



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Raquel Cardoso Azenha

**DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM PURÉS DE
FRUTA DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO
INFANTIL**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar
orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e
coorientado pela Professora Doutora Sofia Cancela Duarte e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Outubro de 2020

Joana Raquel Cardoso Azenha

**DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM PURÉS
DE FRUTA DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO
INFANTIL**

**Dissertação no âmbito do mestrado em Segurança Alimentar
orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e
coorientada pela Professora Doutora Sofia Cancela Duarte e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

*“Recomeça... se puderes, sem angústia
e sem pressa e os passos que deres, nesse
caminho duro do futuro, dá-os
em liberdade, enquanto não alcances não
descanses, de nenhum fruto queiras só
metade.”*

Miguel Torga

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação representa a conclusão de mais uma etapa académica, que certamente contribui para o meu enriquecimento pessoal e profissional. Esta conquista deveu-se a várias pessoas, às quais presto o meu sincero agradecimento.

Começo por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Angelina Pena, pela oportunidade que me concedeu ao permitir a realização deste trabalho e por toda a orientação científica.

Agradeço à minha coorientadora, Professora Doutora Sofia Duarte que sem os seus conhecimentos, orientação científica e acima de tudo, disponibilidade, paciência, apoio e incentivo, não seria possível a realização deste estudo. As suas sugestões foram indispensáveis, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Ao Gonçalo, por me apoiar em todas as decisões e me incentivar diariamente a concretizar os meus objetivos.

Às minhas colegas de Mestrado, em especial à Inês Pedro, que sem a sua amizade e apoio nada disto seria possível.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família, pais, irmã e avós, que sempre me apoiaram em todo o meu percurso e possibilitaram a realização deste trabalho.

RESUMO

A patulina é um metabolito secundário produzido por um conjunto de espécies fúngicas dos géneros *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Penicillium* e *Paecilomyces* dos quais *Penicillium expansum* é a espécie mais importante. É uma micotoxina encontrada frequentemente em maçãs e produtos à base de maçã, e por isso, a sua presença é um indicador da qualidade da fruta utilizada na produção. Estudos de toxicidade demonstram que esta micotoxina é classificada como mutagénica, genotóxica, imunossupressora e neurotóxica.

A patulina é uma micotoxina com particular interesse na área da alimentação infantil, dado que ocorre sobretudo em produtos à base de maçã, amplamente consumidos por este grupo populacional. Tendo esta premissa como referência, a Comissão Europeia estabeleceu, no Regulamento (CE) no 1881/2006, limite máximo de 10 µg/kg para a patulina em alimentos destinados a crianças.

Os objetivos do presente estudo foram determinar a ocorrência de patulina em alimentos destinados à alimentação infantil e avaliar a exposição humana decorrente do seu consumo. Foram analisadas 40 amostras de puré de fruta à base de maçã comercializadas em Portugal por método de ELISA competitivo. Todas as amostras estavam contaminadas com um teor de patulina superior ao LOD (1 µg/kg). Os teores das amostras variaram entre 1,43 e 23,28 µg/kg, com um valor médio de $5,78 \pm 5,09$ µg/kg.

A exposição de lactentes e crianças jovens foi estimada para o pior, médio e melhor cenário, tendo sido obtido valores de EDI entre 0,0028 e 0,3582 µg/kg de p.c./dia. Para o pior cenário, correspondente ao consumo, por um lactente, de um boião (100g) com o teor máximo determinado, a EDI representa cerca de 89,55 % da DDAMP de patulina estabelecida pela JECFA (0,4 µg/kg de p.c./dia).

Apesar de não ser estatisticamente significativo, as amostras de origem biológica, apresentam teores de contaminação superiores às amostras de origem convencional, conforme verificado em estudos anteriores realizados em produtos à base de maçã.

Os resultados do presente estudo confirmam a necessidade de continuar a monitorização da exposição da população a esta micotoxina e implementar medidas que visem a diminuição da incidência da patulina e a consequente exposição das crianças.

PALAVRAS-CHAVE: Alimentação infantil, ELISA, micotoxina, patulina, puré de fruta.

ABSTRACT

Patulin is a secondary metabolite produced by a set of fungal species of the genera Aspergillus, Byssosclama, Penicillium and Paecilomyces of which Penicillium expansum is the most important species. It is a mycotoxin often found in apples and apple-based products, and therefore, its presence is indicative of the quality of the fruit used in production. Toxicity studies show that this mycotoxin is classified as mutagenic, genotoxic, immunosuppressive and neurotoxic.

Patulin is a mycotoxin with particular interest in the field of children, given that it occurs mainly in apple-based products, widely consumed by this population group. With this premise as a reference, the European Commission collected, in Regulation (EC) No. 1831/2003, a maximum limit of 10 µg/kg for patulin in foodstuffs for children.

The objectives of the present study were to determine the occurrence of patulin in foods intended for infant feeding and to assess human exposure resulting from its consumption. Forty samples of apple-based fruit puree marketed in Portugal were analyzed using a competitive ELISA method. All samples were contaminated with a patulin content higher than LOD (1 µg/kg). The contents of the samples varied between 1.43 and 23.28 µg / kg, with an average value of 5,78 ± 5,09 µg/kg.

The exposure of infants and young children was estimated for the worst, medium and best scenario, with EDI values between 0,0028 and 0,3582 µg/kg bw/day being obtained. For the worst scenario, corresponding to the consumption, by an infant, of a jar (100g) with the maximum content determined, the EDI represents about 89,55% of the DDAMP of patulin established by JECFA (0.4 µg/kg bw/day)

The results of the present study confirm the need to continue monitoring the population's exposure to this mycotoxin and to implement measures aimed at reducing the incidence of patulin and the consequent exposure of children.

KEYWORDS: *ELISA, fruit puree, Infant food, mycotoxin, patulin.*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
Índice de Tabelas.....	VIII
Índice de Figuras.....	IX
Lista de Siglas e Abreviaturas	X
PARTE A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	I
1. INTRODUÇÃO	2
2. PATULINA.....	3
2.1. Fungos produtores de patulina	4
2.2. Caracterização físico-química.....	5
2.3. Toxicinética	6
2.4. Toxicidade.....	8
2.5. Avaliação da exposição	10
2.5.1. Biomonitorização humana	11
2.5.2. Exposição alimentar	11
2.5.2.1. Consumo infantil.....	13
2.6. Ocorrência da patulina em géneros alimentícios.....	13
2.7. Efeito dos processos tecnológicos alimentares.....	17
2.8. Vulnerabilidade infantil	18
2.9. Metodologias analíticas	19
2.10. Limites e Legislação	21
PARTE B - EXPERIMENTAL	24
1. JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS DO ESTUDO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1. Amostragem	26
2.2. Equipamentos e material utilizado.....	30
2.3. Material e reagentes	30
2.4. Metodologia analítica.....	31

2.5.	Extração e preparação da amostra	31
2.6.	Determinação por ensaio imunoenzimático	31
2.7.	Ingestão Diária Estimada (EDI).....	32
2.8.	Análise estatística	33
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

Índice de Tabelas

TABELA 1: PRINCIPAIS EFEITOS TÓXICOS DA PATULINA DEMONSTRADOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> , EM DIFERENTES ESPÉCIES E DIFERENTES DOSES (MODIFICADO DE SALEH E GOKTEPE, 2019). 10	
TABELA 2: OCORRÊNCIA DE PATULINA EM PRODUTOS ALIMENTARES À BASE DE MAÇÃ, SEGUNDO ESTUDOS RECENTES (2002-2020).	14
TABELA 3: LIMITES MÁXIMOS DE PATULINA ESTABELECIDOS PELA COMISSÃO EUROPEIA (1881/2006/EC, 2006).	23
TABELA 4: CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS INCLUÍDAS NO ESTUDO.....	27
TABELA 5: TEOR ($\mu\text{G/KG}$) E OCORRÊNCIA DE PATULINA DE ACORDO COM A ORIGEM DAS AMOSTRAS.	35
TABELA 6: OCORRÊNCIA E TEORES ($\mu\text{G/KG}$) DE CONTAMINAÇÃO DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO.....	36
TABELA 7: CENÁRIOS DE EXPOSIÇÃO E AVALIAÇÃO DE RISCO DE ACORDO COM AS DIFERENTES IDADES, CONSIDERANDO O CONSUMO DE 21 GRAMAS (3 AOS 12 MESES) E 28,25 GRAMAS (DOS 13 MESES AOS 3 ANOS).....	40
TABELA 8: CENÁRIOS DE EXPOSIÇÃO E AVALIAÇÃO DE RISCO DE ACORDO COM AS DIFERENTES IDADES, CONSIDERANDO A INGESTÃO DE UM BOIÃO DE FRUTA POR DIA (100 G).....	40

Índice de Figuras

FIGURA 1: BIOSÍNTESE DA PATULINA (RETIRADO DE PUEL, GALTIER E OSWALD, 2010).....	6
FIGURA 2: SOLUÇÕES PADRÃO DE PATULINA INCLUÍDAS NO KIT ELISA.....	31
FIGURA 3: CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA.....	34

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AOAC – Do Inglês *Association of Official Analytical Chemistry* (Associação Oficial da Química Analítica)

DDAMP - Dose diária admissível máxima provisória (Em inglês, *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake, PMTDI*)

DSAP - Dose semanal admissível provisória (Em inglês, *Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI*)

EFSA – Do Inglês *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Do Inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)

FDA – Do Inglês *Food and Drug Administration*

GC - Do Inglês *Gas Chromatography* (Cromatografia gasosa)

HPLC – Do Inglês *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

IAC – Do Inglês *Immunoaffinity Column* (Coluna de imunoafinidade)

IARC – Do Inglês *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para a Investigação do Cancro)

JECFA – Do Inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (Comité Conjunto FAO/OMS de Especialistas em aditivos alimentares)

LM – limite máximo

LOD – Do Inglês *Limit of detection* (Limite de deteção)

LOQ – Do Inglês *Limit of quantification* (Limite de quantificação)

mg/kg – Miligrama por quilograma

mL – Mililitro

n – Número de amostras

ng/kg – Nanograma por quilograma

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAT – Patulina

P.c. – Peso Corporal

SPME – Do Inglês *Solid Phase Micro-extraction* (Microextração por fase sólida)

TDI – Do Inglês *Tolerable Daily Intake* (Ingestão Diária Tolerável)

UE – União Europeia

λ – Comprimento de onda

$\mu\text{g}/\text{kg}$ – Micrograma por quilograma

$\mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{dia}$ – Micrograma por quilograma de peso corporal por dia

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

PARTE A - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. INTRODUÇÃO

No âmbito dos diferentes perigos alimentares, incluem-se os perigos provocados pela presença de contaminantes nos alimentos, de que são exemplo as micotoxinas (Borchers *et al.*, 2010). As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por diversos fungos, capazes de contaminar uma vasta gama de produtos alimentares em determinadas condições favoráveis. De acordo com o relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), 25% de todos os produtos alimentícios estão contaminados por micotoxinas, sendo maior a prevalência em cereais, frutos secos, especiarias e algumas frutas, representando graves riscos para a saúde humana e animal (Iheshiulor *et al.*, 2011).

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “*Mykes*” que significa fungo, e da palavra “*toxicum*”, termo em latim para toxina. A primeira vez que foi aplicado este conceito foi no início da década de 60, em Inglaterra, após a morte de 100 mil perús, resultado da ingestão de alimento contaminado com elevado teor da micotoxina aflatoxina (Milićević, Škrinjar e Baltić, 2010).

Os fungos produtores de micotoxinas com consequências sérias para a saúde humana pertencem aos géneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, por este motivo a contaminação pode ocorrer durante o crescimento, a colheita, o transporte, o armazenamento e/ou o processamento dos produtos (Shephard, 2008).

A presença de fungos toxigénicos não é, por si só, sinónimo de produção de micotoxinas, contudo a presença de um fungo implica um potencial risco para a saúde. A exposição simultânea a várias micotoxinas e os eventuais efeitos tóxicos combinados daí resultantes também é algo que deve ser avaliado (Martins, Martins e Bernardo, 2003). (Speijers e Speijers, 2004).

A ingestão de alimentos fortemente contaminados com micotoxinas pode provocar graves problemas de saúde resultantes da exposição aguda, podendo até, em alguns casos, conduzir à morte (Iamanaka, Oliveira e Taniwaki, 2010). A exposição prolongada a níveis reduzidos de micotoxinas pode ser também bastante nociva uma vez que alguns destes compostos para além de revelarem propriedades imunossupressoras, estrogénicas, mutagénicas e carcinogénicas, demonstram elevados níveis de bioacumulação (Turner *et al.*, 2015). As micotoxinas podem afetar muitos órgãos e

sistemas, principalmente o fígado, rins e sistema nervoso, endócrino e imunitário (Marques, 2019).

Além dos efeitos nocivos para a saúde, o impacto económico das micotoxinas é relevante devido aos elevados prejuízos que causam a nível pecuário (incluindo mortalidade e diminuição da produtividade) e agrícola, devido à impossibilidade de comercializar culturas cerealíferas e outros produtos alimentares que apresentem níveis de contaminação com micotoxinas acima do limite legal (Ashiq, 2015). Encontram-se identificadas mais de 500 micotoxinas, sendo que nem todas apresentam risco para a saúde (Shephard, 2008). É, por isso, essencial conhecer quais são as micotoxinas que contaminam os géneros alimentícios, os seus níveis de contaminação e a frequência da sua ocorrência (Ashiq, 2015). Ao longo dos últimos anos, têm aumentado o número de estudos publicados sobre ocorrência e níveis de contaminação de micotoxinas em alimentos e, neste contexto, considera-se que, de entre as várias toxinas já descobertas, apenas algumas são importantes em termos económicos e toxicológicos, o que justifica o estabelecimento de limites máximos em vários países, a nível mundial (Puel et al. 2010). Neste grupo incluem-se as aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, fumonisinas, desoxinivalenol (tricotecenos) e zearalenona (Ashiq, 2015).

2. PATULINA

A patulina foi originalmente isolada a partir do fungo *Penicillium griseofulvum* e *Penicillium expansum*, em 1943, tendo sido descrita como antibiótico, logo após a descoberta da penicilina (Bennett e Klich, 2003; Birkiinshaw et al., 1943; Katzman et al., 1944).

De facto, os primeiros estudos efetuados centraram-se na sua potencial utilização como antibiótico, tendo sido testada para o tratamento de constipações (na forma de spray nasal), para o tratamento de infeções por dermatófitos (na forma de pomada) e como composto anticancerígeno (Pal, Singh e Ansari, 2017). Verificou-se que possui forte atividade antibacteriana contra várias bactérias Gram positivo e Gram negativo, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, bem como atividade antivírica e antiprotozoária (Pal, Singh e Ansari, 2017). Contudo, durante as décadas de 50 e 60 verificou-se que apresentava efeitos tóxicos graves, para plantas e para animais. Por este motivo, foi abandonada a utilização da patulina como fármaco e nos anos 60 foi reclassificada como micotoxina (Bennett e Klich, 2003; Iwahashi et al., 2006; Pádua e Junior, 2005).

2.1. Fungos produtores de patulina

Foram identificadas mais de 60 espécies fúngicas dos géneros *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Penicillium* e *Paecilomyces* com capacidade de produzir patulina e se desenvolver numa grande diversidade de substratos (Bennett e Klich, 2003). Frequentemente, estes fungos colonizam frutas e vegetais e aceleram a sua decomposição. Particularmente, nas maçãs e produtos derivados de maçã, são responsáveis pela formação do bolor azul, sabendo-se hoje em dia que é uma realidade em todo o mundo (Pal, Singh e Ansari, 2017).

As espécies do género *Penicillium* que já foram identificadas como produtoras de patulina são: *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* e *P. vulpinum* (Frisvad et al., 2004).

De entre os fungos produtores, a espécie *Penicillium expansum* é considerada a mais importante produtora de patulina, sendo igualmente responsável pelo apodrecimento da fruta e formação de bolor de cor azul (Pal, Singh e Ansari, 2017). Este fungo psicotrófico é comum em maçãs, pêssegos e peras. Estima-se que seja responsável por 70 a 80 % da deterioração das frutas durante a fase de armazenamento, uma vez que se desenvolve mesmo a temperaturas inferiores a 5 °C (Moake, Padilla-Zakour e Worobo, 2005).

O género *Byssochlamys* possui uma espécie economicamente importante, *B. nivea*, responsável pela deterioração de frutas e produtos processados a partir destas. Esse género fúngico é o principal causador da deterioração dos derivados de frutas após tratamento térmico. *B. nivea* foi capaz de crescer em ambiente com 60 % CO₂ e teores menores que 0,5 % O₂, formando colónias de 40 mm de diâmetro após 30 dias (Iamanaka, Oliveira e Taniwaki, 2010)

Do género *Aspergillus*, a espécie *A. clavatus* é uma das espécies frequentemente encontradas. Esta espécie fúngica isolada em meio de cultura produz patulina em concentrações vestigiais (Sabino, 2008). As espécies *A. giganteus* e *A. longivesica* também são espécies identificadas como produtoras de patulina (Varga et al., 2007).

Do género *Paecilomyces*, a espécie *P. saturatus* é uma espécie patogénica que difere de outras espécies do mesmo género, pois tem a capacidade de produzir patulina (Barad, Sionov e Prusky, 2016).

2.2. Caracterização físico-química

Quimicamente, a patulina (com a fórmula molecular $C_7H_6O_4$) é uma lactona heterocíclica insaturada, designada por 4-hidroxi-4H-furo[3,2c]piran-2(6H)-ona. A patulina pode também ser designada como claviformina, clavacina, clavaina expansina, micoína, micoína C, penicidina e terinina (Barad, Sionov e Prusky, 2016).

A patulina é um sólido cristalino incolor com um peso molecular de 154,12 g/mol, ponto de fusão de 111 °C, com uma absorvância máxima a 276 nm e uma absorvidade molar de 14600 L/mol/cm em etanol. É solúvel em água, etanol, acetona, acetato etilo, éter etílico e clorofórmio, mas insolúvel em benzeno e éter de petróleo. A patulina possui uma considerável estabilidade térmica a pH<6, é instável em soluções alcalinas e degrada-se de forma gradual durante o armazenamento em presença de sulfitos, grupos sulfidril e ácido ascórbico (Assunção *et al.*, 2014).

Algumas micotoxinas são relativamente termorresistentes e podem apresentar-se ativas, mesmo após o processamento térmico, sendo mais sensíveis ao tratamento químico. A patulina é exemplo disso, não sendo destruída após pasteurização do sumo de maçã por 10 segundos. Contudo, perde a sua atividade biológica em meio alcalino, na presença de cisteína ou ainda na presença de conservantes de alimentos contendo dióxido de enxofre (Nielsen, 2003)

A atividade da água exerce forte influência sobre o desenvolvimento dos microrganismos que causam degradação do alimento. Em geral, o valor ótimo de atividade da água para o crescimento fúngico é diferente do valor ótimo da atividade da água em que o nível máximo de formação de micotoxinas é observado. O intervalo de temperatura para o crescimento e produção de patulina por *P. expansum* é 0-24 °C e a atividade da água máxima é 0,99 (Zhong *et al.*, 2018).

De acordo com muitos estudos bioquímicos, a biossíntese de patulina envolve 10 etapas, conforme ilustrado na figura 1.

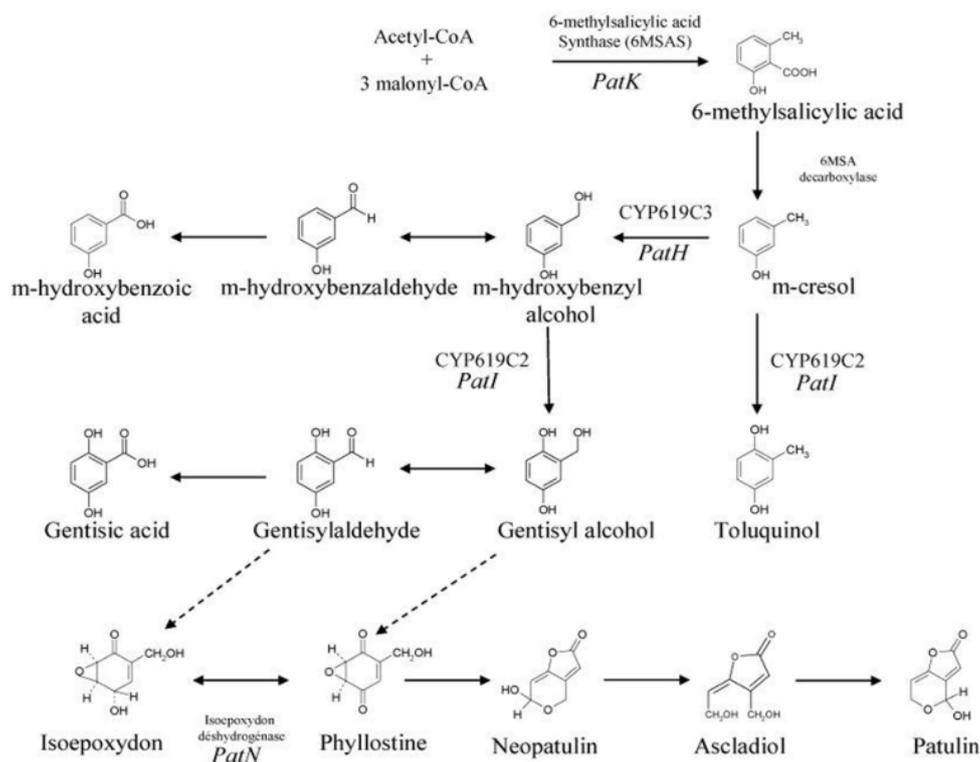


Figura 1: Biossíntese da patulina (Retirado de Puel, Galtier e Oswald, 2010).

Recentemente, foram identificados por Li e col. (2019), quinze genes envolvidos na biossíntese da patulina. Entre eles, os genes PatE e PatH são comprovadamente necessários para a produção de patulina (Li *et al.*, 2019). Além disso, foram identificadas três proteínas pertencentes à família Velvet responsáveis pela regulação dos níveis de patulina, são elas: veA, veIB, veIC (Zhai *et al.*, 2019).

2.3. Toxicinética

O trato gastrointestinal constitui uma importante barreira que separa o interior do corpo humano do ambiente externo, estando diretamente envolvido no metabolismo e transporte de substâncias endógenas e exógenas. A mucosa intestinal é a primeira barreira biológica encontrada pelas toxinas presentes na dieta, podendo assim ser exposta a teores elevados destes contaminantes presentes nos alimentos, nomeadamente, as micotoxinas (Saleh e Goktepe, 2019).

Apesar do interesse crescente por parte da comunidade científica pela patulina, existem poucos dados acerca da sua absorção e metabolismo. Os estudos existentes sobre a patulina foram realizados em ratos, não existindo dados em humanos sobre a sua absorção, comportamento toxicocinético e metabolismo. Esta questão prende-se com

o facto da análise da patulina em produtos à base de maçã ter-se revelado pouco sensível e a patulina ser rapidamente absorvida para o sangue (Rychlik *et al.*, 2004).

Nesse âmbito, num primeiro estudo, na década de 70, foi administrada [14C]-PAT em ratos e avaliada a radioatividade em urina, fezes e diferentes tecidos. Os autores detetaram 50 % da radioatividade nas fezes após 24 h, assumindo que essa percentagem de patulina terá sido excretada sem qualquer absorção ou que sofreu o ciclo entero-hepático para regressar ao lúmen intestinal (Dailey, Blaschka e Brouwer, 1977). Após a ingestão de patulina, esta é rapidamente excretada (cerca de 87 %), sendo excretada nas fezes (49 %), na urina (36 %) e pelas vias respiratórias na forma de dióxido de carbono (1-2 %) (Moss, 2008).

A biodisponibilidade oral pode ser dividida em três processos: libertação do composto durante a digestão no trato gastrointestinal; absorção da fração inteligível (bioacessibilidade); e metabolização no intestino e fígado (efeito de primeira passagem) (Brandon *et al.*, 2012). A bioacessibilidade de um contaminante pode ser considerada um indicador da respetiva biodisponibilidade máxima a nível intestinal (Assunção *et al.*, 2014). Rychlik e col. (2004), realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* com a finalidade de analisar o processo metabólico da patulina. Embora a patulina estivesse presente em concentrações elevadas, verificou-se que podia ser degradada durante o seu percurso pelo sistema gastrointestinal ou até mesmo, desaparecer rapidamente após o contato com o sangue. Este estudo concluiu que a patulina não apresentava efeitos sistémicos e que a sua ação tóxica era limitada a nível local (Rychlik *et al.*, 2004).

Até ao momento, poucos estudos foram realizados para determinar a bioacessibilidade de patulina em produtos de maçã, isto é, avaliarem a fração que estará disponível para absorção, no intestino, após o processo digestivo. Assunção e col. (2005) reportaram valores médios de bioacessibilidade intestinal de $27,7 \pm 13,5$ % em sumos de fruta à base de maçã. Atribuíram a redução dos teores de patulina no final da fase intestinal à ação dos processos digestivos que poderão originar alterações na sua estrutura química ou eventual formação de novos compostos. Em contraste, são de realçar os elevados valores de bioacessibilidade na fase oral e gástrica (superiores a 75 %). Estes dados vêm alertar para potenciais perigos para a saúde, decorrentes da exposição a patulina em alimentos contaminados, face ao período de permanência desta micotoxina no organismo durante a digestão, em particular, na fase gástrica (Assunção *et al.*, 2015).

Atendendo aos efeitos potencialmente prejudiciais à saúde, é importante compreender melhor o efeito da patulina na estrutura e mucosa intestinal.

Mahfoud e a sua equipa (2002) demonstraram que a exposição de células epiteliais intestinais à patulina resultou numa diminuição acentuada na resistência elétrica transepitelial para concentrações de micotoxinas entre 50 e 90 μM (Mahfoud *et al.*, 2002). Anos mais tarde verificou-se que, para concentrações superiores (100 μM) observava-se uma redução de 95 % na resistência elétrica transepitelial após 5 horas de exposição das células (McLaughlin *et al.*, 2009). Mais recentemente, verificou-se que a patulina tem a capacidade de alterar diretamente a permeabilidade e o transporte de iões na mucosa intestinal intacta de ratos (camundongo) (Mohan *et al.*, 2012).

2.4. Toxicidade

A patulina representa uma preocupação particular uma vez que a exposição humana a esta micotoxina pode resultar em toxicidade aguda ou crónica, descrevendo-se como potenciais efeitos de exposição os efeitos imunológicos, neurológicos e gastrointestinais (Puel, Galtier e Oswald, 2010).

Os registos de efeitos tóxicos em animais associados ao consumo de alimentos contaminados com patulina são reduzidos. No entanto, no Japão, em 1954, associou-se a patulina à morte de 100 vacas que ingeriram malte de cevada contaminada (Iwahashi *et al.*, 2006). O consumo de resíduos de malte de cevada contaminado com patulina foi também associado a problemas tóxicos em bovinos, os quais se caracterizaram por perturbações neurológicas. Um outro caso refere a associação de patulina à ocorrência da síndrome hemorrágica e morte de animais após consumo de silagem contaminada com esta micotoxina (Moake, Padilla-Zakour e Worobo, 2005). Ensaio efetuados em modelos animais demonstraram que a patulina tem um grande espectro de toxicidade, não só é considerada bactericida e fungicida como, em concentrações em 0,3-2,5 mg/g pode provocar a morte imediata por edema cerebral e hemorragias nos pulmões (Moss, 2008).

A patulina foi classificada no grupo 3 pela IARC, isto é, “não classificável quanto à sua carcinogenicidade em humanos”, onde se incluem os compostos para os quais não existem evidências de carcinogenicidade para humanos (IARC, 2018; Puel, Galtier e Oswald, 2010).

Diversos estudos de toxicidade demonstram que a patulina é genotóxica, mutagénica, imunossupressora e neurotóxica. A ingestão de frutas e vegetais contaminados com

patulina podem originar complicações de saúde, como supressão imunológica, inflamação gastrointestinal, úlceras e sangramento, mutagenicidade e carcinogenicidade, embriotoxicidade e efeito teratogênico (Ramalingam, Bahuguna e Kim, 2019; Saleh e Goktepe, 2019).

Vários estudos têm concluído que as espécies reativas de oxigênio são a chave para mediar a toxicidade da patulina (Pal, Singh e Ansari, 2017). No ano 1996, Barhoumi e col. demonstraram, em hepatócitos de rato, que a depleção de glutatona pela patulina resulta na formação de espécies reativas de oxigênio. Devido às características eletrofílicas da patulina, esta forma adutos covalentes com porções nucleofílicas, nomeadamente, tióis celulares, onde se insere a glutatona, fundamental para a neutralização de radicais livres e oxidantes (Fliege e Metzler, 2000).

O tratamento de patulina em culturas de células de rim embrionárias humanas (HEK293) e células HL-60 demonstraram a rápida formação de espécies reativas de oxigênio, incluindo o radical superóxido (O_2^-). Simultaneamente, os níveis de peroxidação lipídica também aumentaram nas células HL-60. No mesmo estudo, as espécies reativas de oxigênio mediadas por patulina foram correlacionadas com a ativação da via de sinalização ERK (Liu *et al.*, 2006). A peroxidação lipídica da membrana celular causada pela patulina pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio, capazes de induzir dano oxidativo no ácido desoxirribonucleico (ADN) (Riley e Showker, 1991).

Recentemente foi descrito o efeito genotóxico da patulina em células humanas por meio da indução de espécies reativas de oxigênio (Moake, Padilla-Zakour e Worobo, 2005). À luz dos conhecimentos atuais, é reconhecido que as micotoxinas, nomeadamente a patulina, são capazes de alterar a resposta imunológica. A patulina é capaz de reduzir notavelmente a expressão de IL-23, IL-10 e TGF- β em macrófagos de bovinos (Liu *et al.*, 2006). Verificou-se o aumento dos níveis de citocinas Th2 e diminuição da produção de IFN-gama em rato quando expostos a patulina. A patulina causa hiperatividade das vias aéreas e inflamação pulmonar eosinofílica, aumentando assim, a resposta imune alérgica (Schütze *et al.*, 2010). A exposição de patulina durante 60 a 90 dias em ratos machos causou hemorragia, hiperplasia de células plasmáticas, dilatação e fibrose no córtex, aumento do tecido adiposo, adelgaçamento do córtex numa concentração de 0,1 mg/kg p.c. (Schütze *et al.*, 2010).

Estudos sobre os mecanismos de toxicidade referem a supressão do gene Rpn4, através da ativação do fator de transcrição Rpn4, que controla a expressão do proteassoma –

responsável pela degradação de proteínas com erros de síntese, como um importante mecanismo de toxicidade da patulina. Com o aumento da expressão de Rpn4 existe um aumento da degradação das proteínas. No entanto, este mecanismo pode ser reversível com a eliminação da patulina, conforme demonstrado em células de levedura (Guerra-Moreno e Hanna, 2017). Estudos referem a via oxidativa como a principal via de toxicidade.

A toxicidade da patulina tem sido estudada em modelos animais, como ratos, galinhas, coelhos e macacos, e os principais efeitos nocivos encontram-se indicados na tabela I. Estudos observacionais sugerem que os principais locais de acumulação de patulina são os eritrócitos e órgãos hipervascularizados, como o baço, rim, pulmão e fígado (Pal, Singh e Ansari, 2017).

Tabela I: Principais efeitos tóxicos da Patulina demonstrados *in vitro* e *in vivo*, em diferentes espécies e diferentes doses (Modificado de Saleh e Goktepe, 2019).

	EFEITOS TÓXICOS DESCRITOS	Modelo animal/célula	Referência bibliográfica
Exposição aguda	Agitação, convulsões, dispneia, congestão pulmonar, edema, hiperemia, distensão do trato gastrointestinal, náuseas, degeneração das células epiteliais, hemorragia intestinal, inflamação intestinal, úlcera intestinal.	Rato; Hamster.	(Al-Hazmi, 2014) (Rychlik <i>et al.</i> , 2004)
Exposição crónica	Genotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, imunotoxicidade, imunossupressão, teratogenicidade, carcinogenicidade.	Rato; Coelho.	(Duranova <i>et al.</i> , 2015) (Jayashree <i>et al.</i> , 2017)
Efeito a nível celular	Rutura da membrana plasmática, inibição da síntese de proteína, alteração da transcrição e tradução, inibição da síntese de ADN, inibição da urease, perda de glutatona livre, entre outros	Rato; Eritrócitos humanos.	(Schumacher, Metzler e Lehmann, 2005) (Mohan <i>et al.</i> , 2012) (Lupescu <i>et al.</i> , 2013)

2.5. Avaliação da exposição

Na avaliação de risco à saúde humana, a ingestão de alimentos é considerada a principal via de exposição a muitos contaminantes gerados por contaminação industrial ou ambiental ou como resultado do processamento, embora a quantidade total de um

contaminante ingerido (dose externa) nem sempre reflita a quantidade disponível ao organismo (dose interna) (Saleh e Goktepe, 2019).

2.5.1. Biomonitorização humana

Nos últimos anos, a biomonitorização humana tem sido considerada uma ferramenta poderosa e promissora para avaliar a exposição (pela avaliação da dose interna) a contaminantes de diferentes origens, fornecendo informações de vias de exposição diferentes (oral, cutânea e inalatória) e contribuindo para definir a exposição total de um indivíduo (Zidek et al., 2017). A biomonitorização humana avalia a exposição humana a compostos químicos e seus efeitos através da medição da concentração desses compostos ou dos seus metabolitos em amostras biológicas. Os estudos de biomonitorização humana permitem determinar a exposição a nível individual e, conseqüentemente, realizar a avaliação de risco. Na área de segurança alimentar, a avaliação da exposição combina dados de consumo e dados de ocorrência (Martins et al., 2019).

No estudo recente de biomonitorização humana de Martins e col. (2019) foi avaliada a exposição da população portuguesa adulta a 37 biomarcadores de micotoxinas em amostras de urina revela a presença de zearalenona, desoxinivalenol, ocratoxina A, alternariol, citrinina e fumonisina B1. A molécula da patulina não foi detetada em nenhuma das 94 amostras de urina (Martins et al., 2019). Para além deste estudo desenvolvido em amostras biológicas de adultos, do conhecimento da autora, não foram desenvolvidos estudos de biomonitorização de patulina em crianças.

2.5.2. Exposição alimentar

A principal via de exposição do Homem às micotoxinas, em particular à patulina, é a via alimentar (Saleh e Goktepe, 2019). Os fungos produtores de patulina, particularmente *P. expansum*, infetam frutas, incluindo maçãs, pêras, uvas, cerejas, ameixas, alperces, pêssegos, damascos, nectarinas, framboesas, amoras, morangos, bananas, mirtilos e groselhas, e também de produtos hortícolas como tomate. Podem ainda estar presentes em oleaginosas, como amêndoas, nozes, avelãs e amendoins, bem como no queijo. A contaminação de patulina está principalmente associada às zonas do alimento em

decomposição, difundindo-se até cerca de 1 cm no tecido saudável circundante (Sabino, 2008).

Numerosos estudos referem a presença de patulina em diferentes produtos de transformação da fruta incluindo sumo de maçã, uva, pêra, groselha, laranja, ananás e maracujá, puré de maçã, compotas de groselha e de mirtilos e alguns alimentos infantis. Quando se usa fruta deteriorada na preparação de sumos ou purés (fabrico industrial), o produto final pode apresentar patulina devido à contaminação pelas zonas deterioradas da fruta com o fungo e respetiva micotoxina. Estes alimentos constituem, portanto, as principais fontes de exposição humana à patulina (Gökmen e Acar, 1998; Leggott e Shephard, 2001).

Em 2001, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) refere num documento relativo à avaliação da segurança e gestão de risco da patulina que, devido à natureza do alimento, aos processos de fabrico ou às práticas de consumo, esta micotoxina parece não constituir motivo de preocupação em termos de segurança alimentar, à exceção do sumo de maçã. O mesmo organismo defende que, no caso do queijo, a presença de um elevado teor de cisteína interage com a patulina inativando-a e no caso dos frutos, as partes deterioradas são removidas antes do seu consumo.

Estudos publicados nos últimos anos indicam que a exposição das crianças a esta micotoxina através do consumo de alimentos à base de maçã atinge ou excede a Dose Diária Admissível Máxima Provisória (DDAMP) durante a infância (Baert et al., 2005).

A avaliação da exposição à patulina na população dos Estados-Membros da UE, foi realizada por um esforço de Cooperação Científica em 2002, embora a maioria dos dados sobre a ocorrência de patulina tenham origem no norte da Europa (Majerus e Kapp, 2002). Um conjunto de 10 países da UE, incluindo Portugal, estimaram a exposição alimentar à patulina numa amostra composta por 7277 alimentos, como sumos de maçã, uva, pêra, entre outros, e purés de maçã. De modo geral, os resultados obtidos evidenciaram a escassa informação quanto aos consumos da população infantil e, que apenas 2,4 % das amostras apresentavam teores superiores a 50 µg/Kg, indicando que os produtos que circulam na UE apresentam uma boa qualidade sanitária em relação à contaminação com patulina. Quanto aos purés de fruta revelaram que 7,2 % das amostras estavam contaminadas com valores entre 0,25 µg/kg (LOD) até 86 µg/kg (Majerus e Kapp, 2002).

2.5.2.1. Consumo infantil

A diferença do consumo alimentar entre crianças e adultos significa que, para uma determinada concentração de um contaminante, uma criança irá estar sujeita a uma exposição maior (em termos de mg/kg peso corporal) comparativamente a um adulto que consuma a mesma quantidade de maçã (Beretta *et al.*, 2000).

As frutas que podem ser introduzidas na alimentação a partir do sexto mês de vida são importantes fornecedores de vitaminas, minerais e fibras. Os nutrientes adquiridos através de uma dieta rica em fruta contribuem para a prevenção do cancro e de doenças cardiovasculares. A maçã, a pêra e a banana são habitualmente as primeiras frutas a serem introduzidas na alimentação do lactente. Em Portugal, o consumo de sumo e purés de frutas ajuda a cumprir a recomendação alimentar, sendo que o consumo de sumo de fruta corresponde a 50 % de todas as porções de fruta consumidas por crianças e adolescentes dos dois aos 18 anos, e 1/3 de todas as frutas e vegetais consumidos pelos pré-escolares (Raiola *et al.*, 2012).

Na UE, o consumo de sumos de frutas e néctares varia consideravelmente entre os Estados Membros, dependendo das condições climáticas e de hábitos de consumo, que atingiram em média, 110 mL por dia em 2007 (Raiola *et al.*, 2012).

Um estudo conduzido em Portugal (EPACI, 2012), com objetivo de definir o padrão alimentar precoce e a sua influência no estado de nutrição das crianças portuguesas nos primeiros anos de vida, revelou que 93 % da amostra consumia fruta fresca diariamente e que 11 % consumia puré de fruta (fruta em boião) (Moreira *et al.*, 2012).

2.6. Ocorrência da patulina em géneros alimentícios

De forma a avaliar a exposição das crianças à patulina, é importante conhecer os níveis de contaminação dos alimentos destinados a lactentes e crianças jovens. Neste âmbito, ao longo da última década têm sido publicados diversos estudos de ocorrência de patulina em diversos países com o objetivo de avaliar a extensão e os níveis de contaminação de maçãs e de produtos à base de maçã, entre outras matrizes.

A tabela 2 reúne os dados recentes sobre a ocorrência de patulina em vários alimentos à base de maçã, como sumos e purés de fruta, destinados à alimentação infantil.

Tabela 2: Ocorrência de Patulina em produtos alimentares à base de maçã, segundo estudos recentes (2002-2020).

País	Período de recolha de amostras	N	Tipo de amostras	N positivo	Teores ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)		LOD/LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)	Técnica analítica	Referência Bibliográfica
					Média e desvio padrão	Min. – Máx.			
Paquistão	2017	237	Maçãs e sumos de fruta (incluindo maçã)	136	15 $\mu\text{g}/\text{kg}$	<LOD – 120,5	LOD: 0,04 LOQ: 0,12	HPLC-UV	(Iqbal <i>et al.</i> , 2018)
Sérvia	2013 - 2015	142	Sumos de fruta (sabor a maçã e multifrutos)	73 (51,4%)	8,4 \pm 10,5	65,4	LOD: 0,4 LOQ: 1,0	HPLC-UV	(Torović <i>et al.</i> , 2018)
Sérvia	2013 - 2015	214	48 sumos de maçã; 66 purés de maçã; 100 sumos de maçã (com palhinha);	75 (35%) (Purés de fruta: 16,7%)	3,5 \pm 2,2 (sumos e purés de fruta) 2,4 \pm 5,2 (sumos com palhinha)	8,3 (sumos de fruta) 7,7 (purés de fruta) 30,2 (sumos de fruta)	LOD: 0,4 LOQ: 1,0	HPLC-UV	(Torović <i>et al.</i> , 2017)
Irão	2012	32	Sumo e puré de fruta (maçã e pêra)	10 (31%)	34,21 \pm 25,26	6 – 173 (sumo) 37 (puré de maçã)	LOD: 2,0 LOQ: 6	HPLC	(Azizi e Rouhi, 2013)
Espanha	2011	108	Sumo de maçã, Néctares e Puré de Fruta	23,1% (purés de fruta: 0%)	-	2,5 – 126,9	-	HPLC	(Marín <i>et al.</i> , 2011)
Portugal	Agosto 2007 – Março 2009	144	68 sumos de maçã 76 purés de maçã	33 (23%) (puré de fruta: 7%)	-	1,2 – 42	LOD: 1,2 LOQ: 3,9	SPE-HPLC-UV	(Barreira, Alvito e Almeida, 2010)

AC – Agricultura Convencional; AB – Agricultura biológica; GC-MS – Gas Chromatography-mass spectroscopy; HPLC – High-performance liquid chromatography; SPE-HPLC-UV – High-performance liquid chromatography with solid-phase extraction and UV detection; LOD – Limite de deteção; LOQ – Limite de quantificação; ND – Não divulgado;

Tabela 2: Ocorrência de Patulina em produtos alimentares à base de maçã, segundo estudos recentes (2002-2020) (cont.).

País	Período de recolha de amostras	N	Tipo de amostras	N positivo	Teores ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)		LOD/ LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)	Técnica analítica	Referência Bibliográfica
					Média e desvio padrão	Min. – Máx.			
Itália	2008 - 2009	120	60 sumos de maçã (40 AC, 20 AB) 60 sumos de multifrutos (40 AC, 20 AB)	78 (65%)	6,28	3 – 9	LOD: 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LOQ: 3 $\mu\text{g}/\text{L}$	HPLC	(Bonerba et al., 2010)
Argentina	2009	45	Produtos à base de maçã (marmelada, compota, doce e puré)	10 (22%) (Puré de maçã: 9%)	123,0	22 – 221	Marmelada e compota LOD: 2,8 LOQ: 4,7 Puré de fruta LOD: 3,8 LOQ: 6,3	SPE	(Funes e Resnik, 2009)
Cancun, China	2009	95	Sumo de fruta, Sumo concentrado e puré de maçã	19 (20%)	20,4	<1,2 – 67,3	LOD: 1,2 LOQ: 1,8	HPLC-UV	(Yuan et al., 2010)
Portugal	2008	33	Cidra, puré de maçã para lactentes e sumo de maçã	25 (77,8%)	-	2,1 – 12,6	LOD: 0,4	HPLC GC-MS	(Cunha, Faria e Fernandes, 2009)
Valência, Espanha	2006	53	Produtos à base de maçã (sumo, puré, iogurte, cidra, cereais, maçã)	14 (26%) amostras, sendo que 6 (33%) puré de maçã	-	1,5 – 50,9	LOD: 0,1 LOQ: 0,3	SPE-LC-UV GC-MS	(González-Osnaya et al., 2007)

AC – Agricultura Convencional; AB – Agricultura biológica; GC-MS – *Gas Chromatography-mass spectroscopy*; HPLC – *High-performance liquid chromatography*; SPE-HPLC-UV – *High-performance liquid chromatography with solid-phase extraction and UV detection*; LOD – Limite de deteção; LOQ – Limite de quantificação; ND – Não divulgado;

Tabela 2: Ocorrência de Patulina em produtos alimentares à base de maçã, segundo estudos recentes (2002-2020) (cont.).

País	Período de recolha de amostras	N	Tipo de amostras	N positivo	Teores ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)		LOD/ LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)	Técnica analítica	Referência Bibliográfica
					Média e desvio padrão	Min. – Máx.			
Itália	2004	169	Sumos de fruta (maçã, pêra) e Puré de maçã	57 (33,7%)	1,15 AC 4,78 AB	69,3	LOQ: 0,5	HPLC	(Piemontese, Solfrizzo e Visconti, 2005)
Itália	2003	40	sumo maçã 100%, sumo multifrutos, puré de maçã e vinagre de maçã	11 (27,5%)	26,7	1,4 $\mu\text{g}/\text{L}$ – 74,2	LOD: 5 LOQ: 10	HPLC	(Ritieni, 2003)
UE (Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, Espanha, França, Holanda Inglaterra Itália, Portugal, Suécia)	2002	7277	sumos de maçã, uva, pêra, entre outros, e purés de maçã	ND	ND	ND - 3533	Varia consoante cada país	HPLC-UV	(Majerus e Kapp, 2002)

AC – Agricultura Convencional; AB – Agricultura biológica; GC-MS – *Gas Chromatography-mass spectroscopy*; HPLC – *High-performance liquid chromatography*; SPE-HPLC-UV – *High-performance liquid chromatography with solid-phase extraction and UV detection*; LOD – Limite de deteção; LOQ – Limite de quantificação; ND – Não divulgado;

Conforme apresentado na tabela 2, os valores de incidência de contaminação por patulina foram elevados, associado ao nível de contaminação também este elevado, com níveis superiores a 10 µg/kg em sumos de maçã e purés de fruta. A incidência de contaminação por patulina é um problema a nível mundial. De facto, a maioria dos dados disponíveis sobre a ocorrência de patulina referem, como principais alimentos afetados, as maçãs e produtos produzidos à base de maçã. Contudo, esta micotoxina também foi identificada em pêras, pêsegos, morangos, mirtilos, cerejas, damascos e uvas (Majerus e Kapp, 2002).

2.7. Efeito dos processos tecnológicos alimentares

A patulina pode resistir a várias operações de tecnologia alimentar, como aquecimento e moagem. A fermentação parece destruir a patulina e, como tal, não é detetada em bebidas alcoólicas produzidas a partir de fruta, nem em vinagres de fruta. Apesar da fermentação alcoólica de sumos de fruta destruir a patulina, foi detetada patulina em produtos fermentados aos quais foi acrescentado sumo de maçã depois da fermentação. A patulina é relativamente estável à temperatura, em especial em pH ácido. Verificou-se que tratamentos curtos a altas temperaturas (150 °C) resultam numa redução até 20 % das concentrações de patulina. Contudo, o tratamento térmico por si só não é suficiente para garantir um produto isento de patulina. No caso dos sumos de maçã, o processamento térmico (pasteurização) parece reduzir apenas de forma moderada o teor de patulina, pelo que a toxina inicialmente presente no sumo de maçã irá resistir aos processos de pasteurização e poderá estar presente no produto final (loi et al., 2017).

Vários métodos de degradação de patulina têm sido testados. Alguns métodos, são utilizados como aditivos nos sumos e purés à base de maçã, mas que se verificou ter impacto na redução dos teores de patulina. Da variedade de produtos químicos estudados, os mais promissores são o ácido ascórbico, amónio, permanganato de potássio, dióxido de enxofre, ozono e algumas vitaminas do complexo B (Burroughs, 1977; Yazici e Velioglu, 2002). O ácido ascórbico parece provocar a redução da patulina presente em sumo de maçã, apesar de não terem sido completamente determinadas as condições ótimas para a inativação. Ligeiras reduções de patulina pelo ácido ascórbico foram relatadas, num estudo que observou a redução de 5 % após 3 horas e 36 % após 44 horas (Frémy et al., 1995). A degradação da patulina durante o armazenamento

também foi observada. O conteúdo de patulina num sumo de maçã com ácido ascórbico adicionado foi reduzido em 70 %, verificando-se uma redução de apenas 30 % no sumo de maçã sem adição de ácido ascórbico, após um período de 34 dias (Drusch, Kopka e Kaeding, 2007).

A presença e a extensão da contaminação por patulina em produtos processados servem como um indicador da qualidade da fruta utilizada no processamento e como parâmetro de qualidade do produto (Moake, Padilla-Zakour e Worobo, 2005; Sabino, 2008).

2.8. Vulnerabilidade infantil

A infância representa um período de vida do ser humano no qual ocorrem várias alterações, nomeadamente anatómicas, fisiológicas, metabólicas, funcionais, toxicocinéticas e toxicodinâmicas. Os órgãos passam por um rápido desenvolvimento durante a gestação e durante a infância os órgãos ainda se encontram em formação e maturação, resultando em sensibilidades potencialmente diferentes a exposições químicas em comparação com um adulto. Até aos 3 anos, as crianças estão em constante crescimento e apresentam necessidades nutricionais elevadas, sendo especialmente dependentes dos seus educadores. Além disso, a infância é igualmente considerada um período formativo onde os hábitos e as preferências são estabelecidas, bem como o desenvolvimento e manutenção de comportamentos saudáveis (Afonso *et al.*, 2012). As crianças constituem um grupo populacional muito vulnerável à exposição por contaminantes diferenciando-se dos adultos, principalmente pelos seus fatores intrínsecos e os extrínsecos. Durante o desenvolvimento infantil ocorrem alterações intrínsecas, influenciadas significativamente por fatores genéticos, que representam um fator fundamental na determinação da suscetibilidade à exposição diária a contaminantes através de diferentes vias: cutânea, respiratória e alimentar (WHO, 2011).

Os primeiros efeitos adversos podem ter consequências ao longo da vida e estar na origem do desenvolvimento de doenças crónicas, incluindo doenças neurológicas e doenças do sistema imunológico.

As principais diferenças fisiológicas e de exposição entre as crianças e adultos incluem: pequeno tamanho e grande área superficial em relação ao peso; uma taxa metabólica mais alta; crescimento rápido; corpo diferente e composição; e imaturidade funcional dos órgãos e outros sistemas do corpo (WHO, 2011).

Um dos principais fatores extrínsecos que afetam a suscetibilidade à exposição a contaminantes é a alimentação e o contato direto com o meio ambiente. Muitos contaminantes existentes no meio ambiente contaminam a cadeia alimentar. É exemplo, o facto dos lactentes estarem expostos a substâncias químicas através do leite materno, a sua primeira fonte de alimento e através da ingestão indireta, caso a criança manuseie ou consuma alimentos que estiveram em contato com o solo ou outras superfícies contaminadas (Saleh e Goktepe, 2019).

É igualmente relevante, a relação entre o peso corporal e a quantidade de alimento ingerido, uma vez que as crianças consomem mais alimentos e bebidas por quilograma de peso corporal que os adultos. O baixo peso corporal de uma criança pode torná-la mais propício a infeções e, em situações mais graves, causar a morte. Esta situação verifica-se sobretudo em países em desenvolvimento, onde os recursos são escassos e as crianças tornam-se extremamente vulneráveis às exposições ambientais (Speijers e Speijers, 2004).

2.9. Metodologias analíticas

A maioria das micotoxinas encontram-se nos alimentos em concentrações que requerem métodos analíticos sensíveis e confiáveis para sua deteção. Devido à variedade de estruturas químicas destes compostos, não é possível usar um método padrão para detetar todas as micotoxinas (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009).

A metodologia analítica para a análise de micotoxinas compreende três etapas fundamentais: extração da totalidade ou parte da amostra, purificação do extrato obtido, quantificação e confirmação da presença da micotoxina avaliada.

Os métodos de extração e purificação devem ser confiáveis e são fundamentais para o sucesso da análise. Esta fase de extração e purificação é geralmente a mais morosa e são dependentes da matriz e da estrutura da toxina (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009). Foram desenvolvidos uma variedade de métodos para a extração, deteção, quantificação e confirmação de patulina em géneros alimentícios.

Inicialmente foi validado o método de extração líquido-líquido (LLE) para a determinação de patulina em sumo e puré de maçã, tendo sido adotado como método oficial da *Association of Official Analytical Chemistry (AOAC)*. O solvente de extração utilizado correspondia ao acetato de etilo ($C_4H_8O_2$) e o solvente de purificação ao carbonato de

sódio (Na_2CO_3). Este método é consideravelmente dispendioso e moroso devido ao uso elevado de solventes orgânicos, e os procedimentos de limpeza podem degradar a patulina, uma vez que é mais estável em meio ácido. Por este motivo, esta etapa tem vindo a ser substituída por novos métodos, mais rápidos, como por exemplo, o método de extração em fase sólida (SPE) e a microextração em fase sólida (SPME). O SPE tem sido utilizado por diversos autores na preparação de amostras, como método de extração e/ou purificação de patulina (Turner *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2009)

Os métodos analíticos inicialmente utilizados na deteção e quantificação de micotoxinas em géneros alimentícios baseavam-se inicialmente na cromatografia em camada fina (TLC), tendo sido considerada como o método oficial da AOAC (Turner *et al.*, 2015). Apesar de esta técnica ter sido em muitos casos substituída por métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em fase gasosa (GC), ainda se aplica com alguma frequência na determinação de aflatoxinas, em particular em países em desenvolvimento (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009).

Atualmente, os métodos mais utilizados na quantificação de micotoxinas em alimentos para humanos e animais incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada a vários tipos de detetores, como, detetores ultravioleta (HPLC-UV), detetor de fluorescência (HPLC-FL) ou espectrometria de massa (LC-MS) e a cromatografia gasosa acoplada a vários detetores, tais como o de ionização de chama (GS-FID), de captura eletrónica (GC-ECD) ou de massa (LC-MS) (Turner *et al.*, 2015).

O método de deteção por ultravioleta, através da técnica de HPLC-UV, revela-se mais sensível devido à forte absorção de UV – λ máximo 276 nm (Kralj Cigić e Prosen, 2009). Contudo, trata-se de um método dispendioso e complexo. Foi considerado o método oficial (método 995.10), adotado pela AOAC, para sumo de maçã com um limite de deteção de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Kralj Cigić e Prosen, 2009; Moake, Padilla-Zakour e Worobo, 2005). Atualmente, para confirmar a presença de patulina geralmente são utilizadas técnicas de deteção mais específicas, como MS seguido por LC ou separação por GC (Moake, Padilla-Zakour e Worobo, 2005).

O ensaio imunoenzimático ELISA (do Inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um dos métodos rápidos mais utilizados para o rastreio de micotoxinas. Os testes ELISA são ensaios imunoenzimáticos, nos quais o princípio básico reside na utilização de anticorpos, analitos (antígenos, micotoxinas, etc.) ou análogos dos analitos ligados a enzimas para amplificação do sinal detetado. De facto, o uso de enzimas neste tipo de

testes permite catalisar a reação de uma dada espécie química de modo a esta dar origem a um produto com uma cor diferente, medida por espectrofotometria ou por colorimetria. Esta metodologia permite a deteção de micotoxinas em vários alimentos, desde oleaginosas a cereais, leite e carnes, entre outros. Existem vários tipos de testes ELISA: direto, indireto, *sandwich*, competitivo e não competitivo, mas apenas é aplicável nas micotoxinas o formato competitivo devido ao tamanho destas (Turner *et al.*, 2015). O método ELISA encontra-se comercialmente disponível em *kits* e permite quantificar micotoxinas quantitativa e qualitativamente. As vantagens do método ELISA passam por terem um procedimento simples de preparação da amostra e não exigirem equipamento especializado. Por outro lado, este método, apesar de ter limites de deteção comparáveis com os métodos cromatográficos, tem como desvantagem a possibilidade de apresentar falsos positivos e falsos negativos. De facto, os métodos rápidos aprovados oficialmente, nos quais o método ELISA se insere, são utilizados sobretudo para análise de *screening*, uma vez que apesar de os resultados negativos obtidos poderem ser considerados como efetivamente negativos, os resultados positivos devem ser confirmados por métodos de referência. Desta forma, este método é comumente utilizado como método de rastreio, sendo necessária a confirmação dos testes com resultado positivo, por outros métodos de análise mais sensíveis e precisos, de modo a avaliar com maior rigor os níveis de contaminação por micotoxinas (Kralj Cigić e Prosen, 2009).

Para os métodos ELISA semi-quantitativos, é necessário estabelecer uma curva de calibração para o cálculo da concentração das amostras medidas posteriormente. Quando se utilizam *kits* ELISA comercialmente disponíveis, os padrões para a preparação da curva de calibração estão incluídos no *kit*. A curva de calibração deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, da equação da regressão linear e o coeficiente de correlação. Assim, torna-se necessário o uso de um número suficiente de soluções-padrão para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. A curva de calibração pode ser construída usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados no intervalo definido (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009).

2.10. Limites e Legislação

Devido à gravidade do efeito das micotoxinas na saúde humana e animal, a União Europeia (UE) tem elaborado legislação específica e programas de controlo

estabelecendo os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios incluindo as micotoxinas, assim como, sobre as determinações analíticas, tais como:

- O Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (Comissão Europeia, 2005).
- O Regulamento (CE) N.º 401/ 2006 de 23 de Fevereiro que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios (Comissão Europeia, 2006).
- A Diretiva 2006/125/CE da Comissão de 5 de Dezembro de 2006, relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens (Comissão Europeia, 2006).

A patulina pertence a uma pequena lista de micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, fumonisinas e tricotecenos) com níveis nos alimentos regulamentado em muitos países , tendo sido os países europeus, os primeiros a propor limites máximos (Puel, Galtier e Oswald, 2010). Atualmente cerca de 100 países no mundo têm legislação ou recomendações relativas aos teores máximos de micotoxinas em alimentação humana e animal.

Na UE e nos EUA, com a preocupação crescente com os potenciais efeitos negativos para a saúde da exposição à patulina foram instituídos níveis máximos para o conteúdo de patulina em derivados de maçã. Os limites máximos (LMs) para a patulina nos alimentos destinados à alimentação humana têm sofrido alterações ao longo dos anos. Com base nos valores definidos de DDAMP, foi legislado o nível máximo de patulina em produtos à base de maçã pela Comissão Europeia, pela autoridade de segurança alimentar americana FDA, pelo Ministério da Saúde da República Popular da China, e pela Agência Governamental *Health Canada* (China, 2011; Comissão Europeia, 2006; Health Canada, 2012; US-FDA, 2005).

Com o objetivo de diminuir a exposição à patulina, a Comissão Europeia estabeleceu limites máximos nos alimentos que mais contribuem para a exposição humana a esta micotoxina. Desde 2003, com o Regulamento Europeu (CE) nº 1425/2003, foram estabelecidos os níveis máximos de patulina em sumos de fruta, em especial no sumo de maçã, bem como em produtos sólido à base de maçã, como a compota e o puré de fruta, mais restritivos quando se destinam a ser consumidos por lactentes e crianças

jovens (Comissão Europeia, 2003). Estes limites máximos foram mantidos no Regulamento (CE) n° 1881/2006 (Comissão Europeia, 2006). Os limites máximos estabelecidos na UE para a patulina em alimentos destinados à alimentação humana encontram-se resumidos na tabela 3.

Atualmente, a autoridade de segurança alimentar americana FDA limita a patulina a 50 µg/kg. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um nível máximo aceitável de 50 µg/kg de patulina em sumo de maçã. Para produtos sólidos como compota ou puré de maçã o limite situa-se nos 25 µg/kg.

Tabela 3: Limites máximos de patulina estabelecidos pela Comissão Europeia (1881/2006/EC, 2006).

Géneros alimentícios	Limites máximos (µg/kg)
Sumos de fruta, sumos de fruta concentrados reconstituídos e néctares de frutas	50,0
Bebidas espirituosas, sidra e outras bebidas fermentadas derivadas de maçã ou que contenham sumo de maçã	50,0
Produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã destinado ao consumo direto, com exceção dos géneros alimentícios referidos nos pontos anteriores	25,0
Sumo de maçã e produtos sólidos de maçã incluindo compota e puré de maçã destinados a ser consumidos por lactentes e crianças jovens e rotulados e vendidos enquanto tal	10,0
Alimentos para bebés, com exceção de alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças jovens	10,0

O valor da dose semanal admissível provisória (DSAP) foi, inicialmente, estabelecido pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) em 7 µg/Kg por peso corporal/semana (Borchers et al., 2010). Em meados de 1995, foi estabelecido pela mesma entidade, o valor de 0,43 µg/Kg de peso corporal (p.c.)/dia como a Dose Diária Admissível Máxima Provisória (DDAMP), baseado no nível sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) de 43 µg/kg p.c./dia (Martins et al., 2002; The World Health Organization, 1995). Anos mais tarde, foi estabelecido o valor de 0,4 µg/Kg p.c./dia, que se mantém como DDAMP à data (Torović et al., 2017; US-FDA, 2005).

PARTE B - EXPERIMENTAL

I. JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS DO ESTUDO

As crianças constituem um grupo vulnerável da população devido às suas características fisiológicas e metabólicas, apresentando uma dieta restrita nos primeiros tempos de vida. O facto de poderem estar expostas a contaminantes presentes nos alimentos, como as micotoxinas, constitui uma preocupação pelo que urge desenvolver estudos de exposição a contaminantes através da alimentação (Speijers e Speijers, 2004).

É importante relembrar que parte significativa da ingestão alimentar de lactentes e crianças se deve a produtos comerciais, cuja composição é na sua maioria à base de maçã. A patulina encontra-se largamente presente na maçã, pelo que se considera este fruto como um importante veículo de exposição dos bebés a esta micotoxina. Além disso, um relatório da EFSA destaca que as funções gástrica, pancreática e biliar não se encontram totalmente desenvolvidas nesta faixa etária (Hardy *et al.*, 2017).

O presente estudo pretendeu detetar e quantificar a patulina em purés de fruta que incluíssem maçã, comercializados em Portugal, destinados a lactentes e crianças jovens.

Deste modo foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- Avaliação da ocorrência e dos níveis de contaminação de purés de fruta, com maçã na sua composição, destinados à alimentação infantil, disponíveis no mercado português.
- Avaliação da exposição e análise de risco das crianças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

Foram adquiridas 40 amostras de purés à base de fruta, disponíveis comercialmente em grandes supermercados e lojas de produtos biológicos da região de Coimbra, entre janeiro e fevereiro de 2020. A amostragem (de conveniência) foi realizada, tendo como critério de inclusão a presença de maçã e rotulados e vendidos enquanto produtos destinados a lactentes e crianças jovens. As amostras analisadas representam a grande maioria das marcas disponíveis no mercado, no período em que foram adquiridas.

A caracterização das amostras encontra-se esquematizada na tabela 4 de acordo com a informação constante no rótulo. Foram incluídos purés de fruta à base de maçã, de produção em modo convencional (n=26) e biológico (n=14). Dez amostras (25 %) eram exclusivamente produzidas à base de puré de maçã, e trinta amostras (75 %) continham maçã num intervalo entre 32 % e 99,6 %, conforme identificado na lista de ingredientes que compõe o rótulo. Relativamente à composição, as amostras foram categorizadas em: 1- 100% maçã; 2 – maçã e frutas tropicais; 3 – Maçã e legumes; 4 – Maçã e outras frutas; 5 – Maçã e outros. As amostras analisadas eram comercializadas como marca genérica (*Sin. Marca banca* n=14) e de marca do produtor (n=26). Todas as amostras foram produzidas na União Europeia, sendo que 11 foram produzidas em Portugal, 10 em França, 7 em Espanha, 8 em Itália e 4 na Alemanha.

As amostras foram armazenadas de acordo com a indicação do fabricante presente na rotulagem até análise posterior.

Tabela 4: Caracterização das amostras incluídas no estudo.

Nº	Lista de Ingredientes	Teor de maçã (%)	Modo de Produção	Origem	Modo de Comercialização
1	Maçã (100%) e ácido ascórbico (vitamina C)	100,0	Convencional	França	Comer à colher
2	Maçã (65%), Pêra (35%), concentrado de sumo de limão, ácido ascórbico (vitamina C)	65,0	Convencional	França	Comer à colher
3	Maçã (80%), kiwi (10%), ananás (10%), vit C	80,0	Convencional	França	Comer à colher
4	Maçã (65%), Pêra (35%), ácido ascórbico (vitamina C)	65,0	Convencional	Espanha	Beber
5	Maçã (76%), Banana (24%), ácido ascórbico (vitamina C)	76,0	Convencional	Espanha	Beber
6	Maçã (100%), ácido ascórbico	100,0	Convencional	França	Comer à colher
7	maçã (82%), morango (18%)	82,0	Biológico	Alemanha	Beber
8	Maçã 45% Pêra 45% espinafres 10%	45,0	Biológico	Itália	Beber
9	maçã 80%, manga 15%, sumo maracujá 5%	80,0	Biológico	Itália	Beber
10	100% maçã	100,0	Biológico	Alemanha	Comer à colher
11	Maçã 43%, água, pêssego 21%, sumo concentrado de maçã 6%, sêmola de arroz	43,0	Biológico	Alemanha	Comer à colher
12	Maçã 35%, pêra 29,5%, água, sumo concentrado de maçã 6%, semolina de arroz, sumo concentrado de limão	35,0	Biológico	Alemanha	Comer à colher
13	maçã (99,6%), espinafre	99,6	Biológico	Espanha	Comer à colher
14	Puré de maçã (78%), puré de banana (22%), vitamina C e sumo de limão	78,0	Convencional	Espanha	Beber
15	Maçã (94%), amido de milho, arroz e vitamina C	94,0	Biológico	Portugal	Comer à colher
16	maçã (46%), banana (44%), sumo limão (10%)	46,0	Biológico	Espanha	Beber
17	Maçã (94,2%), sumo maçã concentrado, sumo limão concentrado	94,2	Convencional	França	Beber
18	maçã (93%), açúcar, antioxidante: ácido ascórbico	93,0	Convencional	França	Comer à colher

Tabela 4: Caracterização das amostras incluídas no estudo (cont.)

Nº	Lista de Ingredientes	Teor de maçã (%)	Modo de Produção	Origem	Modo de Comercialização
19	maçã (64,9%), marmelo (29,9%), banana (5%), ácido ascórbico	64,9	Convencional	França	Comer à colher
20	maçã (72,9%), ameixa seca (16,4%), água, ácido ascórbico	72,9	Convencional	França	Comer à colher
21	Maçã (55%), alperce (23%), banana (22%)	55,0	Biológico	França	Beber
22	Maçã (50%), Pêra (30%), Pêssego (20%)	50,0	Biológico	França	Beber
23	Puré de maçã (66%), puré de batata doce (21%), puré de cenoura (13%), sumo limão concentrado	66,0	Convencional	Itália	Beber
24	Maçã (100%), ácido ascórbico	100,0	Convencional	Espanha	Beber
25	Maça golden (86%), manga (14%)	86,0	Convencional	Portugal	Comer à colher
26	Maçã golden (81,5%), banana (18,5%)	81,5	Convencional	Portugal	Comer à colher
27	Maçã Golden (100%)	100,0	Convencional	Portugal	Comer à colher
28	Maça golden (60%), manga (40%)	60,0	Convencional	Portugal	Comer à colher
29	Puré de maçã (32%), Banana (24%), Pêssego (18%) e alperce, Sumo de laranja (20%) e limão	32,0	Convencional	Portugal	Beber
30	Maçã (51,2%), pêra (47%), sumo de pêra concentrado, vitamina C	51,2	Convencional	Portugal	Comer à colher
31	Puré de maçã (100%)	100,0	Convencional	Itália	Beber
32	Maçã 69,9% pêssego 29,9% vitamina C	69,9	Convencional	Espanha	Beber
33	Maçã (80%), puré de manga concentrado (14%), água, vitamina C	80,0	Convencional	Portugal	Comer à colher
34	Maçã (69,7%), banana (30%), sumo de limão concentrado e vitamina C	69,7	Convencional	Portugal	Comer à colher
35	Maçã (69,9%), pêra (30%) e vitamina C	69,9	Convencional	Portugal	Comer à colher
36	Puré de maçã (99,9%), vitamina C	99,9	Convencional	Portugal	Comer à colher

Tabela 4: Caracterização das amostras incluídas no estudo (cont.).

N°	Lista de Ingredientes	Teor de maçã (%)	Modo de Produção	Origem	Modo de Comercialização
37	Maçã (60%), Pêra (40%), vitamina C	60,0	Convencional	Itália	Beber
38	Maçã (80%), manga (20%)	80,0	Biológico	Itália	Comer à colher
39	maçã 85% morango 10% mirtilo 5%	85,0	Biológico	Itália	Beber
40	Maçã (80%), ameixa (20%)	80,0	Biológico	Itália	Comer à colher

Todas as amostras foram analisadas em duplicado dentro do respetivo prazo de validade. A recolha de amostra foi efetuada a partir de uma única embalagem, depois de homogeneizada.

2.2. Equipamentos e material utilizado

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador magnético (*Agimatic-S, Selecta, Barcelona, Espanha*)
- Vórtex
- Balança (*RadwagWTC[®] 600, Reagente-5*)
- Centrifuga (*Sigma[®] 3K15 centrifuge, Reagente 5, Porto*)
- Espectrofotómetro (*Optic Iymen System[®] 2100-C*)

2.3. Material e reagentes

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado no presente estudo. Não se apresenta o material de uso corrente de laboratório.

- Pipetas de precisão (*Gilson[®]*) de 10, 20, 100 e 1000 μL
- Tubos *eppendorf[®]*
- Tubos de *falcon (VWR[®])*
- Água destilada
- Metanol (*Sigma[®]*)
- Kit comercial LLC – *Patulin ELISA Test Kit (REAGEN[®] Moorestown, EUA) – figura 2*

Todas as soluções foram preparadas e armazenadas em material de vidro e preservadas ao abrigo da luz e a uma temperatura entre $5 \pm 3^\circ\text{C}$.



Figura 2: Soluções padrão de patulina incluídas no kit ELISA

2.4. Metodologia analítica

Foram aplicadas as boas práticas laboratoriais, incluindo descontaminação de materiais para evitar contaminação cruzada e manuseio de segurança específico de soluções da micotoxina. As condições de armazenamento correctas foram aplicadas para garantir a estabilidade das micotoxinas nas amostras (temperatura ambiente) e soluções padrão de micotoxinas (2 – 8 °C). Todas as condições estão de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante.

A determinação da patulina, nas amostras de purés de fruta foi realizada através da técnica imunoenzimática ELISA de formato competitivo, através de um kit comercial.

2.5. Extração e preparação da amostra

Foi diluído 1 g de cada amostra de puré em 5ml de metanol 70 %, e a mistura foi agitada durante 1 minuto num agitador magnético. Da amostra homogeneizada, foi retirado 1,5 mL e centrifugado a 4000 g à temperatura ambiente (20 – 25 °C). Posteriormente, foi transferido 0,5 mL do sobrenadante para um tubo, adicionado 0,5 mL da solução tampão de extração de amostras. Foram acrescentados 100 µL da amostra por poço. O fator de diluição foi de 10.

2.6. Determinação por ensaio imunoenzimático

Adicionou-se 100 µL de cada solução padrão (0; 0,1; 0,6; 1,25; 1,5 e 3 µg/kg) em duplicado nos poços – por ordem crescente de concentração. Fez-se o mesmo

procedimento para cada. Adicionou-se 50 µL de conjugado enzimático (peroxidase do rábano) e durante 1 minuto misturou-se suavemente, agitando a placa manualmente em movimentos circulares. Procedeu-se à incubação, durante 60 minutos, a uma temperatura entre 20-25 °C utilizando papel de alumínio para proteção da luz solar direta.

Após o passo de incubação, os poços foram esvaziados e procedeu-se à lavagem dos mesmos em 3 ciclos usando 250 µL de solução de lavagem. Após a última lavagem, a placa foi invertida e seca. Posteriormente, foi adicionado 100 µL de substrato enzimático HRP (TMB) e foi novamente sujeita a um período de incubação com duração de 20 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Para finalizar a reação, foi adicionado 100 µL de solução *STOP* para parar a reação enzimática. Por fim e de imediato foi medida a absorvância a 450 nm.

2.7. Ingestão Diária Estimada (EDI)

A avaliação da exposição às micotoxinas depende não só do nível destas substâncias nos alimentos, como do consumo desses alimentos pelos indivíduos, podendo diferir por regiões do país ou culturas.

A Ingestão diária estimada (EDI) de patulina foi efetuada de acordo com a fórmula, $EDI = \frac{\sum c \times C}{N \times D \times K}$, na qual EDI corresponde à ingestão diária estimada, $\sum c$ à soma da concentração de patulina nas amostras analisadas, C à ingestão média anual estimada, N ao número de amostras analisadas, D ao número de dias num ano e K ao peso corporal médio.

O Regulamento (CE) nº 1881/2006 impõe como limite para a presença de patulina o valor de 10 µg/kg (µg/L) para alimentos destinados a lactentes, com base no valor de DDAMP de 0,4 µg/kg p.c./dia definido pela JECFA (Codex Alimentarius, 2017; Comissão Europeia, 2006). De acordo com a Diretiva 2006/125/CE, refere-se por lactentes ao grupo de crianças com menos de 12 meses de idade e por crianças jovens, as crianças com idades compreendidas entre 1 e 3 anos (Comissão Europeia, 2006).

A percentagem de ingestão diária tolerável (%TDI) do consumo de purés de fruta foi calculada da seguinte forma: %TDI = EDI/DDAMP × 100, considerando o valor de DDAMP indicado anteriormente. Foram considerados diferentes cenários, nomeadamente em termos de peso, com base no peso corporal médio (Percentil50),

para cada faixa etária (Ministério da Saúde, 2013) e teor (mínimo, médio e máximo) determinado.

Na ausência de consumos oficiais de purés de fruta para a população portuguesa foram criados dois cenários para realizar a avaliação de risco. No primeiro cenário, os dados de consumo diário resultam de um estudo piloto decorrido em Portugal para avaliação do consumo diário de produtos à base de fruta em crianças dos 5 aos 36 meses (Pereira, Vasco e Crespo, 2013). Com base neste estudo, foi considerado um consumo diário de 21 gramas para a faixa etária entre os 5 e os 12 meses, e dos 13 aos 36 meses foi considerado um consumo de 28 gramas. No segundo cenário, considerou-se um consumo diário de uma embalagem (boião), com um valor médio de 100 gramas, por lactente ou criança jovem.

2.8. Análise estatística

Os dados foram editados e categorizados em *Microsoft® Excel* (Versão 16.42) e realizada a análise descritiva preliminar. Posteriormente foi realizada a análise estatística através do Programa *GraphPad Prism 8®*. Considerando a distribuição não-normal, foram aplicados testes não-paramétricos para comparação entre amostras independentes (teste de *Kruskal-Wallis* e teste de *Mann-Whitney*). Foi considerado o valor de prova de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi utilizado o Kit comercial *REAGEN® LLC – Patulin ELISA Test Kit* para determinação da patulina em purés de fruta. O Kit utilizado permite a execução de um método de triagem rápida, simples e sensível. A metodologia utilizada já se encontra previamente validada pelo fabricante que comercializa o kit. Para o parâmetro da linearidade, estudou-se a linearidade dos padrões (0; 0,1; 0,6; 1,25; 1,5 e 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), através da sua absorvância a 450 nm. A curva de calibração foi determinada por análise de regressão, relacionando a concentração com a absorvância, numa folha de cálculo fornecida pelo fabricante (*Reagen calculate®*). A equação ($y = -0,2904x + 2,2838$) da curva padrão foi utilizada para calcular a concentração de patulina nas amostras analisadas, conforme figura 3. O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,9718

apresentando assim uma tendência linear. O limite de detecção considerado, conforme veiculado nas instruções inclusas no kit, foi 1 µg/kg.

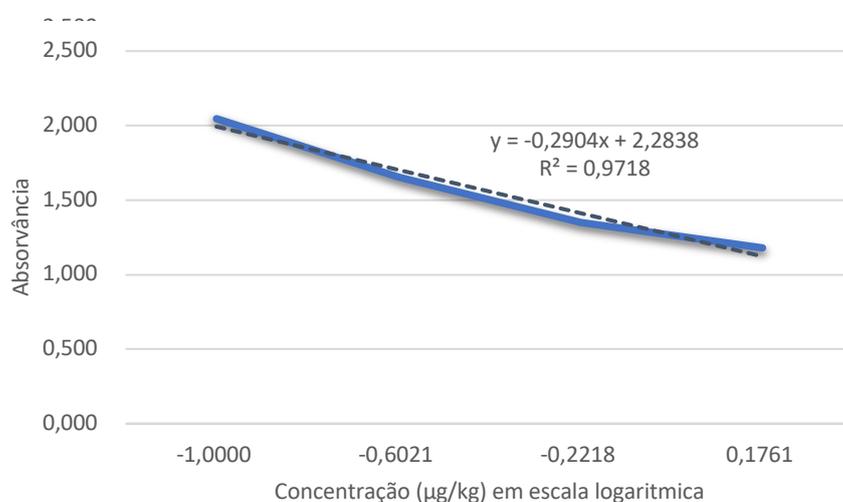


Figura 3: Curva de calibração obtida

Atualmente, o imunoenensaio mais frequentemente aplicado, devido às suas vantagens, é o ELISA. Este método possui alta especificidade e sensibilidade, de rápida aplicação, facilidade de manuseio e é, comparativamente a métodos cromatográficos, pouco dispendioso. É um método bastante aplicado para a detecção e *screening* de micotoxinas em alimentos (Kralj Cigić e Prosen, 2009).

Das 40 amostras de purés de fruta analisadas, verificou-se que todas se encontravam contaminadas com um teor de patulina superior ao limite de detecção (1 µg/kg). Os teores variaram entre 1,43 µg/kg e 23,28 µg/kg, com um valor médio de $5,78 \pm 5,09$ µg/kg. Foram determinados valores superiores ao limite máximo (10 µg/kg; EC, 2006) em 5 amostras (12,5 %), variando entre 10,52 e 23,28 µg/kg.

Neste estudo, a incidência de amostras de purés de fruta com teores de patulina acima do limite legal (10 µg/kg; EC, 2006) foi superior a outros estudos. Um estudo conduzido por Barreira e col. (2010) em Portugal, analisou 144 produtos à base de maçã, entre os quais 68 sumos e 76 purés. Os resultados revelaram que a patulina foi detetada em apenas 7 % dos purés, com um teor máximo de 5,7 µg/kg. Deste modo, todas as amostras analisadas encontravam-se abaixo dos teores máximos regulamentados (Barreira, Alvito e Almeida, 2010). Outro estudo conduzido L. González-Osnaya e col. (2007) refere que 11 % das amostras de sumos e purés de maçã comercializados em

Espanha tinham valores positivos e superiores ao legislado. Relativamente às amostras de purés de fruta, em 33 % da amostra foi detetada patulina num intervalo de concentração entre 7,7 e 28,4 µg/kg (González-Osnaya *et al.*, 2007). Desta forma, os teores de contaminação encontrados no estudo conduzido por L. González-Osnaya e col. (2007) aproximam-se aos encontrados no presente estudo.

De destacar que, nos estudos citados anteriormente, foram utilizadas diferentes metodologias analíticas, nomeadamente, no estudo português (Barreira, Alvito e Almeida, 2010) foi aplicado o método SPE-HPLC-UV (LOD: 1,2 µg/kg) e no estudo conduzido em Espanha (González-Osnaya *et al.*, 2007) foi utilizado o método LLE-LC-UV e confirmada a presença de patulina por GC-MS (LOD: 0,1 ng/mL).

No presente estudo, os teores mais elevados de patulina, superiores ao limite máximo (10 µg/kg) foram determinados em amostras produzidas na Alemanha (15,8 µg/kg), Itália (23,3 µg/kg e 18,1 µg/kg) e França (21,4 µg/kg), e numa amostra produzida em Portugal (10,5 µg/kg). Em relação à **origem das amostras**, não existiu diferença estatisticamente significativa entre amostras produzidas nos diferentes países ($p > 0,05$). Na tabela 5, encontram-se sumariados os valores de ocorrência da patulina de acordo com a origem das amostras.

Tabela 5: Teor (µg/kg) e ocorrência de patulina de acordo com a origem das amostras.

	N/N (%)	Teor médio e desvio padrão	Teor mínimo	Teor máximo
Alemanha	4 (10%)	4,30 ± 6,75	2,00	15,84
Espanha	7 (17,5%)	3,84 ± 0,65	2,56	4,65
França	10 (25%)	6,57 ± 5,61	2,20	21,37
Itália	8 (20%)	7,80 ± 8,15	2,48	23,28
Portugal	11 (27,5%)	4,86 ± 2,19	1,43	10,52

Países como Alemanha, França, Itália e Portugal apresentam, neste estudo, amostras contaminadas com teores acima do regulamentado para lactentes. Num estudo em Itália, foram analisadas amostras de produtos à base de maçã produzidas pela indústria italiana, revelando um intervalo de contaminação das amostras de puré de fruta entre 15,9 e 74,2 µg/kg (Ritieni, 2003). No presente estudo, os teores de contaminação das amostras produzidas em Itália foram inferiores.

O estudo realizado em 2002 para avaliação da exposição à patulina pelos estados membros da UE revela uma incidência de 7,2 % das amostras contaminadas de puré de maçã, sendo que é França o país que apresenta teores de contaminação máxima mais elevados (86 µg/kg) (Majerus e Kapp, 2002).

Quanto à **composição**, as amostras foram categorizadas em: 1- 100% maçã; 2 – maçã e frutas tropicais; 3 – Maçã e legumes; 4 – Maçã e outras frutas; 5 – Maçã e outros. Das amostras com teores superiores ao limite máximo de patulina, três foram classificadas como compostas por “Maçã e frutas tropicais” (18,39 ± 6,88 µg/kg) e duas amostras (16,99 ± 1,62 µg/kg) classificadas como “Maçã e outras frutas”. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 6.

Tabela 6: Ocorrência e teores (µg/kg) de contaminação de acordo com a composição.

	N (%)	N >LM (10 µg/kg; EC, 2006)	Teor médio e Desvio Padrão
1 – 100% maçã	8 (20%)	0	4,25 ± 1,34
2 – Maçã e frutas tropicais	10 (25%)	3	4,63 ± 1,37
3 – Maçã e legumes	3 (7,5%)	0	3,18 ± 0,79
4 – Maçã e outras frutas	9 (22,5%)	2	4,57 ± 1,69
5 – Maçã e outros	5 (12,5%)	0	2,23 ± 0,65

Os purés de fruta que continham na lista de ingredientes a maçã e frutas como pêra, morango, pêsego, alperce, banana e mirtilo apresentaram teores de contaminação superiores aos restantes. Esta questão pode dever-se ao facto da espécie mais importante como produtora de patulina, *Penicillium expansum*, ser frequentemente encontrada nestas frutas (maçã, pêsegos, alperce e peras) (Pal, Singh e Ansari, 2017).

Ainda relativamente à composição, no que diz respeito ao **ácido ascórbico**, a sua presença parece ter um efeito benéfico, dado que nenhuma amostra cujo antioxidante era identificado na lista de ingredientes apresentava teores acima dos autorizados legalmente (4,44 ± 1,84 µg/kg).

A adição de ácido ascórbico parece produzir uma redução nos teores de patulina, tendo sido relatadas estas alterações num estudo que observou a redução de 5 % após 3 horas da adição de ácido ascórbico e 36 % após 44 horas (Frémy et al., 1995). Drush e col. (2007) analisaram o conteúdo de patulina num sumo de maçã com ácido ascórbico

adicionado (Drusch, Kopka e Kaeding, 2007). O teor de patulina foi reduzido em 70 % em 34 dias, contrastando com a redução de apenas 30 % no sumo de maçã sem adição de ácido ascórbico.

Quanto ao **modo de produção**, verificou-se que os quatro teores mais elevados de patulina, foram determinados em purés produzidos em modo biológico em estados membros da UE (15,84, 18,14; 21,37; 23,28 µg/kg). Os teores das amostras de origem biológica variam entre 1,43 µg/kg e 23,28 µg/kg, com um valor médio de $8,01 \pm 7,89$ µg/kg. Acima do limite legal para alimentos destinados à alimentação infantil (>10 µg/kg) foram detetadas quatro amostras. Os teores das amostras de origem convencional variam entre 2,20 µg/kg e 10,52 µg/kg, com um valor médio de $4,52 \pm 1,93$ µg/kg. A quinta amostra que ultrapassou o limite máximo (10µg/kg) foi produzida em modo de produção convencional, em Portugal. Assim, verificou-se que 88 % das amostras contaminadas com níveis superiores ao limite máximo foram produzidas em modo biológico, que pode justificar-se devido ao impedimento na utilização de fungicidas.

De facto, a agricultura biológica é um modo de produção que se baseia num conjunto de princípios e práticas que visam minimizar o impacto humano sobre o ambiente e assegurar que a produção se processa da forma mais natural possível. É um sistema agrícola que procura fornecer ao consumidor, alimentos frescos, saborosos e autênticos e ao mesmo tempo respeitar os ciclos de vida naturais (Baert et al., 2006). Na UE a produção de alimentos de origem biológica obedece ao Regulamento n.º 834/2007 do Conselho, de 28 de Junho de 2007, que define as regras de rotulagem e produção de alimentos biológicos e o sistema de inspeção para este tipo de produtos. Durante a produção em modo biológico, a utilização de produtos como pesticidas, fertilizantes sintéticos, antibióticos, aditivos alimentares e auxiliares tecnológicos, encontram-se limitados (Comissão Europeia, 2007).

Não existem estudos conclusivos sobre o efeito da redução da utilização de pesticidas, sobre a produção de micotoxinas, nomeadamente da patulina. A redução da utilização de fungicidas parece conduzir a uma maior degradação das culturas pelos insetos, originando uma maior invasão pelos fungos e conseqüente produção de micotoxinas (Piqué et al., 2013).

Em Portugal, à semelhança de outros países europeus, o interesse pela agricultura biológica tem vindo a aumentar nos últimos anos. Apesar de ser uma prática antiga, foi a partir dos anos 90 que a agricultura biológica se começou a expandir no nosso país.

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados na Europa com objetivo de analisar os níveis de patulina em alimentos de origem biológica e convencional para determinar o respetivo risco para a saúde humana. Embora a incidência e os níveis de patulina tenham sido, de modo geral, superiores nos alimentos de origem biológica comparativamente aos convencionais, a ingestão de patulina nos grupos populacionais estudados não representa um problema de saúde (Piqué *et al.*, 2013).

Em 2005, um estudo conduzido na Bélgica com o objetivo de comparar a ocorrência de patulina em alimentos processados à base de fruta (sumo de maçã, sumo de pêra e purés de fruta) obtidos a partir de agricultura convencional, biológica e artesanal, concluiu que, embora a incidência de contaminação por patulina em sumos de maçã de origem biológica, convencional e artesanal não seja estatisticamente significativa, as concentrações são mais altas em sumos de maçã biológicos, que em sumos de maçã convencionais e artesanais (Baert *et al.*, 2006).

Um estudo semelhante conduzido em Itália, em 2005, analisou 169 amostras de sumo de maçã, sumo de pêra e purés de fruta de agricultura convencional e biológica (Piemontese, Solfrizzo e Visconti, 2005). Das 40 amostras de puré de fruta, 23 destinavam-se a lactentes, e 3 destas amostras revelaram resultados positivos (1 de origem convencional – maçã e mirtilo; 2 de amostra biológica – maçã e outras frutas). A concentração de patulina foi significativamente mais alta em produtos de origem biológica que nos produtos convencionais.

Uma das limitações dos estudos que pretendem avaliar o impacto da agricultura biológica no desenvolvimento de micotoxinas prende-se com o número reduzido de amostras analisadas, o qual, não é muitas vezes suficiente para efetuar uma avaliação robusta, já que para tal será necessário um elevado número de resultados analíticos.

Um estudo conduzido por Barreira e col. (2010), apresentou resultados foram contrários ao do presente estudo, revelando uma incidência de amostras positivas superior no modo convencional (24 %) quando comparado com a agricultura biológica (20 %) (Barreira, Alvito e Almeida, 2010).

No que diz respeito ao **modo de comercialização**, as amostras comercializadas em boião (para comer à colher, portanto mais espessas) apresentaram teores de contaminação superiores ($4,33 \pm 1,77 \mu\text{g}/\text{kg}$) às amostras bebíveis (para beber, mais diluídas; $3,97 \pm 0,74 \mu\text{g}/\text{kg}$). Todas as amostras com teores de patulina acima do limite máximo, estavam disponíveis na forma bebível com teor médio de $17,83 \pm 4,99 \mu\text{g}/\text{kg}$.

A quantidade de estudos existentes e de pesquisa de contaminantes em purés de fruta é escassa. Apesar de no relatório anual de 2019 do RASFF constarem vários alertas para micotoxinas, não foi registrado nenhum para a ocorrência de patulina (*The Rapid Alert System for Food and Feed.*, 2019).

O método de análise utilizado neste estudo apresenta como principais limitações o problema de interferências de matriz e possíveis falsos-positivos devido à reação cruzada do anticorpo com outras micotoxinas e à falta de sensibilidade da técnica. Para além das limitações apresentadas, a ELISA é considerada um método de triagem, por este motivo, este estudo carece de uma confirmação nomeadamente por LC-MS/MS, com a vantagem das amostras poderem ser usadas diretamente para este método de confirmação, onde os resultados são de alta fiabilidade, deixando desta forma em aberto uma possível continuidade deste estudo.

3.1. Ingestão Diária Estimada

Considerando o teor mínimo (1,43 µg/kg), médio (5,78 µg/kg) e máximo (23,28 µg/kg) de concentração de patulina obtido, foi calculada a EDI para os vários cenários possíveis. Para o pior cenário, a EDI foi de 0,0752 µg/kg peso corporal/dia e para o melhor cenário foi de 0,0028 µg/kg peso corporal/dia.

Estudo conduzido por Plunkekk e col. (1992), refere, para a população americana, um consumo de maçãs e de produtos à base de maçã, no primeiro ano de vida, de 6,4 g/kg de peso corporal/dia e em adultos de 0,4 g/kg peso corporal/dia (Plunkett, 1992). Outro estudo conduzido em Itália, refere valores de consumo de maçãs e produtos à base de maçã de 2,9 g/kg peso corporal/dia para crianças entre 1 e 10 anos e valores de 0,2 g/kg peso corporal/dia para adultos 76 (Piemontese, Solfrizzo e Visconti, 2005). No entanto, existem poucos estudos sobre a ingestão diária de patulina através do consumo de puré de maçã em crianças.

As tabelas 7 e 8 apresentam os resultados obtidos para os dois cenários de consumo de purés de fruta por lactentes e crianças jovens. A percentagem da DDAMP para os diferentes cenários de exposição foi calculada.

Tabela 7: Cenários de exposição e avaliação de risco de acordo com as diferentes idades, considerando o consumo de 21 gramas (3 aos 12 meses) e 28,25 gramas (dos 13 meses aos 3 anos).

Idade (peso)	Melhor cenário		Cenário médio		Pior cenário	
	EDI (µg/kg p.c./dia)	% TDI	EDI (µg/kg p.c./dia)	% TDI	EDI (µg/kg p.c./dia)	% TDI
3 meses (6,5 kg)	0,0046	1,15	0,0187	4,66	0,0752	18,80
6 meses (8 kg)	0,0038	0,94	0,0152	3,80	0,0611	15,28
12 meses (9,5 kg)	0,0032	0,79	0,0128	3,19	0,0515	12,87
2 anos (12 kg)	0,0034	0,84	0,0136	3,40	0,0548	13,70
3 anos (14,5 kg)	0,0028	0,11	0,0113	2,82	0,0454	11,34

Tabela 8: Cenários de exposição e avaliação de risco de acordo com as diferentes idades, considerando a ingestão de um boião de fruta por dia (100 g).

Idade (peso)	Melhor cenário		Cenário médio		Pior cenário	
	EDI (µg/kg p.c./dia)	% TDI	EDI (µg/kg p.c./dia)	% TDI	EDI (µg/kg p.c./dia)	% TDI
3 meses (6,5kg)	0,0220	5,50	0,0889	22,23	0,3582	89,55
6 meses (8kg)	0,0180	4,50	0,0723	18,08	0,2910	72,75
1 ano (9,5kg)	0,0150	3,75	0,0608	15,20	0,2450	61,26
2 anos (12kg)	0,0119	2,98	0,0481	12,03	0,1940	48,50
3 anos (14,5kg)	0,0099	2,48	0,0399	9,97	0,1606	10,15

A ingestão de patulina através do consumo de purés à base de maçã, variou entre 1,15 % e 18,80% da DDAMP e entre 5,50 % e 89,55%, no primeiro e segunda cenário, respetivamente. De forma transversal, nos dois cenários considerados, o valor mais alto de ingestão de patulina foi estimado para as idades jovens, em que o quociente obtido é maior, isto é, estão em maior risco. Esta situação está diretamente relacionada com o peso corporal e a quantidade de alimento ingerido, uma vez que as crianças mais jovens consomem mais alimentos e bebidas por quilograma de peso corporal que as crianças

mais velhas. Todas as ingestões estimadas de patulina calculadas a partir dos dados do presente estudo encontram-se abaixo dos 0,4 µg/Kg de p.c./dia proposto pela JECFSA. As referências bibliográficas existentes indicam valores de exposição variadas. No entanto, é sugerido por Baert e col. que se reduza o limite máximo da concentração de patulina nos alimentos de modo a salvaguardar a população mais vulnerável (Baert et al., 2007).

Estudo europeu realizado em 2002, verificou que em Portugal, o sumo de maçã/néctar de maçã representou a principal fonte de ingestão de patulina. Segundo o mesmo estudo, a população portuguesa apresenta um valor de exposição de 0,3 µg/Kg de p.c. /dia. Comparando com o valor de DDAMP (0,4 µg/Kg de p.c./dia) a exposição da população portuguesa à patulina era bastante inferior ao valor referido (Majerus e Kapp, 2002). Os valores de exposição obtidos para Espanha (0,2 µg/Kg de p.c./dia) são similares aos obtidos para Portugal. No entanto, os valores de exposição para os restantes países europeus participantes no estudo revelam valores de exposição muito superiores (1,1 – 9,6 µg/Kg de p.c./dia)

Os valores de exposição obtidos no segundo cenário de exposição (tabela 8), considerando a ingestão de um boião de fruta por dia vão de encontro aos valores de exposição obtidos para a população portuguesa obtido no estudo anteriormente mencionado. O consumo de purés de fruta releva-se por isso um fator relevante de exposição à patulina entre a população portuguesa.

CONCLUSÕES

Das 40 amostras de purés de fruta à base de maçã analisadas, todas (100%) se encontravam contaminadas com um teor de patulina superior ao LOD (1 µg/kg). A média das concentrações determinadas é de $5,78 \pm 5,09$ µg/kg, o que coincide com outros estudos. A exposição de lactentes e crianças jovens foi estimada para o pior, médio e melhor cenário, tendo sido obtido valores de EDI entre 0,0028 e 0,3582 µg/kg de p.c./dia. Para o pior cenário, correspondente ao consumo, por um lactente, de um boião (100g) contaminado com o teor máximo determinado, a EDI representa cerca de 89,55 % da DDAMP de patulina estabelecida pela JECFA (0,4 µg/kg de p.c./dia).

O presente estudo evidencia a vantagem da adição de ácido ascórbico no controlo e diminuição dos níveis de patulina. De salientar ainda que lactentes e crianças com alta ingestão de produtos de origem biológica terão uma maior exposição à patulina, pela presença de teores mais elevados da micotoxina.

Considerando os resultados obtidos pelo presente estudo, associados ao facto de o consumo de purés de fruta estar em crescimento marcado, será necessário monitorizar a exposição da população a esta micotoxina decorrente do seu consumo. Para além disso, é importante aplicar medidas que visem a redução e prevenção da contaminação da fruta pela patulina, evitando o desenvolvimento dos fungos e respetivos produtos derivados, em especial nos produtos à base de maçã.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, Alberto *et al.* - Alimentação e nutrição do lactente. *Acta Pediátrica Portuguesa*. . ISSN 0873-9781. 43:5 (2012) S17–S40.
- AL-HAZMI, Mansour A. - Patulin in apple juice and its risk assessments on albino mice. *Toxicology and Industrial Health*. . ISSN 0748-2337. 30:6 (2014) 534–545. doi: 10.1177/0748233712457454.
- ASHIQ, Samina - Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. . ISSN 15414337. 14:2 (2015) 159–175. doi: 10.1111/1541-4337.12122.
- ASSUNÇÃO, Ricardo *et al.* - Applicability of In Vitro Methods to Study Patulin Bioaccessibility and Its Effects on Intestinal Membrane Integrity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. . ISSN 1528-7394. 77:14–16 (2014) 983–992. doi: 10.1080/15287394.2014.911138.
- ASSUNÇÃO, Ricardo *et al.* - Aplicação de modelo de digestão in vitro para a determinação da bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta. *Observações_Boletim Epidemiológico*. 4:13 (2015) 30–32.
- AZIZI, Issa Gholampour; ROUHI, Samaneh - Determination of patulin in fruit juices and compote of apple and pear. *Toxin Reviews*. . ISSN 1556-9543. 32:3 (2013) 39–42. doi: 10.3109/15569543.2013.801354.
- BAERT, Katleen *et al.* - EXPOSURE ASSESSMENT OF PATULIN IN APPLE JUICE FOR FLEMISH YOUNG CHILDREN. *Acta Horticulturae*. . ISSN 0567-7572. 674:674 (2005) 389–390. doi: 10.17660/ActaHortic.2005.674.48.
- BAERT, Katleen *et al.* - Occurrence of Patulin in Organic, Conventional, and Handcrafted Apple Juices Marketed in Belgium. *Journal of Food Protection*. . ISSN 0362-028X. 69:6 (2006) 1371–1378. doi: 10.4315/0362-028X-69.6.1371.
- BAERT, Katleen *et al.* - Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders. *Food and Chemical Toxicology*. . ISSN 02786915. 45:9 (2007) 1745–1751. doi: 10.1016/j.fct.2007.03.008.
- BARAD, Shiri; SIONOV, Edward; PRUSKY, Dov - Role of patulin in post-harvest diseases. *Fungal Biology Reviews*. ISSN 17494613. 30:1 (2016) 24–32. doi: 10.1016/j.fbr.2016.02.001.

BARREIRA, Maria João; ALVITO, Paula C.; ALMEIDA, Cristina M. M. - Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry*. . ISSN 03088146. 121:3 (2010) 653–658. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.085.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. - Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. . ISSN 08938512. 16:3 (2003) 497–516. doi: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003.

BERETTA, Barbara *et al.* - Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*. ISSN 0265-203X. 17:5 (2000) 399–406. doi: 10.1080/026520300404815.

BIRKIINSHAW, J. *et al.* - Patulin in the Common Cold. Collaborative Research on a Derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II. *Biochemistry and Chemistry*. *Lancet*. 1943) 625–30.

BONERBA, Elisabetta *et al.* - Assessment of dietary intake of patulin from baby foods. *Journal of Food Science*. ISSN 00221147. 75:7 (2010) 25–27. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01743.x.

BORCHERS, Andrea *et al.* - Food safety. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. . ISSN 10800549. 39:2 (2010) 95–141. doi: 10.1007/s12016-009-8176-4.

BRANDON, E. F. A. *et al.* - Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. *World Mycotoxin Journal*. ISSN 1875-0710. 5:4 (2012) 391–403. doi: 10.3920/WMJ2012.1426.

BURROUGHS, L. F. - Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. . ISSN 00045756. 60:1 (1977) 100–103. doi: 10.1093/jaoac/60.1.100.

GB 2761-2011 of 20 April 2011 China National Food Safety Standard: Maximum Levels for Mycotoxins in Foods. (11-

CODEX ALIMENTARIUS - General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed

Regulamento (CE) n.º 1425/2003 DA COMISSÃO de 11 de Agosto de 2003 que altera o Regulamento (CE) n.º 466/2001 no respeitante à patulina. *J. Of. da União Eur.* (03-[Consult. 27 out. 2020]. Disponível em WWW:<URL:<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1425&from=PT>>.

REGULAMENTO (CE) N° 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. J. Of. da União Eur. (05- 1–54. Disponível em WWW:<URL:https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF>.

Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006. Métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia J. Of. da União Eur. (06- 12. Disponível em WWW:<URL:https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32006R0401>.

Diretiva 2006/125/CE da Comissão de 5 de Dezembro de 2006 relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens. Jornal Oficial da União Europeia [Em linha]. J. Of. da União Eur. (06- 16–35. Disponível em WWW:<URL:https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0125&from=EN>.

Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal of The European Communities (06- 5–24. Disponível em WWW:<URL:http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>.

Diretiva 2006/141/CE da Comissão de 22 de Dezembro de 2006 relativa às fórmulas para lactentes e fórmulas de transição. J. Of. da União Eur. (06- 1–8. Disponível em WWW:<URL:https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32006L0141>.

Regulamento (CE) n.º 834/2007 do Conselho, de 28 de Junho de 2007 , relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos. J. Of. da União Eur. (07- [Consult. 6 out. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32007R0834>.

CUNHA, S. C.; FARIA, M. A.; FERNANDES, J. O. - Determination of patulin in apple and quince products by GC–MS using 13C5–7 patulin as internal standard. Food Chemistry. . ISSN 03088146. 115:1 (2009) 352–359. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.074.

DAILEY, Robert E.; BLASCHKA, Andrea M.; BROUWER, Emilio A. - Absorption,

distribution, and excretion of [¹⁴C] patulin by rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. ISSN 0098-4108. 3:3 (1977) 479–489. doi: 10.1080/15287397709529580.

DRUSCH, S.; KOPKA, S.; KAEDING, J. - Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food Chemistry*. ISSN 03088146. 100:1 (2007) 192–197. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.043.

DURANOVA, Hana *et al.* - Sex-related variations in bone microstructure of rabbits intramuscularly exposed to patulin. *Acta Veterinaria Scandinavica*. ISSN 1751-0147. 57:1 (2015) 50. doi: 10.1186/s13028-015-0140-0.

FLIEGE, Ralph; METZLER, Manfred - Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles. *Chemical Research in Toxicology*. ISSN 0893228X. 13:5 (2000) 363–372. doi: 10.1021/tx9901478.

FRÉMY, J. Marc *et al.* - Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes. *Food Additives and Contaminants*. ISSN 0265-203X. 12:3 (1995) 331–336. doi: 10.1080/02652039509374310.

FRISVAD, Jens C. *et al.* - Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. ISSN 01660616. 2004:49 (2004) 201–241.

FUNES, G. J.; RESNIK, S. L. - Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control*. ISSN 09567135. 20:3 (2009) 277–280. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.05.010.

GÖKMEN, Vural; ACAR, Jale - Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. *Journal of Chromatography A*. ISSN 00219673. 815:1 (1998) 99–102. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01280-6.

GONZÁLEZ-OSNAYA, L. *et al.* - Exposure to patulin from consumption of apple-based products. *Food Additives and Contaminants*. ISSN 0265203X. 24:11 (2007) 1268–1274. doi: 10.1080/02652030701361556.

GUERRA-MORENO, Angel; HANNA, John - Induction of proteotoxic stress by the mycotoxin patulin. *Toxicology Letters*. ISSN 03784274. 276:2017) 85–91. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.05.015.

HARDY, Anthony *et al.* - Guidance on the risk assessment of substances present in food intended for infants below 16 weeks of age. *EFSA Journal*. ISSN 18314732. 15:5 (2017). doi: 10.2903/j.efsa.2017.4849.

HEALTH CANADA - Summary of Comments from Health Canada's Consultation on its Proposal to Introduce a Maximum Level for the Presence of Patulin in Apple Juice and Unfermented Apple Cider Sold in Canada. Ottawa, ON, USA : [s.n.]

IAMANAKA, Beatriz; OLIVEIRA, Idjane; TANIWAKI, Marta - MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

IARC - Agents Classified by the International Agency of Research on Cancer Monographs. [Consult. 17 out. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/List_of_Classifications.pdf>.

IHESHIULOR, O. O. M. *et al.* - Effects of Mycotoxins in Animal Nutrition: A Review. *Asian Journal of Animal Sciences*. ISSN 18191878. 5:1 (2011) 19–33. doi: 10.3923/ajas.2011.19.33.

IOI, J. David *et al.* - Mitigation of Patulin in fresh and processed foods and beverages. *Toxins*. . ISSN 20726651. 9:5 (2017) 1–18. doi: 10.3390/toxins9050157.

IQBAL, Shahzad Zafar *et al.* - Natural occurrence of patulin in different fruits, juices and smoothies and evaluation of dietary intake in Punjab, Pakistan. *Food Control*. . ISSN 09567135. 84:2018) 370–374. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.08.024.

IWAHASHI, Yumiko *et al.* - Mechanisms of Patulin Toxicity under Conditions That Inhibit Yeast Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. . ISSN 0021-8561. 54:5 (2006) 1936–1942. doi: 10.1021/jf052264g.

JAYASHREE, Girindrababu Venkattappa *et al.* - Patulin Induced Oxidative Stress Mediated Apoptotic Damage in Mice, and its Modulation by Green Tea Leaves. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. . ISSN 09736883. 7:2 (2017) 127–134. doi: 10.1016/j.jceh.2017.01.113.

KATZMAN, Philip A. *et al.* - Clavacin, an antibiotic substance from *Aspergillus Clavatus*. CLAVACIN, AN ANTIBIOTIC SUBSTANCE FROM ASPERGILLUS CLAVATUS. . ISSN 0021-9258. 154:2 (1944) 475–486.

KRALJ CIGIĆ, Irena; PROSEN, Helena - An Overview of Conventional and Emerging

Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067. 10:1 (2009) 62–115. doi: 10.3390/ijms10010062.

LEGGOTT, Norma L.; SHEPHARD, Gordon S. - Patulin in South African commercial apple products. *Food Control*. ISSN 09567135. 12:2 (2001) 73–76. doi: 10.1016/S0956-7135(00)00023-2.

LI, Boqiang *et al.* - Dissection of patulin biosynthesis, spatial control and regulation mechanism in *Penicillium expansum*. *Environmental Microbiology*. ISSN 1462-2912. 21:3 (2019) 1124–1139. doi: 10.1111/1462-2920.14542.

LIU, B. H. *et al.* - Induction of Oxidative Stress Response by the Mycotoxin Patulin in Mammalian Cells. *Toxicological Sciences*. ISSN 1096-6080. 95:2 (2006) 340–347. doi: 10.1093/toxsci/kfl156.

LUPESCU, Adrian *et al.* - Patulin-Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology and Biochemistry*. ISSN 1421-9778. 32:2 (2013) 291–299. doi: 10.1159/000354437.

MAHFOUD, Radhia *et al.* - The Mycotoxin Patulin Alters the Barrier Function of the Intestinal Epithelium: Mechanism of Action of the Toxin and Protective Effects of Glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology*. . ISSN 0041008X. 181:3 (2002) 209–218. doi: 10.1006/taap.2002.9417.

MAJERUS, Paul; KAPP, Katrin - Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States

MARÍN, Sonia *et al.* - Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. *Food Chemistry*. ISSN 03088146. 124:2 (2011) 563–568. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.06.072.

MARQUES, M. - Validação Interna dos Métodos de Determinação de Deoxinivalenol e Zearalenona por HPLC com Purificação por Colunas de Imunoafinidade. [Em linha]. [S.l.] : Universidade Técnica de Lisboa, 2019 Disponível em WWW:<URL:<https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/cursos/lebl-pb/dissertacao/2353642080813>>.

MARTINS, C. *et al.* - Exposure assessment of Portuguese population to multiple mycotoxins: The human biomonitoring approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. ISSN 14384639. 222:6 (2019) 913–925. doi: 10.1016/j.ijheh.2019.06.010.

MARTINS, M. L. *et al.* - Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Additives and Contaminants*. . ISSN 0265-203X. 19:6 (2002) 568–574. doi: 10.1080/02652030210121320.

MARTINS, M.; MARTINS, H.; BERNARDO, F. - Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *revista portuguesa de ciências veterinárias*. 98:2003) 179–183.

MCLAUGHLIN, John *et al.* - The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in caco-2 cells. *Toxicology in Vitro*. ISSN 08872333. 23:1 (2009) 83–89. doi: 10.1016/j.tiv.2008.10.009.

MILIĆEVIĆ, Dragan R.; ŠKRINJAR, Marija; BALTIĆ, Tatjana - Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins*. ISSN 2072-6651. 2:4 (2010) 572–592. doi: 10.3390/toxins2040572.

MOAKE, Matthew M.; PADILLA-ZAKOUR, Olga I.; WOROBO, Randy W. - Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. . ISSN 1541-4337. 4:1 (2005) 8–21. doi: 10.1111/j.1541-4337.2005.tb00068.x.

MOAKE, Matthew; PADILLA-ZAKOUR, Olga; WOROBO, Randy - Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. ISSN 1541-4337. 4:1 (2005) 8–21. doi: 10.1111/j.1541-4337.2005.tb00068.x.

MOHAN, H. M. *et al.* - The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. . ISSN 02786915. 50:11 (2012) 4097–4102. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.036.

MOREIRA, Teresa *et al.* - EPACI Portugal: Consumo alimentar em crianças de 1-3 anos de idade. [Consult. 3 out. 2020]. Disponível em WWW:<URL:<http://hdl.handle.net/10400.14/17670>>.

MOSS, M. O. - Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*. ISSN 1364-5072. 104:5 (2008) 1239–1243. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03705.x.

NIELSEN, K. - Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*. ISSN 00219673. 1002:1–2

(2003) 111–136. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00490-4.

PÁDUA, Rubia; JUNIOR, Miguel - Toxicological aspects and occurrence of patulin in apple juice. [Consult. 31 ago. 2020]. Disponível em WWW:<URL:http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744078022>.

PAL, Saurabh; SINGH, Neha; ANSARI, Kausar Mahmood - Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicology Research*. . ISSN 2045-452X. 6:6 (2017) 764–771. doi: 10.1039/C7TX00138J.

PEREIRA, Catarina; VASCO, Elsa; CRESPO, Ana - Avaliação da exposição à patulina de um grupo de crianças através do consumo de alimentos infantis à base de maçã – estudo piloto. [S.l.] : Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2013

PIEMONTESE, L.; SOLFRIZZO, Michele; VISCONTI, A. - Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*. ISSN 0265203X. 22:5 (2005) 437–442. doi: 10.1080/02652030500073550.

PIEMONTESE, L.; SOLFRIZZO, Michele; VISCONTI, A. - Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*. ISSN 0265-203X. 22:5 (2005) 437–442. doi: 10.1080/02652030500073550.

PIQUÉ, Ester *et al.* - Occurrence of patulin in organic and conventional apple juice. Risk assessment. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III*. 661:2 (2013) 131–144.

PLUNKETT, L; Turnbull, D; Rodricks, J. - Differences between adults and children affecting exposure assessment. Em GUZELIAN, PS; HENRY, DJ; OLIN, SS (Ed.) - Similarities and differences between children and adults: Implications for risk assessment

PUEL, Olivier; GALTIER, Pierre; OSWALD, Isabelle - Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*. ISSN 2072-6651. 2:4 (2010) 613–631. doi: 10.3390/toxins2040613.

RAIOLA, Assunta *et al.* - Study of thermal resistance and in vitro bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products. *Food and Chemical Toxicology*. . ISSN 02786915. 50:9 (2012) 3068–3072. doi: 10.1016/j.fct.2012.05.053.

RAMALINGAM, Srinivasan; BAHUGUNA, Ashutosh; KIM, Myunghee - The effects of mycotoxin patulin on cells and cellular components. *Trends in Food Science and*

Technology. ISSN 09242244. 83:2019) 99–113. doi: 10.1016/j.tifs.2018.10.010.

RILEY, Ronald T.; SHOWKER, Jency L. - The mechanism of patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids. *Toxicology and Applied Pharmacology*. . ISSN 0041008X. 109:1 (1991) 108–126. doi: 10.1016/0041-008X(91)90195-K.

RITIENI, Alberto - Patulin in Italian Commercial Apple Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 0021-8561. 51:20 (2003) 6086–6090. doi: 10.1021/jf034523c.

RYCHLIK, Michael *et al.* - Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. *Food and Chemical Toxicology*. ISSN 02786915. 42:5 (2004) 729–735. doi: 10.1016/j.fct.2003.12.015.

SABINO, Myrna - Detection and Determination of Patulin in Fruits and Fruit Products. *Em Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Elsevier, 2008 Disponível em WWW:<URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123741264000127>>. ISBN 9780123741264. p. 261–270.

SALEH, Iman; GOKTEPE, Ipek - The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and Chemical Toxicology*. . ISSN 18736351. 129:February (2019) 301–311. doi: 10.1016/j.fct.2019.04.036.

SCHUMACHER, David; METZLER, Manfred; LEHMANN, Leane - Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Archives of toxicology*. . ISSN 0340-5761. 79:2 (2005) 110–21. doi: 10.1007/s00204-004-0612-x.

SCHÜTZE, Nicole *et al.* - Exposure to Mycotoxins Increases the Allergic Immune Response in a Murine Asthma Model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. . ISSN 1073-449X. 181:11 (2010) 1188–1199. doi: 10.1164/rccm.200909-1350OC.

SHEPHARD, Gordon Seymour - Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews*. . ISSN 0306-0012. 37:11 (2008) 2468. doi: 10.1039/b713084h.

SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. - Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*. . ISSN 03784274. 153:1 (2004) 91–98. doi: 10.1016/j.toxlet.2004.04.046.

The Rapid Alert System for Food and Feed. *The Rapid Alert System for Food and Feed*. 2019,

THE WORLD HEALTH ORGANIZATION - Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponível em WWW:<URL:<http://apps.who.int/iris/handle/10665/37246>>. ISBN 9241208597.

TOROVIĆ, Ljilja *et al.* - Risk assessment of patulin intake through apple-based food by infants and preschool children in Serbia. *Food Additives & Contaminants: Part A.* . ISSN 1944-0049. 34:11 (2017) 2023–2032. doi: 10.1080/19440049.2017.1364434.

TOROVIĆ, Ljilja *et al.* - Patulin in fruit juices: occurrence, bioaccessibility, and risk assessment for Serbian population. *Food Additives & Contaminants: Part A.* . ISSN 1944-0049. 35:5 (2018) 985–995. doi: 10.1080/19440049.2017.1419580.

TURNER, Nicholas W. *et al.* - Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Analytica Chimica Acta.* . ISSN 00032670. 901:2015) 12–33. doi: 10.1016/j.aca.2015.10.013.

TURNER, Nicholas W.; SUBRAHMANYAM, Sreenath; PILETSKY, Sergey A. - Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta.* . ISSN 00032670. 632:2 (2009) 168–180. doi: 10.1016/j.aca.2008.11.010.

CPG Sec 510.150 Apple Juice, Apple Juice Concentrates, and Apple Juice Products - Adulteration with Patulin. [Consult. 18 out. 2020]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-510150-apple-juice-apple-juice-concentrates-and-apple-juice-products-adulteration-patulin>>.

VARGA, János *et al.* - Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology.* . ISSN 01660616. 59:2007) 89–106. doi: 10.3114/sim.2007.59.11.

WHO - Children's Health and the Environment Annual Report

WU, Ri-Na *et al.* - Analysis of patulin in apple products by liquid–liquid extraction, solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods: a comparative study. *European Food Research and Technology.* . ISSN 1438-2377. 228:6 (2009) 1009–1014. doi: 10.1007/s00217-009-1007-2.

YAZICI, Serafettin; VELIOGLU, Y. Sedat - Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and calcium-d-pantothenate on the patulin content of apple juice

concentrate. *Nahrung - Food*. ISSN 0027769X. 46:4 (2002) 256–257. doi: 10.1002/1521-3803(20020701)46:4<256::AID-FOOD256>3.0.CO;2-A.

YUAN, Yuan *et al.* - Patulin content in apple products marketed in Northeast China. *Food Control*. ISSN 09567135. 21:11 (2010) 1488–1491. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.04.019.

ZHAI, Qixiao *et al.* - Food-borne patulin toxicity is related to gut barrier disruption and can be prevented by docosahexaenoic acid and probiotic supplementation. *Food & Function*. . ISSN 2042-6496. 10:3 (2019) 1330–1339. doi: 10.1039/C8FO02292E.

ZHONG, Lei *et al.* - Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins*. . ISSN 2072-6651. 10:11 (2018) 475. doi: 10.3390/toxins10110475.

ZIDEK, Angelika *et al.* - A review of human biomonitoring data used in regulatory risk assessment under Canada's Chemicals Management Program. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. ISSN 14384639. 220:2 (2017) 167–178. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.10.007.