço (Moulé & Hatey, 1977; Wyllie, 1993).

A nível molecular, a patulina inibe a respiração aeróbica, afeta a permeabilidade das membranas e reduz a atividade da adenosina trifosfatase (Garza et al., 1977; Hatey & Gaye, 1978; Miura, 1992). A toxina

também inibe a divisão celular, nuclear, ou ambas em bactéria (Mayer & Legator, 1969; Damaglou et al., 1985), sendo que inibe a mitose, com perda de cromossomos em embrião de aves (Mayer & Legator, 1969). Em cultura de leucócitos humanos, a patulina causou alta incidência de células poliplóides (Myer & Legator, 1969; Wyllie, 1993).

A patulina apresenta atividade teratogênica, causando má formação de patas e bicos em aves (Ciegler et al., 1976). Smith et al. (1993) demonstraram que elevada concentração de patulina, próximas às doses letais, aumentam a frequência de má formação em embrião de rato. Em humanos, a administração oral de patulina causou náusea e irritação estomacal, assim como a aplicação tópica de pomada em concentração de 1% resultou em edema local (Wyllie, 1993).

Detecção de patulina

A literatura descreve três técnicas cromatográficas para a análise de patulina, isto é, cromatografia em camada delgada-CCD, cromatografia líquida de alto desempenho-CLAE e cromatografia gasosa-CG, para maçã e produtos derivados (Wyllie, 1993).

A técnica de camada delgada foi adotada pela "Association of Official Analytical Chemists"-AOAC, como método oficial em 1974 e vem sendo utilizada até o momento na rotina laboratorial, por ser uma técnica mais simples e de baixo custo (Machinski, 1994).

Scott et al. (1970) confirmaram a extensão de sua aplicação num estudo colaborativo, elegendo-a como método mais difundido para a determinação de patulina em suco de maçã. O método, recomendado pela AOAC, inicia-se com partição em acetato de etila, seguido de clarificação em coluna cromatográfica. Submetendo o extrato obtido a CCD e revelação com

MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazina), a metodologia apresenta limite de detecção na faixa de 20 µg/L (Scott & Somers, 1968; Gimeno, 1979).

Atualmente, o desenvolvimento de CLAE vem atendendo cada vez mais as exigências no controle de qualidade, já que consiste num método de elevada reprodutibilidade, com limite de detecção em torno de 5µg/L (Möller & Josefsson, 1980; Forbito & Babsky, 1985; Rovira et al., 1993; Machinski, 1994). Acar & Goekmen (1995) reduziram ainda mais o limiar de detecção, utilizando extrato de acetato de etila clareado com carbonato de sódio submetida a coluna C₁₈ eluída com água: acetoneitrila (99:1).

Brause et al. (1996) conduziram uma avaliação da CLAE, num trabalho integrando vinte e dois colaboradores em 10 países para determinação de patulina em suco de maçã. Comparando a fase móvel constituída de água, água-tetrahidrofurano ou água-acetoneitrila em 12 amostras de suco, obtiveram reprodutibilidade de 96%, fazendo com que definitivamente a AOAC adotasse CLAE como o método mais moderno e eficiente para a detecção de patulina.

No Brasil, embora as vantagens de CLAE sejam reconhecidas, a maioria dos laboratórios de rotina continuam com a técnica de CCD, devido ao menor custo. No entanto, nota-se necessidade cada vez maior em se adotar técnicas com melhor eficiência, visto que os importadores de frutas são países conscientes sobre os perigos da produção de micotoxinas.

Visto que a produção nacional de maçãs sofreu um acentuado aumento nos últimos anos, a frequência de *Penicillium* spp. nos alerta para necessidade de melhor controle sobre micotoxinas de espécies tropicais, com característica de psicrotróficos. O constante risco da ingestão de patulina provém de condições inadequadas de armazenagem das frutas, que não impedem a proliferação dos fungos.

ROSS-URBANO, G.; HIROOKA, E. Y. Profile of patulin production risk in apple. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.20, n.1, p. 79-86, mar. 1999.

ABSTRACT: Apple (*Malus domestica* Borkhausen) is a worldwide fruit consumed as fresh or processed food, with an opportunity of Brazil to access the international marketing. In consideration to the new profile of this fruit, a revision was developed to appoint about the importance of patulin, the most frequent mycotoxin in apple, to minimize eventual problems emerged with its commercialization.

KEY WORDS: apple, patulin, *Penicillium* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAR, J.; GOEKMEN, V. Determination of patulin in apple juices - a rapid HPLC method. *Fluessiges-Obst*, v.62, p.8, p.368-370, 1995.
- BARRADAS, J.O.; KOLLER, F. A cultura da macieira e pereira. Porto Alegre, R.S., 1976, 90p.
- BERASAIN, J.M. Aproveitamento industrial dos refugos de produção de maçã. *Boletim do CEPPA*, Curitiba, v.4, n.2, p.08-24, 1986.
- BERNARDES, L. M.; GODOY, H. A cultura da macieira no Paraná. *Circular IAPAR*, Londrina, n.50, p.112, 1988.
- BEVERIDGE, T.; FRANZ, K.; HARRISON, J.E. Clarified natural apple juice: production and storage stability of juice and concentrate. *Journal of Food Science*, v.51, n.2, p.411-414, 1986.
- BLEICHER, A.F. et al. *Manual da cultura da macieira*. EMPASC, Florianópolis, S.C., 1984.
- BRACKEN, R.E.; MARTH, E.H. A Research Note: Patulin in apple juice from Roadside in Wisconsin. *Journal of Food Protection*, v.42, n.11, p.862-863, 1979.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. *Programa Nacional de Produção e Abastecimento de Maçã*. (1980-1984j). Brasília, 1980. 21p.
- BRAUSE, A..R.; TRUCKSESS, M.W.; THOMAS, F.S.; PAGE, S.W. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.79, n.2, p.451-455, 1996.
- BUCHANAN, J.R.; SOMMER, N.F.; FORTLAGE, R.J. Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology*, v.28, n.3, p.589-593, 1974.
- LERMAN, L.B. Effects of potassium sorbate on growth and patulin production by *Penicillium patulum* and *Penicillium roqueforti*. *Journal of Food Protection*, v.47, n.4, p.312-316, 1984.
- BURDA, K. A Research Note: Incidence of patulin in apple, pear and mixed fruit - Products marketed in New South Wales. *Journal of Food Protection*, v.55, n.10, p.796-798, 1992.
- CIEGLER, A.; BECICWITH, A.C.; JACKSON, L.K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.31, n.5, p.664-67, 1976.
- DAMAGLOU, A.P.; CAMPBELL, D.S. The effect of pH on the production of patulin in apple juice. *Letters in Applied Microbiology*, n.2, p.09-11, 1986.
- FALLIK, E.; GRINBERG, S.; GAMBOURG, M.; KLEIN, J. D.; LURIE, S. Pre-storage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. *Plant-Pathology*, v.45, n.1, p.92-97, 1996.
- FONTOURA, P.S.G.; FREITAS, R.J.S. Contribuição na seleção de variedades de maçã para a produção de suco. *Boletim CEPPA*, v.11, n.1, p.27-32, 1993.
- FORBITO, P. R.; BABSKY, N. E. Rapid liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *Journal of the AOAC*, v.68, n.5, p.950-951, 1985.
- FRISVALD, J.C.; FILTEMBORG, O. Specific mycotoxin producing *Penicillium* and *Aspergillus* mycoflora of different foods. *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier, p.163-166, 1988.
- FUNDAÇÃO CARGILL, Relatório Anual, 1983.
- GARZA, H.C.; SWASON, B.G.; BRANEN, A.L. Toxicological study of patulin in monkeys. *Journal of Food Science*, v.42, n.5, p.1229-1231, 1977.
- GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxin, ochratoxin, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T2-toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *Journal of the AOAC*, v.62, n.3, p.579-585, 1979.
- GOLDBLATT, L.A. Mycotoxins - Past, present and future. *Journal American Oil Chemists' Society*, v.54, p.302a-310a, 1977.
- HARISON, M.A. Presence and stability of patulin in apple product: A Review. *Journal of Food Safety*, v.9, p.147-153, 1989.
- HARWIG, J.; CHEN, Y.K.; KENNEDY, B.P.C.; SCOTT, P.M. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. *Journal Canadian Institute Food Science Technology*, v.6, n.1, p.22-25, 1973.
- HATEY, F.; GAYE, P. Inhibition of translation in reticulocyte lysate by the mycotoxin patulin. *FEBS Letters*, v.95, n.2, p.252-256, 1978.
- HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Addit. Contaminants*, v.13, p.173-183, 1996.
- IUPAC-IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Rome, 1996. p. 27-31.
- HOFFMAN, F. L. *Ocorrência de leveduras numa planta de processamento de refrigerantes de pequeno porte*. Rio Claro: UNESP, 1995. Tese (Doutorado) - UNESP.
- JANISIEWICZ, W. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology*, v.86, n.5, p. 473-479, 1996.
- JELINEK, C.F.; PHOLAND, A.E.; WOOD, E.E. Worldwide occurrence of mycotoxins on foods and feeds-an update. *Journal of the AOAC*, Washington, v.72, n.2, p.223-230, 1989.
- KORBAN, S. S.; SKIRVIN, R.M. Nomenclature of the cultivated apple. Hort Science. In: *Manual da cultura da macieira* EMPASC-Florianópolis, v.19, n.2, p.177-180, 1984.
- LACEY, J. Factors affecting mycotoxin production. In: STEYN, P.S.; VLEGGARR. *Mycotoxins and Phycotoxins*. [S.l.]: Elsevier, 1986. p.64-75.
- LEE, K.; ROSCHENTHALER, R. J. DNA-Damaging activity of patulin in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, n.5, p.1046-1054, 1986.
- LEITAO, M.F.F. Conservadores em alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microrganismos. *Coletânea do ITAL*, v.20, n. 9, p.116-127, 1990.
- LINDROTH, S.; NISKANEM, A. Comparison of potential patulin hazard in home made and commercial apple products. *Journal of Food Science*, v.43, p.446-448, 1978.
- LOVETT, J.; PEELER, J.T. A Research Note: Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. *Journal of Food Science*, v.38, p.1094-1095, 1973.
- MACHINSKI, M.J. *Métodos Analíticos para a determinação de patulina em suco de maçã*. São Paulo, 1994. Tese (Mestrado) - USP.

- MACHUCA, M.N. *Aspectos gerais da cultura de macieira no estado de Aomori-Japão*. Florianópolis, 1988, 90p.
- MANICA, I. *O pomar doméstico*. São Paulo: Globo, 1989. 157p. (Coleção do Agricultor-Frutas)
- MAYER, V.W.; LEGATOR, M.S. Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin. *Journal Agricultural Food Chemists*, v.17, n.3, p.454-456, 1969.
- MIURA, S.; HASUMI, K.; ENDO, A. Inhibition of protein prenylation by patulin. *FEBS Letters*, v.318, n.1, p.88-90, 1993.
- MOLLER, T.E.; JOSEFSSON, E. Rapid high pressure liquid chromatographic of patulin in apple juice. *Journal of the AOAC*, v.63, n.5, p.1055-1056, 1980.
- MOULE, Y.; HATEY, F. Mechanism of the in vitro inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from *B. nivea*. *FEBS Letters*, v.74, n.1, p.121-125, feb, 1977.
- NORTHOLT, M D.; VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, v.41, n.11, p.885-890, nov, 1978.
- PICCI, G. Le Micotossine. Aspectti microbiologic) e tossicologici. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, v.42, n.1, p.35-47, 1992.
- PHOLAND, A.E.; ALLEN, R. Analysis and chemical confirmation of patulin in grains. *Journal the AOAC*, v.53, n.4, p.686-687, 1970.
- PRIETA, J.; MORENO, M.A.; BLANCO, J.L. et al. Determination of patulin by diphasic dialysis extraction and thin layer chromatography. *Journal of Food Protection*, v.55, n.2, p.1001-1002, 1992.
- ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R. Biomass and patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice affected by sorbate benzoate, SO₂ and temperature. *Journal of Food Science*, v.49, p.402-406, 1984.
- ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON, R.E. et al. Effects of sorbate, benzoate, sulfur dioxide and temperature on growth and patulin production by *Byssochlamys nivea* in grape juice. *Journal of Food Protection*, v.47, n.3, p.237-21, 1984.
- ROSE, A.H. Secondary products of metabolism. In: ECONOMIC Microbiology. [S. l.]: Academic Press, 1979. v.3, p.507-509.
- ROSS, G. Patulina: Parâmetros que influem na produção, detoxicação e considerações sobre microbiota fúngica em maçã (*Malus domestica* Borkhausen). Londrina, 1995. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina.
- ROSS, G.; HIROOKA, E.Y. Patulin: factors affecting production and risk of contamination through consume of apple (*Malus domestica* B) cultivar Gala and Fuji. In: IX INTERNATIONAL IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Rome, 1996. p.296.
- ROVIRA, R.; RIBERA, F.; SANCHIS, V.; CANELA, R. Improvements in the quantitation of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography. *Journal Agricultural Food Chemists*, v.41, n.2, p.214--216, 1993.
- SANDERSON, P.G.; SPOTTS, R.A. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopatology*, v. 85, n.1, p.103-110, 1995.
- SEIJAS, J.A.; VASQUEZ, P.T.; ESTEVEZ, R.; CASTEDO, L. et al. New total synthesis of patulin. *Heterocycles*, v.29, n.1, p.181-184, 1989.
- SCOTT, P.M.; LAWRENCE, J.W.; Van WALBEER, W. Detection of mycotoxins by thin layer chromatography: application to screening of fungal extracts. *Applied Microbiology*, v.20, n.5, p.839-842, 1970.
- SCOTT, P.M. & SOMERS, E. Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.16, n.3, p.483--485, 1968.
- SEAB. Relatório da Secretaria do Abastecimento do Paraná. [Curitiba], 1993/1994. p.131-137.
- SMITH, E. E. ; DUFFUS, E.A. ; SMALL, M. H. Effects of patulin on post-implantation rat embryos. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, v.25, p.267-270, 1993.
- STEIMAN, R.; EIGLE, M.L.S.; KRIVOBOK, S. Production of patulin by Micromycetes. *Mycopathologia*, v.105, p.129-133, 1989.
- STINSON, E.E. et al. Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Applied Environmental Microbiology*, v.36, n.4, p.620-622, 1978.
- STOTT, W.T.; BULLERMAN, L. B. Influence of carbohydrate and nitrogen source on patulin production by *P. patulum*. *Applied Microbiology*, v.30, n.5, p.850-854, 1975.
- SYDENHAM, E.W.; VISMER, H.F.; MARASAS, W.F.O. et al. Reduction of patulin in apple juice samples - influence of initial processing. *Food-Control*, v.6, n.4, p.195-200, 1995.
- TANIWAKI, M.H.; BLEINROTH, E.W.; MARTIN, Z.J. Bolestes produtores de patulina em maçã e suco industrializado. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v.19, n.1, p.42-49, 1989.
- UBOLDI EIROA, M.N. Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.3;4, p.141-160, 1989.
- USHIROZAWA, K. *Cultura da maçã - a experiência Catarinense*. Florianópolis: EMPASC, 1978, 295p.
- UKAI, T.; SMITH, E. E.; DUFFUS, E.A.; SMALL, M. H. Effects of patulin on post-implantation rat embryos. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, v.25, p.267-270, 1993.
- WALKER, G.M.; McLEOD, A. H.; HODGSON, V.J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, v.127, p.213--222, 1995.
- WARE, G.M.; THORPE, C.W.; POHLAND, A.E. Liquid chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *Journal of the AOAC*, v.57, n.5, p.1111-1113, 1974.
- WATKINS, K.L.; FAZERAS, G.; PALMER, M.V. Patulin in Australian apple juice. *Food Australia*, v.42, n.9, p.438-439, 1990.
- WOSIACKI, G. Suco clarificado. *Revista Toda Fruta*, São Paulo, v.39, out. 1989.
- WOSIACKI, G.; CHIQUETTO, N.C.; KIRCHNER, C. L. Avaliação do uso da maçã nacional (*Malus domestica*) para fins industriais. Parte II -Características de qualidade de sucos clarificados de cinco variedades: Anna, Gala, Ohio Beauty, Pome-3 e Rainha, colhidas na safra 1989/90. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.12, n.2, p.160-173, 1992.
- WYLLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. *Mycotoxic fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*. An Encyclopedic Handbook. Washington, 1994. v.1, p.304-310.