

## Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência

Occurrence of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography

Guilherme PRADO<sup>1\*</sup>  
Marize S. de OLIVEIRA<sup>1</sup>  
Mariem R. da CUNHA<sup>1</sup>  
Maria de Fátima GOMIDES<sup>1</sup>  
Fabiana M. ABRANTES<sup>2</sup>  
Luciana G. dos SANTOS<sup>2</sup>  
Thaís VELOSO<sup>2</sup>  
Rita E. de S. BARROSO<sup>3</sup>

RIALA6/878

Prado, G. et al. Ocorrência de patulina em suco de maçã por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 59 (1/2):21-25, 2000

**RESUMO.** Patulina é uma micotoxina produzida por várias espécies de fungos (*Penicillium*, *Aspergillus* e *Biossochlamys*), principalmente pelo *Penicillium expansum*, fungo presente nas maçãs podres. É um composto tóxico, que em experimentos com animais tem demonstrado ter atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica. O conteúdo de patulina em suco de maçã é um bom indicador da qualidade das maçãs utilizadas no processamento. Treze marcas comercializadas em Belo Horizonte / Minas Gerais foram coletadas entre março e setembro de 1999. A metodologia utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. Patulina foi extraída com acetato de etila e o extrato foi purificado por partição com solução de carbonato de sódio. A separação e quantificação foi realizada em um cromatógrafo líquido por meio de uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (3 µm) e detector de ultravioleta a 278 nm. Patulina e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) foram completamente separados utilizando como fase móvel 0,8% tetrahidrofurano em água contendo 0,02% de azida de sódio em uma vazão de 0,5 mL/minuto. O limite de detecção foi < 5 µg/L. Foram obtidas recuperações média de patulina superiores a 73% e coeficientes de variação menores que 7%. Patulina foi detectada em apenas uma amostra (10 µg/L). Apesar da baixa incidência de patulina em suco de maçã neste estudo, autoridades brasileiras de saúde devem continuar a monitorar estes produtos.

**PALAVRAS-CHAVE.** Maçã; suco de maçã; patulina; CLAE.

<sup>1</sup> Fundação Ezequiel Dias – Instituto Octávio Magalhães

<sup>2</sup> Bolsistas do CNPq

<sup>3</sup> Farmacêutica – Estagiária da Faculdade de Farmácia / UFMG

\* Endereço para correspondência: Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira, Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP 36510-010 – Tel. (31) 33719462. Fax: (31) 33719553  
E-Mail: gui@funed.mg.gov.br

## INTRODUÇÃO

Patulina é um metabólito secundário produzido por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Biossochlamys*, em condições de alta atividade de água (0,95-0,99) e temperatura de 0-31 ° C e que podem contaminar frutas e alguns vegetais<sup>10,20,23</sup>.

Patulina é tóxica e produz tumores em ratos no local de aplicação quando injetado por via subcutânea<sup>8</sup>, tendo demonstrado atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica em vários experimentos com animais<sup>7, 17</sup>.

Os alimentos mais susceptíveis à contaminação por patulina na dieta humana são as maçãs e seus produtos (purê e sucos)<sup>24</sup>. Embora a contaminação com patulina esteja primariamente associada com áreas de tecido podre, ela pode penetrar cerca de 1 cm em região sadia da fruta<sup>16,26</sup>. Desta forma, a determinação de patulina pode ser utilizada como um indicador de qualidade em sucos de maçãs processados e produtos de frutas, desde que quantidade apreciável de toxina possa estar presente no alimento<sup>5</sup>.

Admitindo a toxicidade da patulina, autoridades de saúde de diversos países têm estabelecido uma concentração máxima de 50 µg/L, em suco de maçã convenientemente diluído para consumo. A Organização Mundial de Saúde tem adotado o mesmo nível<sup>9</sup>. O Brasil não tem legislação que estabeleça níveis permitidos de patulina em alimentos.

Estudos conduzidos em diferentes países revelaram uma incidência de patulina, principalmente em produtos de maçã, em níveis geralmente baixos<sup>12,19,22,28</sup> e ocasionalmente elevados<sup>5</sup>.

Os métodos que têm sido desenvolvidos para quantificação de patulina em suco de maçã incluem principalmente cromatografia em camada delgada (CCD)<sup>11,21</sup> e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>14, 18, 27</sup>.

Entretanto, substâncias interferentes co-extraídas, como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), têm afetado a quantificação de patulina em suco de maçã e devem ser considerados na metodologia analítica empregadas rotineiramente, principalmente porque os níveis de 5-HMF são o dobro ou o triplo dos níveis normalmente detectados de patulina<sup>2,12</sup>.

O objetivo deste trabalho foi verificar os níveis de patulina, em suco de maçã consumidos no Brasil, por cromatografia líquida de alta eficiência.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostragem e tratamento da amostra

Todas as marcas disponíveis de suco de maçã foram coletadas em supermercados de Belo Horizonte/MG, no período de março a setembro de 1999. As amostras foram utilizadas diretamente para análise ou previamente centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e diluídas como recomendado para consumo. As análises foram efetuadas em triplicata.

### 2. Metodologia

#### 2.1 Dissolução do padrão e determinação da concentração da solução padrão de patulina

Foi dissolvido 5 mg de patulina (Sigma) em 25 mL de acetato de etila. Pipetou-se 250 µL para balão volumétrico de 5 mL e o solvente foi evaporado até secar em atmosfera de nitrogênio. Imediatamente adicionou-se álcool etílico absoluto, agitou-se em ultra-som e completou-se o volume com álcool etílico absoluto. A partir do registro do espectro na região do ultravioleta da solução padrão, foi lida a absorvância a 278 nm (pico máximo) e determinada a concentração de patulina a partir de seu peso molecular (154) e absorvidade molar, 1460<sup>1,9</sup>.

#### 2.2 Determinação da recuperação de patulina adicionada ao suco de maçã

Amostra de suco de maçã, isenta de patulina, foi contaminada, em triplicata, em quantidades variáveis de solução padrão de patulina (10,72 a 85,72 µg/L), cuja concentração foi determinada como descrito no item 2.1. Em seguida procedeu-se a extração da patulina.

#### 2.3 Determinação de patulina em suco de maçã

Foi utilizado o método descrito por Brause et al.<sup>4</sup>. A patulina foi extraída com acetato de etila e purificada por partição com solução de carbonato de sódio. O resíduo de água do extrato da amostra foi removido com sulfato de sódio anidro e, após evaporação do acetato de etila, a patulina foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção a 278 nm. A identificação da patulina foi feita comparando-se o tempo de retenção e os espectros obtidos no detector por arranjo de diodos das soluções padrões de patulina e soluções das amostras. Para limpeza da coluna, 50 µL de solução acética ácida (pH = 4) foi injetada entre repetições de cada amostra. A determinação foi feita em triplicata e cada repetição foi injetada duas vezes.

#### 2.4 Instrumental

##### 2.4.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiência

Foi utilizado o equipamento Shimadzu, modelo LC-10AD, equipado com injetor automático (50 µL), detector de ultravioleta SPD-10AV e detector por arranjos de diodos para confirmação de patulina.

##### 2.4.2 Coluna

A coluna utilizada foi a de fase reversa Techsphere C<sub>18</sub>, 250 mm x 4,6 mm diâmetro interno, de 3 µm o diâmetro da partícula, operada a 30°C e precedida por uma coluna de guarda C<sub>18</sub> de 25 mm x 4,6 mm o diâmetro interno. Após as injeções no final do dia, a coluna era lavada com acetonitrila: água (60:40) por 2 horas para limpeza.

##### 2.4.3 Fase móvel

Solução aquosa de tetrahidrofurano 0,8% contendo 0,02% de azida de sódio, filtrada previamente em membrana

de celulose regenerada de 0,45  $\mu\text{m}$  e 15 mm de diâmetro, a uma vazão de 0,5 mL/min. Os solventes utilizados eram grau cromatografia líquida e a água foi purificada pelo sistema de ultrafiltração (Barnstead). Durante toda a análise era borbulhado gás hélio na fase móvel.

### 2.5 Verificação da eficiência da coluna para separação de patulina e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)

Transferiu-se 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão de patulina e 100  $\mu\text{L}$  da solução de 5-HMF (5 mg/25 mL acetato de etila) para um balão volumétrico de 10 mL. Evaporou-se até resíduo em atmosfera de nitrogênio e diluiu-se com solução acética ácida (pH = 4). Injetou-se então 50  $\mu\text{L}$  dessa solução no cromatógrafo líquido<sup>15</sup>.

### 2.6 Cálculo

A quantificação de patulina foi feita por padronização externa, utilizando-se uma curva padrão com soluções contendo 0,0625, 0,125, 0,25, 0,50 e 1,0 ng/ $\mu\text{L}$  de patulina, preparadas em solução acética ácida (pH = 4). A partir do cálculo da área do pico da patulina do extrato da amostra e das soluções padrão, foi calculado o teor de patulina na amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Separação entre patulina e 5-HMF

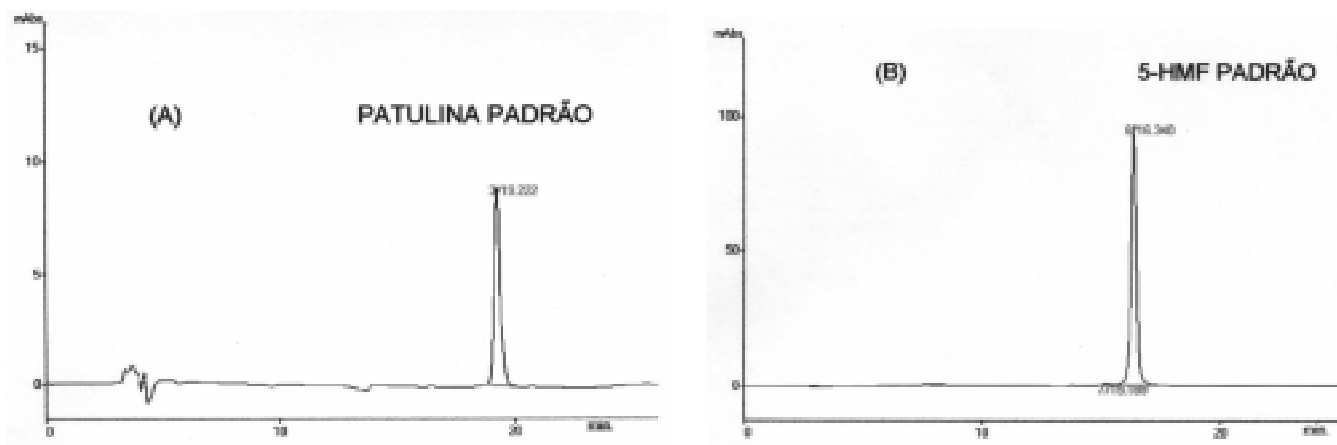
Pelos cromatogramas apresentados nas Figuras 1 e 2, observa-se que a fase móvel e a coluna utilizada, com o diâmetro da partícula de 3  $\mu\text{m}$ , possibilitaram uma última separação entre patulina e 5-HMF. Os tempos de retenção foram 16,34 e 19,21 minutos, para 5-HMF e patulina, respectivamente.

### 3.2 Recuperação

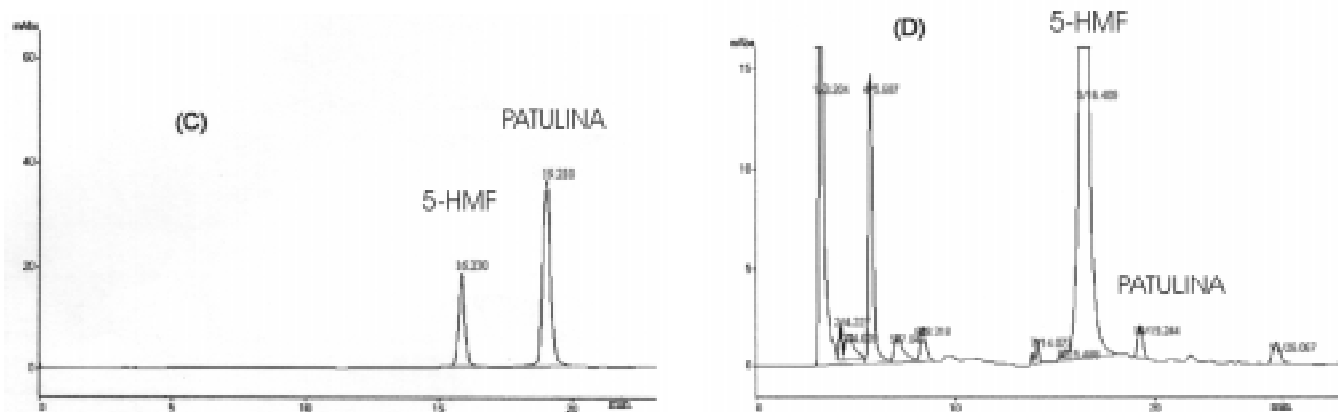
Os resultados de recuperação e coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que os valores de recuperação variaram de 73,8 a 78,3% e os coeficientes de variação (C.V.) de 1,8 a 7,0%, demonstrando a adequação do método na quantificação de patulina em suco de maçã. Segundo Horwitz et al.<sup>15</sup>, valores de recuperação acima de 70% e C. V. até 30% são aceitáveis para qualquer contaminante ao nível de  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . O valor médio de recuperação para patulina (76,1%) pode ser explicado, em parte, porque a vitamina C, componente do suco de maçã, na forma natural ou adicionado, parece reagir com patulina<sup>3,4</sup>.

### 3.3 Ocorrência

Foram analisadas 13 amostras de suco de maçã e a patulina foi detectada em apenas uma amostra, com uma concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Tabela 2). A baixa incidência de patulina pode ser devido à presença de vitamina C ou dióxido de enxofre, normalmente encontrados no suco de maçã e que reagem com a patulina<sup>3,4,6</sup>. Sylos e Rodriguez-Amaya<sup>25</sup>, em 1999, também detectaram patulina em apenas uma amostra de suco de maçã de 30 comercializadas, em Campinas, SP. Entretanto, Mancnisky e Mídio<sup>19</sup> analisaram no período de janeiro/1992 a abril/1993, 76 amostras de suco de maçã coletadas na cidade Maringá (Paraná) e detectaram patulina em 15 (21%), com média de 15,38  $\mu\text{g}/\text{L}$  e faixa de concentração de 6,4–77,5  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Essa variação nos níveis de contaminação de patulina em suco de maçã no Brasil revelam a necessidade da continuidade do monitoramento pelas indústrias e órgãos de fiscalização, uma vez que a presença de patulina decorre do crescimento de fungos em maçãs podres durante o armazenamento<sup>26</sup>. Todos os trabalhos citados utilizaram como metodologia de análise a cromatografia líquida de alta eficiência.



**Figura 1.** Cromatograma característico de (A) padrão de patulina (B) padrão de 5-hidroximetilfurfural. Condições cromatográficas: coluna  $\text{C}_{18}$  (3 $\mu$ ), 250 mm x 4,6 mm; guarda coluna  $\text{C}_{18}$  de 25 mm x 4,6 mm; Fase móvel: 0,8% tetrahydrofurano em água com 0,02% azida de sódio; Vazão: 0,5ml/min; Detecção: 278 nm



**Figura 2.** Cromatograma característico de (C) Mistura de 5-hidroximetilfurfural e patulina (D) Suco de maçã naturalmente contaminado. Condições cromatográficas: coluna  $C_{18}$  (3 $\mu$ ), 250 mm x 4,6 mm; guarda coluna  $C_{18}$  de 25 mm x 4,6 mm; Fase móvel: 0,8% tetrahydrofurano em água com 0,02% azida de sódio; Vazão: 0,5ml/min; Detecção: 278 nm

**Tabela 1.** Recuperação e coeficientes de variação de patulina em suco de maçã

Nível de Contaminação ( $\mu\text{g/L}$ )	Valor Encontrado ( $\mu\text{g/L}$ )	Média ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação <sup>1</sup> (%)	Coefficiente de Variação (%)
10,72	8,20	8,4	78,30	5,6
	8,00			
	8,90			
21,43	16,97	16,7	77,90	1,8
	16,36			
	16,68			
42,86	30,00	32,6	76,00	7,0
	34,40			
	33,36			
76,40	56,90	56,4	73,80	5,1
	59,00			
	53,30			
85,73	66,80	63,8	74,50	4,0
	62,49			
	62,22			

<sup>1</sup> Recuperação Média: 76,1%

Os níveis de contaminação de patulina em suco de maçã consumidos no Brasil são inferiores quando comparados aos descritos em outros países. Na Austrália, Burda<sup>5</sup> e Watkins et al.<sup>28</sup> detectaram patulina em 58% e 65% das amostras analisadas, respectivamente. Cerca de 50% das amostras contaminadas apresentavam níveis de patulina superiores a 50  $\mu\text{g/L}$ . Na Espanha, Prieta et al.<sup>22</sup> detectaram patulina em 82% das amostras, sendo que em 75% a concentração foi inferior a 10  $\mu\text{g/L}$ . Trabalhos desenvolvidos por Gokmen e Acar<sup>12,13</sup> na Turquia revelaram presença de patulina em suco de maçã, na quase totalidade das amostras.

**Tabela 2.** Níveis de patulina em amostras de suco de maçã coletadas em Belo Horizonte/Minas Gerais, em 1999

Marca	Origem	Embalagem	Resultado <sup>1</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Presença de vitamina C
A	México	Lata	ND	S
B	México	Tetra Pak	ND	S
C	México	Tetra Pak	ND	S
D	Coréia	Lata	ND	S
E	Portugal	Tetra Pak	ND	S
F	Argentina	Tetra Pak	ND	S
G	Bahia	Tetra Pak	ND	S
H	Rio de Janeiro	Tetra Pak	ND	S
I	Minas Gerais	Tetra Pak	10,0	S
J	Rio Grande do Sul	Tetra Pak	ND	S
L	São Paulo	Tetra Pak	ND	S
M	Ceará	Vidro	ND	N
N	Rio Grande do Sul	Tetra Pak	ND	S

<sup>1</sup> Triplicata

ND - Não Detectado. Limite de Detecção: < 5  $\mu\text{g/L}$

S: Sim; N: Não

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos parecem indicar que a contaminação de sucos de maçã por patulina no Brasil é baixa. Entretanto, como os levantamentos realizados ainda são poucos e existe a possibilidade de variações devido à matéria prima utilizada, a real dimensão do problema somente será conhecida após monitoramento por um período maior de tempo e com a participação de outros grupos de pesquisa de outros estados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério da Saúde e CNPq pelo auxílio financeiro.

Prado, G. et al. Occurrence of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):21-25, 2000

**ABSTRACT.** Patulin is a mycotoxin produced by several species of moulds (*Penicillium*, *Aspergillus* and *Bissochlamys*), but mainly by the apple-rotting fungus *Penicillium expansum*. Patulin is a highly toxic compound that has been shown to be mutagenic, carcinogenic and teratogenic in experiments with animals. The patulin content of apple juice is a good indicator of the quality of the apples used in the process. Thirteen brands were collected from retail markets in the city of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil, between March and September 1999. A rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin was used. Patulin was extracted with ethyl acetate and the extract was cleaned up by partition with sodium carbonate solution. The identification and quantification of patulin was determined by C<sub>18</sub> reversed phase column (3 µm) and a variable-wavelength UV-VIS detector set at 278 nm. Patulin and 5-hydroxymethylfurfural were completely resolved by using 0,8% tetrahydrofuran in water containing 0,02% sodium azide as the mobile phase at a flow rate of 0,5 mL/min. The detection limit was < 5 µg/L. Average recoveries greater than 73% of patulin and coefficients of variation of less than 7% were obtained. Patulin was detected in only one sample (10 µg/L). Although the incidence of patulin in apple juice in the present study was low, Brazilian health authorities should continue monitoring these products.

**KEY WORDS.** Apple; apple juice; patulin; HPLC.

## REFERÊNCIAS

- Association Of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>th</sup> ed. Virginia: Arlington; v. 2, cap. 49, p. 41-43.
- Bartolomé, B. et al. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **J. Chromatogr. A.**, 664: 39-43, 1994.
- Brackett, R.E. e Marth, E.H. Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions apple juice. **J. Food Prot.**, 42 (11): 864-866, 1979.
- Brause, A.R. et al. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. **J. Assoc. of Anal. Chem. Int.**, 79 (2): 451-455, 1996.
- Burda, K. Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit products marketed in New South Wales. **J. Food Prot.**, 55 (10): 796-798, 1992.
- Burroughs, L.F. Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. **J. Assoc. of Anal. Chem.**, 60 (1): 100-103, 1977.
- Ceigler, A.; Beckwith, A.C.; Jackson, L.K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. **App. Environ. Microbiol.**, 31: 664-667, 1976.
- Dickens, F.; Jones, H.E.H. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. **Br. J. Cancer**, 15: 85-100, 1961.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Worldwide regulations for mycotoxins. 1995**. Rome: A Compendium; 1996, n. 64, 45 p.
- Frémy, J.M. et al. Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes. **Food Addit. Contam.**, 12 (3): 331-336, 1995.
- Gimeno, A.; Martins, M.L. Rapid thin chromatographic determination of patulin, citrinin, and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams. **J. Assoc. of Anal. Chem.**, 66 (1): 85-91, 1983.
- Gokmen, V.; Acar, J. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. **J. Chromatogr. A.**, 730: 53-58, 1996.
- Gokmen, V.; Acar, J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. **J. Chromatogr. A.**, 815: 99-102, 1998.
- Herry, M.P.; Lemétayer, N. Liquid chromatographic determination of patulin in French apple ciders. **J. Assoc. of Anal. Chem. Int.**, 79 (5): 1107-1110, 1996.
- Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J. Assoc. of Anal. Chem.**, 63: 1344-1354, 1980.
- Jacquet, J.; Lafont, J.; Vilette, O. Sur la contamination des pommes et dérivés par la patuline. **Microb. Alim. Nutr.**, 1: 127-131, 1983.
- Le Bourhis, B. La patuline, un contaminant du jus de pomme. **Méd. et Nut.**, 20 (1): 23-30, 1984.
- Lindroth, S. Occurrence, formation and detoxification of patulin mycotoxin. **Publ. - Tech. Res. Cent. Finl. Mater. Proc. Techn.**, 24: 46 p., 1980.
- Manchisky Jr., M.; Midio, A.F. Incidência de patulina em jugo de manzana industrializado. **Alimentaria**, 33: 61-64, 1996.
- Northolt, M.D.; Van Egmond, H.P.; Paulsch, W.E. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **J. Food Prot.**, 41 (11): 885-890, 1978.
- Ough, C.S.; Corison, C.A. Measurement of patulin in grapes and wines. **J. Food Sci.**, 45: 476-478, 1980.
- Prieta, J. et al. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. **J. Agric. Food Chem.**, 42 (8): 1701-1703, 1994.
- Stott, W.T.; Bullerman, L.B. Patulin: A mycotoxin of potential concern in foods. **J. Milk Food Technol.**, 38 (11): 695-705, 1975.
- Sydenham, E.W. et al. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. **Food Addit. Contam.**, 14 (5): 429-434, 1997.
- Sylos, C.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 16 (2): 71-74, 1999.
- Taniwaki, M.H. et al. Migration of patulin in apples. **J. Food Prot.**, 55 (11): 902-904, 1992.
- Trucksess, M.W.; Tang, Y. Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered. **J. Assoc. of Anal. Chem. Int.**, 82 (5): 1109-1113, 1999.
- Watkins, K.L.; Fazekas, G.; Palmer, M.V. Patulin in Australian apple juice. **Food Australia**, 42 (9): 438-439, 1990.

Recebido em 09/11/1999; Aprovado em 04/09/2000