OCORRÊNCIA DE PATULINA EM PRODUTOS DE MAÇA

(*Pirus malus* L.)

JOSÉ AFONSO LEIRIÃO

Nutricionista

Orientador: Prof. Dr. HOMERO FONSECA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos.

P I R A C I E A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1989

OCORRÊNCIA DE PATULINA EM PRODUTOS DE MAÇÃ

(*Pirus malus* L.)

JOSÉ AFONSO LEIRIÃO

Aprovada em: 25/04/89

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Homero Fonseca (ORIENTADOR) - ESALQ.

Prof. Dr. João Nunes Nogueira - ESALQ.

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso - ESALQ.

Prof. Dr. HOMERO FONSECA
Orientador

Aos meus Pais,

BRENO e ELOCILDES

À minha esposa

VERA HELENA

Ao meu filho

JOSÉ AFONSO

DEDICO

Ao Prof. Dr. HOMERO FONSECA, responsável pela orientação do meu mestrado, minha gratidão pela honestidade de propósitos, atenção e paciência, servindo de exemplo como autêntico mestre.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Sagrado Coração - Bauru, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado em Agronomia. Área de concentração: Tecnologia de Alimentos.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Rural, pelos ensinamentos, amizade e atenção dispensados.

Ao Programa de Incentivo à Capacitação de Docente PICD - MEC, pela bolsa de estudo concedida no decorrer do curso de mestrado.

Ao CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO - CNPFCT-RS - pelo fornecimento do material.

À equipe de biblioteca do Departamento de Tecnologia Rural pela atenção dispensada durante o mestrado.

Aos Colegas do curso de Pós-graduação pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural pela colaboração dispensada.

À técnica do Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Tecnologia Rural, Ivani Valarini pelo auxílio prestado.

À Eng.^a Agr.^a Maria Antonia Calori Domingues pelo apoio, durante a fase experimental.

À Sr.^a Isabel Gonçalves pelo carinho e atenção a mim dispensados.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1. Considerações Gerais.....	04
2.2. Características Físico-Química.....	06
2.3. Substrato e Toxicologia.....	07
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Material.....	15
3.2. Métodos.....	16
3.2.1 - Coleta das Amostras.....	16

3.2.2. Determinação da Patulina.....	17
3.2.2.1. Extração da Patulina.....	17
3.2.2.2. Purificação do Extrato por Cromatografia em Coluna.....	18
3.2.2.3. Cromatografia em Camada Delgada.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÕES.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
1 Fôrmla Estrutural da Patulina.....	06
2 Esquema da Placa Bidimensional.....	22

LISTA DE TABELAS*Página*

1. Ocorrência de patulina em suco de maçã..... 11
2. Ocorrência de patulina em produtos comerciais industrializados de maçã da região de Vacaria, R.S. enviadas pelo CNPFCT - EMBRAPA de Pelotas R.S., no período de abril a dezembro de 1988..... 24
3. Ocorrência de patulina nas amostras de suco de maçã elaborados com maçãs sadias e podres das cultivares FUJI e GOLDEN DELICIOUS, fornecidas pelo CNPFCT - EMBRAPA, Pelotas - R.S..... 27

OCORRÊNCIA DE PATULINA EM PRODUTOS DE MAÇÃ

(*Pirus malus* L.)

Autor: JOSÉ AFONSO LEIRIÃO

Orientador: PROF. DR. HOMERO FONSECA

RESUMO

Neste trabalho foi determinada a ocorrência de patulina em 68 amostras de produtos de maçã. As amostras foram fornecidas pelo CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO, da EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA de Pelotas, Rio Grande do Sul e foram coletadas nos meses de abril a dezembro de 1988 na região de Vacaria, daquele estado. A determinação da patulina foi efetuada por cromatografia em camada delgada.

Dos resultados pode-se concluir que: 1) em 100% das amostras de produtos de maçã, encontradas no comércio da região de Vacaria - R.S., não foi detectada a patulina; 2) todas as amostras de suco elaboradas com maçãs deterioradas por ataques fúngicos apresentavam-se contami-

nadas com patulina; 3) hã evidências de que a indústria está utilizando maçãs sadias para o processamento.

PATULIN OCCURRENCE IN APPLE PRODUCTS

(*Pírus malus* L.)

Author: JOSÉ AFONSO LEIRIÃO

Adviser: PROF. DR. HOMERO FONSECA

SUMMARY

In the present work the occurrence of patulin in 68 samples of apple products was determined. The samples were provided by the CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO, at the EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA from Pelotas, Rio Grande do Sul, and they were collected from April to December 1988. The determination of patulin was performed by thin layer chromatography.

From the results the following main conclusions could be drawn: 1) in 100% of the samples of apple products found in the commerce of the region of Vacaria, R.S., in the period from April to December the patulin has not been detected; 2) all the samples of juice obtained from apples deteriorated by fungi were contaminated with patulin; 3) there is evidence that food industries are using sound apples for processing.

1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são compostos químicos tóxicos produzidos por certas linhagens de um grande número de espécies de fungos, como produto do seu metabolismo secundário, quando eles crescem, sob condições favoráveis, sobre uma grande variedade de substratos. Como seu nome genérico implica, esses compostos são tóxicos ao homem causando doenças com os mais variados efeitos.

Embora um exame de literatura revele que a existência de micotoxinas seja conhecida há séculos, não foi senão a partir de 1960; quando STEVENS et alii (1960), MANN (1960), SMITH (1960), dentre outros, verificaram a morte de muitos peruzinhos ocasionada pela ingestão de ração contaminada por aflatoxinas, que estes compostos atraíram a atenção de considerável parcela da comunidade científica.

De acordo com o órgão atacado, e com suas manifestações patológicas, elas são conhecidas como carcinógenos, hepatotoxinas, tremorgenos, neurotoxinas etc. Hoje sabe-se que mais de 300 espécies de fungos podem produzir algum tipo de toxina FONSECA (1984). Dentre estas está a patulina que é produzida por várias espécies de fungos (DAVIS & DIENER, 1978).

A patulina é uma lactona carcinogênica encontrada com frequência no suco de maçã, sendo um metabólito produzido por espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*. (FONSECA, 1984).

O *Penicillium expansum* é um importante patógeno de maçã armazenada e a produção de patulina está associada à podridão mole da maçã provocada por este fungo. Vários outros fungos podem produzi-la, tais como: *Penicillium urticae*, *P. milnie*, *P. cyclopium*, *Aspergillus clavatus*, *A. Terreus*, *Byssochlamys nivea* (NORSTADT & McCALLA 1969; CIEGLER 1977; RICE et alii, 1977).

Estudos toxicológicos com animais de laboratório mostraram que a patulina ataca o sistema nervoso, pode provocar hemorragia cerebral, edema pulmonar, convulsões e morte CIEGLER (1977), BECI et alii (1981).

Sabe-se que, no Brasil, a grande produção de maçã nos estados do sul, notadamente Santa Catarina e Rio Grande do Sul, levaram à industrialização dos frutos

excedentes e dos rejeitados para o consumo "in natura".

O armazenamento da maçã, para posterior industrialização, tem dado margem ao ataque de fungos, tais como: *P. expansum*, *Alternaria alternata*, *Glomorela cingulata* e *Colletotrichum* ssp., já identificados pelo CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO (CNPFC - RS), de Pelotas, Rio Grande do Sul, e cujos frutos estão sendo utilizados na produção de suco, geléia e purê.

Não tendo sido encontrados na literatura relatos de levantamento ou monitorações, em nosso país, da ocorrência da patulina em maçãs e seus produtos industrializados e levando-se em conta que foi observada uma crescente demanda no consumo de frutas não próprias ao consumo "in natura", foi-nos proposta esta pesquisa pelo CNPFC-RS, para avaliar até que ponto, os produtos industrializados estão contaminados com patulina.

Com base nestes antecedentes, este trabalho apresenta o seguinte objetivo:

1. verificar a presença de patulina em produtos industrializados de maçã oriundos do Estado do Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Considerações Gerais

As micotoxinas são encontradas numa vasta gama de gêneros alimentícios. Estes metabólicos tóxicos provocam nos animais uma série de distúrbios patológicos que podem levar à morte dos mesmos.

Levando-se em conta que grande parte dos alimentos contaminados são também consumidos pelo homem, não podemos deixar de acreditar que também nos seres humanos essas toxinas possam acarretar transtornos à saúde.

Dentre as muitas toxinas hoje conhecidas, apenas algumas têm sido efetivamente estudadas, notadamente aquelas que acarretam maiores problemas à saúde. A patulina já é conhecida desde 1942 quando CHAIN et alii (1942) isolaram de uma cultura de *Penicillium claviforme*, um composto cristalino que recebeu inicialmente o nome de claviformi-

na. Posteriormente verificou-se que muitas linhagens de fungos produziam substâncias idênticas à claviformina, recebendo, deste modo, muitos nomes tais como: clavatina, expansina, mycoin C₃, penicidina, patulina, clavacina, dovacina, entre outros, conforme afirmam, ABRAHAM & FLOREY (1942) e SCOTT (1977).

Dentre as linhagens produtoras de patulina SCOTT (1977), cita *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *A. giganteus*, *Bissochlamys fulva*, e *B. nivea*. Já ENGEL & TEUBER (1984) citam *Paecilomyces variotii*, *Penicillium patulum*, *P. urticae*, *P. griseofulvum*. TORRES et alii (1986) citam *Penicillium expansum*, *P. leucopus* e *P. claviforme*. Segundo ENGEL & TEUBER (1984) os strains de *P. patulum* e *P. urticae* foram considerados variedades do *P. griseofulvum*.

Segundo afirmam ROLAND & BEUCHAT (1984) a produção de patulina pelos fungos está na dependência da atividade de água e da temperatura. Assim sendo, em condições adequadas de temperatura e umidade, o fungo se desenvolve mais rapidamente e produzirá uma maior quantidade de toxinas. Segundo ROLAND et alii (1984) em trabalhos de revisão bibliográfica parece haver concordância que em temperaturas ao redor de 21°C a produção desta toxina é maior do que a 30 - 37°C.

2.2 - Características Físico-Químicas

Segundo FRAYSSINET (1984) a patulina é uma substância neutra, solúvel em água, álcoois, acetona, acetato de etila e clorofórmio, menos solúvel em éter e benzeno e insolúvel em éter de petróleo. Absorve luz ultra-violeta com um máximo de 377 nm, sendo suficientemente estável ao calor para resistir aos processos tecnológicos usuais.

Segundo CIEGLER (1977) a patulina é um derivado da pirona, especificamente do 4 - hidroxí - 4H - furo [3-2-C] pirano 2 - lactona, apresentando fórmula empírica $C_7H_6O_4$ e peso molecular (PM) - 154 unidades de massa atômica (u.m.a), ponto de ebulição de 110°C e estrutura conforme Figura 1.

FIGURA 1 - Fórmula Estrutural da Patulina.

Segundo POHLAND & ALLEN (1970) a patulina é instável na presença de álcalis, sendo que em água destilada alguma decomposição ocorreu, estando esta em temperatura ambiente com a solução mostrando-se ligeiramente amarelada e tornando-se ácida após alguns dias.

Segundo ESCOULA (1974) e FRAYSSINET (1984) a patulina é estável em suco de maçãs, porém, não em sucos de laranja ou sucos ácidos como limão ou "grape fruit", entretanto o uso de dióxido de enxofre, como preservativo destes, promove uma rápida degradação da patulina.

A resultados semelhantes chegaram ROLAND et alii (1984), quando observaram que o dióxido de enxofre mostrou ser mais eficiente na redução da biomassa fúngica e da produção de patulina, que outros agentes inibidores tais como o sorbato de potássio e o benzoato de sódio.

STOTT & BULLERMAN (1976) afirmam que a patulina reage com moléculas portadoras de grupamentos (SH)⁻ sulfidretos, tais como, cisteínas, proteínas, enzimas e coenzimas, nas quais o grupamento SH faz parte do sítio catalítico. Estes compostos de adição constituem um importante meio de destoxificação da patulina.

2.3 - Substrato e Toxicologia

Segundo FRAYSSINET (1984) basicamente 3 ti-

pos de alimentos podem sofrer ataque de fungos produtores de patulina, ou sejam, as frutas, os cereais e os queijos, assim como seus derivados.

Embora podendo ser produzida nos cereais POHLAND & ALLEN (1970) afirmam que ela não é estável nestes produtos durante a estocagem. Estudos realizados por estes pesquisadores e confirmados por ESCOULA (1974) mostraram que a patulina desaparece do milho úmido e que ela decresce fortemente em 8 a 10 dias no sorgo e no trigo, sendo também instável na farinha de trigo. Entretanto, a patulina pode se manter estável no milho seco. ESCOULA (1974) e LAFONT et alii (1979) afirmam ter encontrado nas silagens de milho, colonizadas por *Byssoschlamys nivea*, quantidades que podiam alcançar 40 µg/Kg, sendo que esta quantidade foi detectada no terceiro mês de conservação da silagem, com declínio posterior, podendo haver problemas de toxidez aguda para bovinos que consomem tais silagens e levar a acidentes graves ou, em outros casos, levar à contaminação secundária a nível de leite.

Embora derivados do leite sejam substratos inadequados para a produção de patulina pelas espécies toxigênicas, STOTT & BULLERMAN (1976) verificaram que a presença da patulina decaía com o período de estocagem, levando estes pesquisadores a supor que este decaimento era resultado da reação entre a toxina e grupamentos químicos pre-

sentes no queijo. Parece também que a natureza dos queijos é importante. Assim, os queijos de pasta mole não são atacados e a patulina não é estável no queijo tipo "cheddar".

Muito embora em todos estes substratos tenha sido encontrado patulina, parece haver concordância entre os pesquisadores que é a nível das frutas e derivados que as contaminações são importantes e causam mais problemas. Dentre as frutas cabe à maçã posição de destaque, haja visto que estas são freqüentemente as mais atingidas pelo fungo *P. expansum*, mas podemos encontrar a patulina em outras frutas atacadas como, por exemplo, pêras, pêssegos, abacaxís, uvas, bananas entre outras segundo afirmam DRI-LEAU & BOHUON (1973), WOLLER & MAJERUS (1986).

Torna-se importante ressaltar que o tratamento das maçãs destinadas ao consumo "in natura" difere bastante daquele dispensado às maçãs destinadas à indústria, tal como afirma FRAYSSINET (1984), quando diz que o bom aspecto das frutas destinadas à mesa é um argumento de venda decisivo e evidentemente nestas não há a presença de micotoxinas. Já as destinadas à fabricação de sucos e de sidras são tratadas com grande desleixo, geralmente colhidas ao solo, após o "balanço" eventual das árvores, e estocadas em caixas plásticas, ao relento ou em locais sem nenhuma instalação adequada, o que, fatalmente, acarretará traumas e danos à fruta. Estas frutas, segundo FRANCK (1977), podem

estar fortemente contaminadas e conter até 1 g/Kg de patulina, muito embora a consistência da fruta não permita uma difusão da toxina por toda a fruta, o que recomenda o "trimming" com intuito de eliminar as partes afetadas das frutas destinadas ao processamento.

A contaminação dos sucos de maçãs, que podem ser importantes, depende essencialmente da proporção de frutas avariadas que entram na fabricação de suco, tal como afirmam SCOTT & SOMERS (1968) e SCOTT et alii (1972).

Segundo DRILEAU & BOHUON (1973) foram encontradas contaminações máximas da ordem de 45.000 µg/Kg nos Estados Unidos e valores oscilando entre 100 e 200 µg/Kg são facilmente encontrados na França. SCOTT (1982) relaciona casos de contaminação de sucos de maçã em vários países, conforme Tabela 1 e afirma ser o suco de maçã o principal alimento contaminado.

A fermentação alcóolica destrói a patulina e as sidras não deveriam contê-la, afirmam HARWIG et alii (1973a, 1973b), que realizaram experimentos com suco de maçã fermentada por *Saccharomyces* ssp., verificando que a patulina desaparecia no produto final.

Mas, segundo afirmam JACQUET et alii (1983) as contaminações são freqüentes e podem atingir valores expressivos, resultados de uma fermentação incompleta ou de um acréscimo posterior de suco de maçã não fermentado, para

TABELA 1 - Ocorrência de patulina em suco de maçã.

PAÍS - ANO	Nº DE AMOSTRA ANALISADAS	AMOSTRAS POSITIVAS		CONCENTRAÇÃO
		Nº	%	ug/l
CANADÁ - 1972	12	1	8	1.000
CANADÁ - 1973	8	5	63	20 - 120
U.S.A. - 1974	13	8	62	44 - 309
U.S.A. - 1975	136	50	37	40 - 440
U.S.A. - 1975	100	9	9	20.000 - 45.000
U.S.A. - 1979	11	9	82	10 - 350
SUÉCIA - 1976	66	29	44	2,5 - 27
SUÉCIA - 1979	49	40	82	2 - 73
FINLÂNDIA - 1973	7*	2	29	460 - 1.450
R.D.A. - 1978	274	230	84	20 - >400
R.D.A. - 1979	36	7	19	20 - 300
R.D.A. - 1979	106	42	40	20 - 200

* Suco concentrado de maçã.

FONTE: SCOTT P.M. 1982.

se obter sidras com acentuado sabor de frutas, bem como a débil capacidade de destruir a patulina que certos "strains" de leveduras apresentam.

Segundo ESCOULA (1976) as compotas e confeitos de maçã raramente são contaminados, resultado em grande parte de uma boa seleção dos frutos e também de possível eliminação da patulina no decorrer do cozimento, através de reações com grupamentos sulfidretos (SH)⁻ livres e à possível adição de conservantes.

Parece haver concordância, entre os vários pesquisadores, que a patulina foi inicialmente estudada como um agente quimioterápico com características antibióticas FRAYSSINET (1984), MOREAU (1979), SCOTT (1974), WILSON (1976). Entretanto, depois de muitas triagens infrutíferas com soldados britânicos, notadamente no tratamento do resfriado comum e bronquite, sua toxidez levou-a a ser abandonada (MOREAU, 1979).

Segundo FRAYSSINET (1984) malgrado qualquer resultado positivo encontrado sobre a eficácia terapêutica da patulina, estes não confirmaram os testes preliminares de laboratório e apresentaram muitos efeitos colaterais, tais como irritabilidade gástrica, náuseas, vômitos e edemas de pele o que levou os pesquisadores a catalogarem-na como uma micotoxina.

Segundo VERRET et alii (1964), SCOTT (1974)

CIEGLER (1977); numerosas investigações tem sido realizadas sobre a toxidez da patulina para animais. Entretanto, alguns aspectos ainda são contraditórios, tais como os efeitos sobre o organismo animal e suas propriedades cumulativas.

A patulina é uma das raras toxinas que apresenta efeitos teratogênicos, ao lado da aflatoxina B₁, ocratoxina e rubratoxina, segundo os experimentos conduzidos por CIEGLER et alii (1976), utilizando-se de embriões de galinha. Cerca de 47% destes embriões apresentaram malformações das patas, do bico, exoftalmia e exoencefalia.

De modo idêntico SCOTT (1977) e KURATA (1978), também afirmaram ser a patulina um agente hepatotóxico com propriedades teratogênicas semelhantes a outras micotoxinas.

Todavia, SCOTT (1974), CIEGLER et alii (1976) CIEGLER (1977) e HAYES (1981), afirmaram que embora muitos progressos tenham sido alcançados, ainda não dispomos de dados conclusivos a respeito dos prováveis efeitos tóxicos ou carcinogênicos que a patulina, presente nos sucos de maçã, possa acarretar ao ser humano, muito embora alguns trabalhos cite algumas alterações como náuseas e vômitos atribuídos a ingestão de sucos de maçã.

Segundo LEZI et alii (1981) o perigo apresentado pelas micotoxinas na alimentação humana depende de

muitos fatores, com particular importância à quantidade de toxina presente no alimento e à frequência com que a toxina aparece no alimento.

Para FRAYSSINET (1984) o estudo da patulina e de sua ação deletéria ao organismo humano, deve ser levado a sério, visto que o consumo de fruta "in natura", das geléias, purês e "baby foods", poderá acarretar sérios danos à população consumidora. Acrescenta ainda que na Europa só existe regulamentação para sidras e sucos de maçãs destinados à exportação e que devem obedecer a um limite de 50 µg/l. Todavia, para produtos produzidos dentro dos limites franceses não existe legislação.

Segundo FONSECA* no Brasil não existem dados esclarecedores a respeito da real situação que se encontram o suco de maçã e as sidras, assim como outros produtos industrializados da maçã, quanto à presença de patulina, e nem o país possui uma legislação específica para nortear a tolerância de patulina em alimentos, pois só existe legislação que regula o comércio de alimentos destinados ao consumo humano com relação a aflatoxina.

* FONSECA, H. (ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ - ESALQ/USP). Comunicação Pessoal, 1988.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

Para este trabalho foram coletadas 50 amostras de produtos industrializados de maçã, no ano de 1988, fornecidos pelo CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO - CNPFCT-R.S., conforme indicado abaixo:

9 amostras de 1ℓ de suco

10 amostras de 1Kg de geléia

17 amostras de 1Kg de "schmier" (doce cremoso)

14 amostras de 0,5Kg de perseca (maçã desidratada)

Constam ainda do material 18 frascos (garrafas) de suco de maçã, sendo 3 garrafas para cada tratamento com 750 ml de capacidade, elaborados com frutas dos cultivadores FUJI e GOLDEN DELICIOUS, todos procedentes do Campo Experimental de Vacaria do CNPFT-R.S. Os sucos foram

obtidos com maçãs com forte ataque fúngico predominantemente do gênero *Penicillium* (podres) e maçãs em bom estado (sadias). O estado de podridão das frutas contaminadas avaliadas através de análise visual apresentou aproximadamente, o índice de 80% para o cultivar FUJI e 95% para o cultivar GOLDEN DELICIOUS. Foram processadas separadamente as amostras podres e sadias por cultivar (denominadas amostras 1 e 2 e amostras 3 e 4) e também a mistura de ambas amostras 5/FUJI e GOLDEN DELICIOUS, podres e amostra 6/FUJI e GOLDEN DELICIOUS, sadias).

Na elaboração de todas as amostras observaram-se procedimentos tecnológicos rigorosamente idênticos, na unidade de processamento da EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA em Pelotas - R.S., procedendo-se a adição de antioxidante, ácido ascórbico a 0,6%.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Coleta das Amostras

As amostras foram coletadas quinzenalmente no período de abril a dezembro de 1988, perfazendo um total de 68 amostras e enviadas ao Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Tecnologia Rural - E.S.A.L.Q./USP, Piracicaba - S.P., onde permaneceram refrigeradas até o momento da análise.

3.2.2 - Determinação da Patulina

A extração da patulina do suco de maçã, geléia, "schmier", e perseca, foi efetuada pelo método da AOAC (1984) modificado, seguido de cromatografia em camada delgada em placas de silicagel-G como preconizado por SCOTT & KENNEDY (1973) conforme descrição a seguir.

3.2.2.1 - Extração da Patulina

Imediatamente após a abertura das garrafas de suco, foram retirados 50 ml de suco e transferidos para um funil de separação de 250 ml e a toxina foi extraída três vezes com porções iguais de 50 ml de acetato de etila sob vigorosa agitação e recolhidas as fases superiores. Posteriormente, os extratos combinados foram deixados em repouso por 30 minutos sob sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Após o período de repouso o conteúdo foi transferido para um bēquer e o sulfato de sódio lavado por duas vezes com 25 ml de acetato de etila, que foi adicionado ao extrato. Este extrato foi concentrado até o volume menor que 25 ml em evaporador à vácuo, tipo Rotavapor. Após concentração o volume foi ajustado para 25 ml com acetato de etila, quando necessário e diluído para 100 ml com tolueno.

Das amostras de geléia, "schmier" e perseca foram pesados 50 g, transferidos para um liquidificador e triturados por 5 minutos com 150 ml de acetato de etila,

sendo imediatamente filtrados sob vácuo, e deixados em repouso por 30 minutos sob sulfato de sódio anidro.

As demais etapas seguem os procedimentos idênticos para o suco de maçã.

3.2.2.2 - Purificação do Extrato por Cromatografia em Coluna

a) Preparo da Coluna

Colunas de vidro, medindo 20 mm de diâmetro por 500mm de comprimento, e com torneira na base, foram preparadas colocando-se cerca de 0,70 g de lã de vidro, com a finalidade de servir como base para os demais produtos. A seguir foi adicionado tolueno até completar 2/3 da coluna e esta recebeu, respectivamente, 5 g de sulfato de sódio anidro, 10 g de silicagel com granulação entre 0,05 e 0,20 mm para cromatografia em coluna e 10 g de sulfato de sódio anidro.

b) Purificação da Amostra

Após a montagem da coluna, drena-se o excesso de tolueno. Verte-se o conteúdo total da amostra, preparada conforme o item 3.2.2.1., desprezando-se o eluente da amostra. Elui-se posteriormente a patulina com 200 ml de mistura tolueno: acetato de etila (75:25, v/v) a uma velocidade de 10 ml por minuto.

Recolhe-se em balão de fundo redondo, com capacidade de 250 ml, concentrando o conteúdo em evaporador rotativo tipo Rotavapor, até volume próximo a 2 ml. Transfere-se o resíduo para um frasco apropriado à evaporação sob nitrogênio e evapora-se até secura. Imediatamente após, o conteúdo foi redissolvido com acetato de etila e guardado em frascos tampados em congelador a temperatura média de -180°C , quando a cromatografia em camada delgada não era efetuada em seguida, com a finalidade de evitar a evaporação do solvente.

3.2.2.3 - Cromatografia em Camada Delgada

a) Preparo das Placas

Placas de vidro medindo 100 X 200 mm foram preparadas com camada de 500 μm de silicagel-G para cromatografia em camada delgada, seguindo o método de COOMES & FEUELL (1965) e armazenadas em dessecador contendo sílica-gel indicadora até o momento de serem usadas.

b) Aplicação das amostras e do padrão nas placas.

Nas placas exploratórias foram aplicadas a 20 mm da base, com auxílio de micropipetas (Drummond Micro-caps), alíquotas de 50 μl do extrato de cada amostra e 20 μl do padrão qualitativo de patulina, para efeito comparativo.

A seguir as placas foram colocadas em cubas de vidro fechadas contendo o solvente, tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 90% (5:4:1, v/v/v).

Após o sistema de solventes atingir a altura de 10 cm, acima do local de aplicação das alíquotas, as placas foram removidas e secas com secador.

c) Qualificação das amostras

As placas, após a secagem, foram pulverizadas com solução 0,5% de cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) colocadas em estufa por 15 minutos a uma temperatura de 130°C. Posteriormente as placas foram examinadas sob luz ultravioleta (UV) de 366 nm. Nestas condições, foi observada a presença ou ausência de manchas fluorescentes amarelo-marron em $R_f = 0,5$ e identificando, assim, as amostras que apresentavam patulina, ou com suspeita da presença da patulina.

Em todas amostras suspeitas, e nas de resultado positivo foram efetuadas placas bidimensionais confirmatórias.

d) Confirmação através de placas bidimensionais

A confirmação das amostras suspeitas e positivas foi efetuada em placas de vidro medindo 200 X 200mm preparadas segundo o método de COOMES & FEUILL (1965).

As amostras foram aplicadas com auxílio de micropipetas (Drummond Microcaps). Aliquotas de 50 µl do extrato de cada amostra e 20 µl do padrão qualitativo de patulina para efeito comparativo, tanto na horizontal quanto na vertical, obedecendo rigorosamente o modelo proposto pela AOAC (1984).

A seguir, as placas foram colocadas em cubas de vidro fechadas contendo os solventes tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 90% (5:4:1, v/v/v) até que o sistema de solventes atingiu a altura de 10 cm. As placas foram removidas e secas com secador. Posteriormente, esta mesma placa foi girada 90° e colocada em outro sistema de solventes composto de clorofórmio: acetona (9:1, v/v) até atingir novamente a altura de 10 cm, conforme o esquema a seguir. Figura 2.

Em seguida, foram secas com secador e imediatamente pulverizadas com solução 0,5% de cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH) e colocadas em estufa por 15 minutos a uma temperatura de 130°C. Finalmente as placas foram examinadas sob luz ultravioleta (UV) na faixa de 366 nm de comprimento de onda, para confirmação das amostras duvidosas e positivas.

FIGURA 2 - Esquema da Placa Bidimensional.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de patulina em produtos industrializados de maçã e nas amostras fornecidas pelo CNPFCT - EMBRAPA de Pelotas - R.S., são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Conforme pode-se verificar pela análise da Tabela 2, a totalidade das amostras comerciais de suco de maçã, geléia, "schmier" (doce cremoso) e perseca (maçã desidratada), fornecidas pelo CNPFCT - EMBRAPA, de Pelotas, R.S., não apresentaram a patulina.

Por outro lado, na Tabela 3 pode-se verificar que 50% das amostras analisadas apresentaram a toxina, especificamente as amostras obtidas com maçãs sob forte ataque fúngico, tanto dos cultivares FUJI e GOLDEN DELICIOUS isoladas quanto em combinação.

TABELA 2 - Ocorrência de patulina em produtos comerciais industrializados de maçã da região de Vacaria, R.S. enviadas pelo CNPFCT - EMBRAPA de Pelotas R.S., no período de abril a dezembro de 1988.

PRODUTO	AMOSTRAS ANALISADAS		RESULTADO
	Nº	%	
Suco de Maçã	09	18	ND
Gelêia	10	20	ND
"Schmier" (Doce cremoso)	17	34	ND
Perseca (Maçã desidratada)	14	28	ND
TOTAL DE AMOSTRAS SADIAS	50		

(ND) = Não Detectada.

Dentre os fatores que podem ter contribuído para a ausência de patulina nos produtos industrializados de maçã, a qualidade das frutas enviadas ao processamento deve ter sido o preponderante, haja visto que, a matéria-prima é item fundamental na qualidade do produto obtido e, evidentemente, o processamento correto a que por certo foram submetidos estes produtos.

Segundo SCOTT & SOMERS (1968) e SCOTT et alii (1972), a contaminação dos produtos de maçã está na

razão direta da qualidade da matéria-prima. Por outro lado FRANCK (1977) afirma que devido a fruta apresentar uma boa consistência, fato este, que dificulta a difusão da toxina para o interior da fruta, o que recomenda o "trimming" ou a toalete das frutas, com intuito de eliminar as partes afetadas das frutas a serem industrializadas, evidencia uma prática tecnológica recomendável provavelmente efetuada pelas indústrias processadoras de maçãs.

Entretanto ESCOULA (1974) e FRAYSSINET (1984) verificaram que o uso de preservativos químicos adicionados aos produtos industrializados de maçã, com a finalidade de evitar o crescimento de microrganismos, acabavam por promover uma rápida degradação da patulina.

Nos produtos industrializados de maçã, foram adicionados sorbatos, respeitando-se os limites permitidos pela legislação, conforme exame dos rótulos dos mesmos. ROLAND et alii (1984), observaram, em seus experimentos, que os sorbatos poderiam reduzir a presença de patulina. Todavia, a redução era maior e mais significativa quando estes sais eram substituídos por dióxido de enxofre.

Segundo ESCOULA (1976) os confeitos e compotas de maçã raramente apresentam-se contaminados, resultado de uma boa seleção dos frutos, e da possível eliminação da patulina com o cozimento, através de reações com grupamentos (SH)⁻ sulfidretos e também pela adição de con-

servantes.

Entretanto, mesmo sabendo-se da existência destes fatores causadores da redução dos teores da patulina, é difícil indicar com precisão qual deles é o mais significativo. Mesmo assim, acredita-se que a qualidade da matéria-prima processada por estas indústrias aliadas à qualidade tecnológica do processamento, possa ser indicado como o principal responsável pela ausência da patulina.

Fica bastante evidente, pela análise da Tabela 3 onde as amostras de suco obtido, com maçãs dos cultivares FUJI e GOLDEN DELICIOUS sob forte ataque fúngico, predominantemente do gênero *Penicillium*, apresentaram-se contaminadas, fato este, que vem a reforçar a necessidade de matéria-prima de primeira qualidade, segundo afirmam SCOTT & SOMERS (1968) e SCOTT et alii (1972).

TABELA 3 - Ocorrência de patulina nas amostras de suco de maçã elaborados com maçãs sadias e podres das cultivares FUJI e GOLDEN DELICIOUS, fornecidas pelo CNPFCT - EMBRAPA, Pelotas - R.S.

Nº DA AMOSTRA	CARACTERÍSTICA DO SUCO	RESULTADO
1	CV. FUJI Contaminada	D
2	CV. FUJI Sadia	ND
3	CV. G. DELICIOUS Contaminada	D
4	CV. G. DELICIOUS Sadia	ND
5	CV. G. DELICIOUS/FUJI Contaminadas	D
6	CV. G. DELICIOUS/FUJI Sadias	ND
TOTAL DE AMOSTRAS CONTAMINADAS - 3 / 50%		

* cada amostra corresponde a 3 frascos de 750 ml de suco de maçã.

ND = Não Detectada

D = Detectada (positivo para patulina)

5. CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos, conclui-se que:

1. Na totalidade das amostras de produtos industrializados de maçã do comércio da região de Vacaria - R.S., analisadas no período de abril a dezembro de 1988, não foi detectada a patulina.
2. Todas as amostras de suco elaboradas com maçãs deterioradas por fungos (podridão mole) apresentavam-se contaminadas com patulina.
3. Há evidências que a indústria está utilizando maçãs saudáveis para o processamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.P. & FLOREY, H.W. Substances produced by fungi Imperfect and ascomycetes. In: FLOREY, H.W., CHAIN, E. ed. *Antibiotics*. LONDON OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1942 , vol 1. p.273.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Natural poisons. In: _____. *Official methods of analysis*. Arlington, AOAC, 1984. p.478-99.

BECCI, P.J.; ESS, F.G.; JOHNSON, W.D.; GALLO, M.A.; BABISH, J.G.; DAILEY, R.E.; PARENT, R.A. Long term toxicity carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. *J. Appl. toxicol.* LONDON, 1:256-261, 1981.

CHAIN, E.H.; FLOREY, W.; JENNINGS, M.A. An antibacterial

substance produced by *Penicillium claviforme*. *Brit. J. Exp. Pathol.* LONDON. 23:202-207, 1942.

CIEGLER, A. Patulin. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W. MEHLMAN, M.A. ed. *Mycotoxins in human and animal health* Illinois, Pathotox Publishers, INC, 1977. p.609-620.

CIEGLER, A.; BECKWITH, A.C.; JACKSON, L.K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl. Environ. Microb.* Washington 31(8):644-667, 1976.

COOMES, T.J. & FEUELL, A.J. *Recomnended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnut materials.* LONDON, Tropical Products Institute, 1965. 24p. (TPI. Report, G 13).

DAVIS, N.D. & DIENER, V.L.; MYCOTOXIN. In: BRUCHAT, L.R. ed. *Food and beverage mycology*, Westport, AVI - Publishing Co. Inc. 1978. p.397-444.

DRILEAU, J.F. & BOHUON, G. La patuline dans les productions cidricoles. *C.R. Acad. Agric. Fr.* Paris, 56(3): 1031-1037, 1973.

ESCOULA, L. Moisissures toxigènes des fourrages ensilés
Presence de patuline dans les fronts de coupe d'ensi-

lages. Ann. Rech. Vet. Paris, 5:423-432, 1974.

ESCOULA, L. Production et toxicité de la patuline. *Cah. Nutr. Diet.*, Paris 11(2):89-93, 1976.

ENGEL, G. & TEUBER, M. Patulin. In: BETINA v.ed. *Mycotoxins*, production, isolation, separation and purification. Amsterdam, ELSEVIER, 1984. p.292-97.

FONSECA, H. Envenenamento Alimentar - Micotoxinas e Micotoxicoses. In: *Tecnologia dos Produtos Agropecuários; Alimentos*. São Paulo, Nobel, 1984. p.51-70.

FRAYSSINET, C. La patuline. *Cah. Nutr. Diet.* Paris, 19(1):37-42, 1984.

FRANCK, H.K. Occurrence of patulin in fruits and vegetables. *Ann. Nutr. Aliment.*, Paris, 31:459-465, 1977.

HARWIG, J.; SCOTT, P.M.; KENNEDY, B.P.C.; CHEN, Y.K. Disappearance of patulin from apple juice fermented by *Saccharmyces* spp. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* OTTAWA, 6:45-46, 1973a.

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. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* OTTAWA 6:22-25, 1973b.

HAYES, A.W. Mycotoxin teratogenicity and mutagenicity. Boca Raton, CRC Press, 1981. p.52-53.

JAUQUET, J.; LAFONT, J.; VILETTE, O. Sur la contamination des pommes et dérivés par la patuline. *Microb. Alim. Nutr.* Paris, 1:127-131, 1983.

KURATA, H. Current scope of mycotoxin research from the viewpoint of food microbiology. In: URAGUCHI, K.; YAMAZAKI, M., ed., *Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins*. New York, JOHN WILEY & SONS, INC. 1978. p.13-64.

LAFONT, P.; SIRIWARDANA, M.G.; LAFONT, J. Contamination de fromages par des métabolites fongiques. *Med. Nat. Tours*, 15:257-262, 1979.

LEZI, S.Z.; THONART, P.; BECHET, J. La patuline, purification, dégradation et dosage par CPG. *Rev. Ferment. Industr. Aliment.* BRUSSELS, 36(4):122-9, 1981.

MANN, T.B. "Disease" of turkey poults. *The Veterinary Record*, London, 72(35):715, 1960.

MOREAU, C. Clavacitoxicosis. In: _____. *Moulds toxins and food*. Trad. M. Moss. NEW YORK, John Wiley & SONS, 1979. cap.4. p.144-157.

NORSTADT, F.A. & McCALLA, T.M. Patulin production by *Penicillium urticae* Bainier in batch culture. *Appl. Microbiol.*, Washington, 17:196-197, 1969.

POHLAND, A.E. & ALLEN, R. Stability studies with Patulin. *J. Assoc. of Anal. Chem.*, Washington 53(4):688-691, 1970.

RICE, S.L.; BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON, R.E. Patulin production by *Byssoschlamys* spp. in fruit juices *Appl. Environ. Microbiol.* Washington 35(6):791-796, 1977.

ROLAND, J.O. & BEUCHAT, L.R. Influence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice. *Appl. environ. microbiol.*, Washington 47(1):205-207, 1984.

ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON, R.E. Effects of sorbate, benzoate, sulfur dioxide and temperature and

growth patulin production by *Byssochlamys nivea* in grape juice. *J. Food Protect.* Ames, 45(3):237-41, 1984.

SCOTT, P.M. Patulin In: PURCHASE I.F.H., ed. *Mycotoxins*, Amsterdam, ELSEVIER, 1974. p.383-403.

SCOTT, P.M. *Penicillium* Mycotoxins In: Wyllie, T.D. and Morehouse, L.G. ed., *Mycotoxic fungi. Mycotoxins, Mycotoxicoses* NEW YORK, MARCEL DEKKER, INC. 1977. p.283-356.

SCOTT, P.M. Patulin, In: EGAN, H., ed. *Environmental carcinogens selected methods of analysis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1982. p.311-13.

SCOTT, P.M. & SOMERS, E. Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *J. Agric. Food. Chem* Washington, 16:483-485, 1968.

SCOTT, P.M. & KENNEDY, B.P.C. Improved method for the thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Washington 56(4):813-816, 1973.

SCOTT, P.M.; MILES, W.F.; TOFT, P.; DUBE, J.G. Occurrence of patulin in apple juice. *J. Agric. Food. Chem.* Wa-

shington, 20:450-451, 1972.

SMITH, K.M. "Disease" of turkey poults. *The Veterinary Record*, London, 72(32):652, 1960.

STEVENS, A.J.; SAUNDERS, C.N.; SPENCE, J.B.; NEWNHAM, A.G.
Investigations into "disease" of turkey poults. *The Veterinary Record*. London, 72(31):627-628, 1960.

STOTT, W.T.; BULLERMAN, L.B. Instability of patulin in cheddar cheese. *J. Food. Sci.* Washington, 41(1):201-203, 1976.

TORRES, M.; SANCHIS, Y.; RIBA, M.; CANELA, R. Simple method for determination of patulin production by *Penicillium griseofulvum* Dierck. *Appl. Environ. microbiol.* Washington 51(1):209-10, 1986.

VERRET, M.J.; MARLIAC, J.P.; McLAUGHLIN, J. Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Washington 47:1003-1006, 1964.

WILSON, D.M. Patulin and penecillic acid. In: RODRICKS, J.V., ed., *Mycotoxins and other fungal related food problems*. Washington, American Chemical Society, 1976 .

p.90-106. (Advances in Chemistry Series, 149).

WOLLER, R. & MAJERUS, P. Patulin on grapes and in grapes
musts - occurrence and formation conditions. WEIN.
WISSENSCHAFT; 41(3):205-210, 1986.