

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Cristiane Rosa da Silva

**VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM SUCO DE
MAÇÃ UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM**

Santa Maria, RS
2021

Cristiane Rosa da Silva

**VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM SUCO DE
MAÇÃ UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência Animal**.

Santa Maria, RS
2021

Silva, Cristiane
VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM SUCO DE MAÇÃ
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM / Cristiane Silva.- 2021.
54 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Augusto Mallmann
Coorientadora: Fernanda Silveira Flores Vogel
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Validação de Metodologia 2. Micotoxina Patulina 3.
Determinação 4. Suco de maçã I. Mallmann, Carlos Augusto
II. Silveira Flores Vogel, Fernanda III. Título.

Cristiane Rosa da Silva

**VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM SUCO DE
MAÇÃ UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência Animal**.

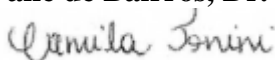
Aprovado em 04 de março de 2021:



Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann
(Presidente/Orientador)



André Valle de Bairros, Dr. (UFSM)



Camila Tonini, Dr^a. (FASA)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir vivenciar este momento bem como por abençoar cada passo desta minha caminhada chamada vida.

À minha vó Malviria que foi mais que vó, foi mãe, que me educou e me incentivou a jamais desistir dos meus sonhos. Ensinou-me o valor de cada conquista, mostrou que com caráter e humildade podemos conquistar qualquer coisa. Hoje ela não está presente fisicamente, mas sei que está olhando por mim no plano espiritual.

À minha família, por todo o apoio e dedicação a cada passo que eu dava, e por entender todas as minhas ausências. Minha mãe Maria Rejane e meus irmãos, agradeço pelo apoio e carinho de vocês.

Meus tios Maria Inês e Carlos Alberto, que são meus pais de coração, o meu obrigada por nunca desistirem de mim, mesmo nos momentos difíceis. Obrigada pelos conselhos e carinho bem como os puxões de orelha nas situações em que foram necessárias. Aos meus primos Luísa, Cassiane e Vinicius pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos que considero demais e que sem ajuda eu não estaria aqui, Juliano Vidal, Mara Luciane Weise, Dima Quatrin e Cristina Tonial, o meu muito obrigada pela ajuda e amizade. Vocês são maravilhosos e me sinto muito grata a Deus por ter vocês em minha vida.

Ao Prof. Carlos Augusto Mallmann, obrigada pela confiança e incentivo não só durante o mestrado, mas também pelos mais de 15 anos de ensinamento. O meu muito obrigada por todas as vezes que me desafiou e me mostrou o quanto sou capaz.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela ajuda nesse período de minha formação.

A todo o pessoal do LAMIC, aos pós-graduandos, bolsistas e residentes, pela ajuda em cada discussão científica, conversa e descontração.

A todas as pessoas que contribuíram para esse momento, mas que por circunstâncias do destino não estão mais presentes em minha vida; mesmo assim, o meu muito obrigada, pois, em algum momento se fizeram importantes.

RESUMO
VALIDAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PATULINA EM SUCO DE
MAÇÃ UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM

AUTORA: Cristiane Rosa da Silva
ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

A patulina (PAT) é uma micotoxina causada por certas espécies de fungos que, com certa frequência, contamina maçãs e produtos derivados, particularmente o suco. Esse contaminante tóxico é associado a efeitos mutagênicos, imunossupressivos e neurotóxicos em humanos e animais. No Brasil e no mundo o controle eficaz da contaminação por PAT depende de métodos analíticos confiáveis. Para um adequado monitoramento dos níveis de PAT em maçãs, é imprescindível utilizar processos que garantam um preparo adequado da amostra para a realização de uma análise cromatográfica correta. Este trabalho desenvolveu e validou uma técnica de análise de PAT em amostras de suco de maçã industrializado fundamentada na extração líquido-líquido, utilizando a acetonitrila como solvente extrator. A detecção por espectrometria de massas foi realizada após ionização química à pressão atmosférica (APCI). As recuperações médias alcançadas para as concentrações de 4, 8 e 20 µg/L de PAT foram de 97,5%, 92,49% e 96,92 %, respectivamente. A recuperação média do método foi de 95,64%. A reprodutibilidade da metodologia apresentada foi confirmada quando os resultados de um teste de proficiência de FAPAS, apresentando uma recuperação de 95,9%, além de apresentar uma boa seletividade. A incerteza do método foi estimada em três dias diferentes para três concentrações 4, 8 and 20 µg/L em replicatas de 7 vezes cada concentração, obtendo 0,37 %, 6,62 %. O analito foi monitorado por APCI no modo negativo para identificação de seus fragmentos. As 24 amostras de sucos de maçã analisadas apresentaram níveis de PAT abaixo do limite de quantificação.

Palavras-chave: Maçã. Micotoxinas. Patulina. Extração. LC-MS/MS.

ABSTRACT
VALIDATION AND DETERMINATION OF PATULIN IN APPLE
JUICE USING LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TANDEM MASS
SPECTROMETRY

AUTHOR: Cristiane Rosa da Silva
ADVISER: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Patulin (PAT) is a mycotoxin produced by certain fungal species which is frequently found contaminating apples and derived products, especially juice. Several fungal pathogens, in particular *Penicillium* species, have been identified as causative agents of diseases in apples. PAT contamination may occur due to reasons as geographic differences, climatic conditions, agricultural practices, cultivars and postharvest environment, which may affect fruit composition. This toxic contaminant is associated with mutagenic, immunosuppressive and neurotoxic effects in humans and animals. In Brazil and in the world effective control of PAT contamination depends on reliable analytical methods. This study developed and validated a technique for the analysis of PAT in samples of industrialized apple juice based on liquid-liquid extraction, using acetonitrile as the extraction solvent. Detection via mass spectrometry was performed after Atmospher Pressure Chemical Ionization (APCI). Mean recoveries of 97.5, 92.49 and 96.92% were reached for 4, 8 and 20 µg/L of PAT, respectively. The mean recovery of the method was 95.64%. The reproducibility of the presented methodology was confirmed when the results of a FAPAS proficiency test, showing a 95.9% recovery, in addition to presenting a good selectivity. The method uncertainty was estimated on three different days for three concentrations 4, 8 and 20 µg / L in replicates of 7 times each concentration, obtaining 0.37%, 6.62% The analyte was monitored with an APCI source in negative ion mode to identify its fragments. The 24 analyzed samples presented PAT levels below the limit of quantification.

Keywords: Apple. Mycotoxins. Patulin. Extraction. LC-MS/MS, validation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Estrutura molecular da patulina.	19
Figura 2- Características do método QuEChERS.	24

3 ARTIGO

Figure 1 - Graph showing the linearity of the calibration curve for patulin.	39
Figure 2 - Chromatogram of patulin-free sample (blank sample).	40
Figure 3 - Chromatogram of patulin-contaminated sample (fortified sample).....	41

LISTA DE TABELAS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1- Principais áreas produtoras, volumes da safra brasileira 2017/18 (em toneladas)	15
Tabela 2- Critérios de desempenho para a determinação dos níveis de patulina (PAT) em alimentos (Tabela adaptada do Regulamento da Comissão (CE) n.º 401/2006)	27

3. ARTIGO

Table 1 - Mass spectrometric parameters for patulin.	39
Table 2 - Results of the repeatability, intermediate precision and recovery	41
Table 3 - Results from the Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS®) proficiency test for the analysis of patulin in apple juice.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.O.A.C	Association of Official Analytical Chemistry
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica
CE	Commission Regulation
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAPAS	Food Chemistry Proficiency Test Report
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramas
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
LMT	Limite Máximo Tolerável
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MS/MS	Espectrometria de Massa Sequencial
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAT	Patulina
Ph	Potencial hidrogeniônico
PSA	Primary Secondary Amine
QuEChERS	Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
µg/kg	Microgramas por kilogramas
µg/L	Microgramas por litro
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 MAÇÃ	14
2.1.1 Suco de maçã	16
2.2 MICOTOXINAS	17
2.2.1 Patulina	18
2.3 LEGISLAÇÃO	19
2.4 PREPARO DA AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE PATULINA	21
2.4.1 Amostragem	20
2.4.2 Métodos de preparação	22
2.4.3 Extração	22
2.5 METODOLOGIA ANALÍTICA	25
2.6 VALIDAÇÃO	26
3 ARTIGO	28
4 CONCLUSÃO	48
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em torno de 600 milhões de pessoas adoecem anualmente após a ingestão de alimentos contaminados. Podendo causar mais de 200 doenças, da diarreia ao câncer, os alimentos são avaliados como impróprio para o consumo devido à contaminação por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas maléficas; estas podem ser de origem natural, como as micotoxinas, ou provenientes de poluentes ambientais, como resíduos de agrotóxicos e metais pesados (OPAS, 2019).

O Brasil é um grande produtor de maçã, sendo este alimento suscetível à contaminação por patulina (PAT). A maçã é altamente consumida na dieta humana e animal; sendo assim, é de suma importância monitorar a ocorrência dessa micotoxina. Embora a contaminação com PAT esteja principalmente ligada a áreas de tecidos podre, ela pode penetrar em regiões saudáveis da fruta.

Tendo em vista o acréscimo expressivo do cultivo da maçã e o fato de que a produtividade brasileira está fundamentalmente estruturada a proporcionar e demandar frutos para consumo *in natura*, há geração de um volume abundante de frutos rejeitados no processo de classificação (LAZZAROTTO et al., 2012). Os frutos que não apresentam características desejáveis para os moldes de categorização para a ingestão *in natura* podem ser destinados à indústria (ALBERTI et al., 2016). Sendo assim, a preparação de produtos alimentícios provenientes de maçã pode proporcionar melhor aproveitamento dos frutos. Um produto possível é o suco de maçã, que reúne muitas características benéficas do fruto *in natura*. Além disso, a agregação de sumos de diferentes frutas ao suco de maçã pode colaborar para maior diversificação do aspecto metabólico, inclusive melhorando o potencial sensorial (CRP, 2000).

Dessa forma, a determinação de PAT pode ser utilizada como um indicador de qualidade em sucos de maçãs processados e produtos de frutas, desde que uma quantidade apreciável da toxina esteja presente no alimento. O limite máximo tolerável (LMT) para as micotoxinas estabelecido pelos órgãos fiscalizadores aumenta a necessidade de implementar melhorias nos métodos utilizados.

Nesse cenário, é importante estabelecer uma metodologia de extração mais eficiente e segura, além da detecção por espectrometria de massas (MS/MS), que torna o resultado mais preciso. A MS/MS é uma das técnicas mais importantes de análise molecular, sendo que proporciona resultados ainda mais precisos quando aliada a técnicas cromatográficas. Essa metodologia combina a capacidade de separação com seu alto potencial em fornecer informações estruturais de massa molecular, evitando, assim, um falso resultado que pode ocorrer em técnicas mais antigas.

Diante do exposto, esse trabalho apresenta um método de extração rápido, econômico e confiável para a detecção de PAT e também aborda e discute os diferentes métodos de preparo mais usados na atualidade. Além disso, a concentração de PAT foi avaliada em suco de maçã industrializado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MAÇÃ

A maçã é o pseudofruto pomáceo da macieira (*Malus domestica* Bork.) pertencente à família Rosacea e subfamília das Pomóideas. É proveniente do Cazaquistão e da Ásia central e possui grande abundância de espécies selvagens com distintas formas, cores e sabores (PASA, et al., 2012).

Os frutos de maçã e seus produtos, como o suco, são amplamente consumidos e destacam-se por apresentar compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos (CARBONE et al., 2011; GRIMI et al., 2011). A maçã é consumida principalmente *in natura*, mas também é possível encontrá-la processada nas formas de biscoitos, doces, purês, néctares e sucos (PEREIRA, 2014).

Entre suas benfeitorias estão: “reduz o colesterol, previne problemas respiratórios, diminui o risco de diabetes e Acidente Vascular Cerebral, enriquece as funções cerebrais, auxilia a saciar, regula intestinos, ajuda na perda de peso, na prevenção de cáries e constipações, e na redução do ritmo de envelhecimento e do câncer”. Em muitos momentos ainda são oferecidas formas diversificadas do emprego da fruta na alimentação diária (ABPM, 2019).

Em 2016, a China liderava a produção mundial de maçãs, sendo responsável por aproximadamente 56% do total produzido. Os Estados Unidos apareciam em segundo lugar com 6%, seguidos pela Polônia com 5% e o Peru com 4%. O Brasil ocupava a décima terceira posição com 1,3%, equivalente a uma produção de 1,04 milhões de toneladas no ano (FAO, 2018).

A macieira é uma das frutíferas que dispõe de um maior número de cultivares. São descritas mais de 7.000 atualmente, porém poucas se destacam comercialmente. No Brasil, a produção de maçã está concentrada em duas cultivares, Gala e Fuji, que representam em torno de 90% da área plantada. As demais cultivares incluem a Eva, Golden Delicious, Brasil, Anna, Condesa, Catarina e Granny Smith (ABPM, 2016).

Devido à macieira ser uma espécie frutífera típica de clima frio, a região Sul se tornou a principal produtora de maçã no Brasil. Nessa região incidem as melhores condições climáticas para o desenvolvimento, floração e frutificação da macieira, especialmente nas regiões acima de 800 m de altitude do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ABPM, 2019). O governo brasileiro estimula o cultivo através de incentivos fiscais principalmente nas regiões altas do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e sul do Paraná (KIST, 2015).

Uma pesquisa realizada pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) expõe que, nos últimos cinco anos, a média de participação de cultivares na produção brasileira de maçã foi a seguinte: 56% de Gala; 39% de Fuji; e 6% de outros. Com relação aos principais estados produtores, as estatísticas de 2018 indicam a liderança de SC (52,6%), seguida de perto pelo RS (44,8%) (Tabela 1). A serra catarinense, onde despontam o município de São Joaquim e a variedade Fuji, continua a registrar crescimento na área cultivada da fruta (ABPM,2019).

Tabela 1 - Principais áreas produtoras, volumes da safra brasileira 2017/18 – (em toneladas).

Estados	Gala	Fuji	Outras	Total
Santa Catarina	313.998	236.975	24.786	575.759
Região de São Joaquim	173.776	217.349	19.055	410.180
Friburgo e outras	140.222	19.626	5.731	165.579
Rio Grande do Sul	347.911	115.852	26.778	490.541
Paraná	12.159	7.678	7.978	27.815
Total	674.068	360.506	59.542	1.094.116

Fonte: ABMP, (2019).

No Brasil, a safra de maçã tem início no final de dezembro, em regiões com temperaturas mais altas, com a colheita dos cultivares de baixo requerimento de frio; estende-se até o início de maio, em regiões de baixas temperaturas, com a colheita dos cultivares de requerimento de frio, sendo as frutas armazenadas em temperaturas baixas para manter a conservação por mais tempo (EMBRAPA, 2013).

Os frutos da macieira podem ser marcados e agrupados por suas diferenças de sabor, tamanho, forma, aparência, consistência da polpa e casca, e por suas distintas utilidades. De uma forma geral, as maçãs podem ser classificadas em três tipos: de mesa, para processar ou próprias à fabricação de sidra ou do vinagre. Uma mesma árvore pode fornecer frutos com diferentes aproveitamentos, de acordo com sua classificação. Pela capacidade de produzir fibras de boa qualidade e pelo alto teor de potássio, a maçã é uma fruta indicada para manutenção da saúde, prevenindo doenças cardíacas e excesso de colesterol no sangue, e para dietas de emagrecimento (TODA FRUTA, 2008).

Apesar da maçã ser classificada a partir de aspectos visuais, sintomas internos de doenças podem aparecer. Esporos fúngicos são capazes de penetrar o núcleo do fruto quando em desenvolvimento e após a colheita, havendo a redução dos mecanismos de defesa. Assim, os esporos podem germinar e causar deterioração interna (TOURNAS & MEMON, 2009).

2.1.1 Suco de maçã

No Brasil, cerca de 95% da produção é composta pelas cultivares Gala e Fuji (ABPM, 2016). Estima-se que 25 a 35% da produção não apresenta características desejáveis para os padrões de classificação para o consumo *in natura*, podendo, portanto, ser utilizada para fins industriais (ALBERTI et al., 2016).

Tendo em vista o aumento significativo na produção de maçã e o fato de que a cadeia produtiva brasileira está basicamente estruturada a oferecer e demandar frutos para consumo *in natura*, gera-se um volume considerável de descarte (LAZZAROTTO et al., 2012). Frutas fora do padrão comercial são direcionadas à industrialização e utilizadas principalmente para a fabricação de sucos, os quais são exportados na forma de concentrado (NOGUEIRA et al., 2007). O suco de maçã é pouco consumido no Brasil (ROSA et al., 2006) em comparação à Europa e aos Estados Unidos, onde é considerado um dos sucos mais populares (JANZANTTI et al., 2003).

Cerca de 20 a 25% da safra brasileira de maçã é disposta à fabricação de sucos; a participação do mercado interno em relação ao volume total produzido está em crescimento devido à tendência de máximo consumo de alimentos saudáveis (ABPM, 2019).

Contudo, as maçãs rejeitadas por exibirem tamanho inapropriado, manchas e/ou deformações devem ser saudáveis e possuir uma composição química apta para esse tipo de produção (LAZZAROTTO et al., 2012). Além disso, as frutas não devem estar em estágio de maturação avançada, com baixa firmeza de polpa e farináceas (VENTURINI, 2010).

O suco de maçã é o produto extraído da fruta por moagem ou prensagem (pressão), passando por um processamento de clarificação, adição de antioxidante, desaeração, pasteurização e envase, sem adição de açúcar, adoçante ou conservantes. O produto final se apresenta como um líquido límpido, claro e brilhante (JANZANTTI et al., 2003).

De acordo com dados da Associação Brasileira de Produtores de Maçãs (ABPM), uma das causas de maior interesse pelo suco da fruta foi a alteração na legislação, que estabeleceu maior apresentação de frutos naturais do que artificiais nas bebidas. Assim, o líquido extraído da maçã ganhou lugar por ser mais neutro e de fácil acesso. O tema também merece atenção no

campo da pesquisa, havendo o desenvolvimento de estudos pertinentes a sucos e outras bebidas de maçã (ABPM,2019).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define o suco de maçã como sendo a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da maçã por processo tecnológico adequado, devendo obedecer aos Padrões de Identidade e Qualidade, fixados para suco de fruta (BRASIL, 2000). Para determinar a qualidade do suco de maçã deve-se observar algumas características de composição seguindo o regulamento técnico de qualidade (ABPM, 2019). A cor deve ser translúcida, o aroma próprio, sólidos solúveis em um mínimo de 10,5° Brix (20 °C), acidez total acima de 0,15g/100g expressa em ácido málico, acidez volátil no máximo de 0,04g/100g expressa em ácido acético e açúcares totais naturais do fruto em até 13,5g/100g (BRASIL, 2000).

As etapas do processamento do suco, prensagem, clarificação e pasteurização, podem modificar a composição de voláteis do suco de maçã e alterar o seu sabor característico. Um estudo sobre o processamento para obtenção do suco clarificado, realizado em laboratório e fundamentado nas linhas de procedimento industrial, mostrou que a pasteurização foi a etapa que mais afetou a composição do suco; houve perdas significativas dos compostos voláteis e a etapa de clarificação foi a que menos causou modificações (JANZANTTI et al., 2003).

A industrialização deve ser realizada sob cuidado rigoroso com a higiene e a sanitização dos equipamentos e das instalações, bem como das frutas, para que não exista nenhum tipo de contaminação. Em função do processamento utilizado, o suco integral se destaca por manter propriedades sensoriais e nutricionais semelhantes às encontradas nos frutos. Essa característica, aliada à demanda por alimentos sem adição de conservantes e açúcares e com características semelhantes à de alimentos não processados, faz com que o suco integral seja preferido pela maioria dos consumidores (ROMANO et al., 2015)

2.2. MICOTOXINAS

As micotoxinas são compostos químicos considerados tóxicos. Esses metabólitos secundários e são produzidos por algumas linhagens de fungos filamentosos, podendo causar efeitos adversos em humanos e animais. Há mais de 300 micotoxinas conhecidas, produzidas por cerca de 100 espécies de fungos que se desenvolvem em climas tropicais e subtropicais de acordo com condições favoráveis de temperatura e umidade (MALLMANN e DILKIN, 2007).

A maioria das micotoxinas é quimicamente estável, resistindo aos métodos de processamento habitualmente utilizados na indústria alimentar (FSIS, 2004). As doenças fúngicas pós-colheita são responsáveis por danos econômicos expressivos na produção de

maçãs, podendo atingir de 30 a 40% em países em desenvolvimento e até 60% nos casos mais extremos (ABRUNHOSA et al., 2012).

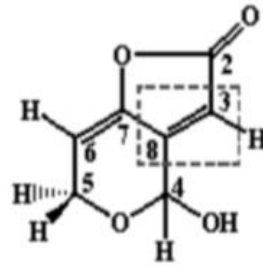
Outro aspecto negativo importante da contaminação por fungos é o risco de agrupamento de micotoxinas nos frutos. Quando espécies micotoxigênicas de gêneros como *Penicillium*, *Alternaria* ou *Fusarium* são os atuantes causais de degradação da maçã, o risco potencial de contaminação com micotoxinas é elevado, havendo a possibilidade de desenvolvimento destas espécies durante a armazenagem mesmo sob refrigeração. As indústrias de concentrado de maçã comumente processam durante todo o ano, o que demanda conservar a fruta em câmaras refrigeradas por diversos meses (NAETS, et al., 2018). Armazenamento a frio em uma temperatura controlada pode se ampliar por 9 a 12 meses, dependendo da variedade de maçã e do destino da fruta. Patógenos que já se instalaram na parte interna da maçã são capazes de desenvolver indícios durante o armazenamento e, em determinados casos, até sintetizam micotoxinas nesse período.

A toxicidade crônica caracteriza-se por exposição a doses reduzidas de toxina durante um longo período de tempo, podendo resultar em doenças ou outros efeitos graves a saúde (SHEPHARD, 2006). As micotoxinas são termoestáveis, resistindo a temperaturas de aproximadamente 270 °C; possuem baixo peso molecular e não são degradadas pelas enzimas do sistema digestivo (ASTOVIZ e SUAREZ, 2005). Por apresentarem grande estabilidade química, essas toxinas seguem no alimento mesmo após a remoção dos fungos na industrialização; após esta, níveis detectáveis de toxinas podem ser deparados nos produtos finais (PINOTTI, 2016).

2.2.1. Patulina

O metabolito secundário 4-hidroxi-4H-furo [3,2-c] pirano-2(6H) -1, mais comumente conhecido como patulina, é uma micotoxina produzida por várias espécies de fungos, como *Penicillium expansum*, *P. patulum*, *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. claviforme*, *Saccharomyces vesicarium*, *Alternaria alternata*, *B. nivea*, *B. fulva* e *Aspergillus* (MOAKE et al., 2005). A fórmula molecular da PAT é C₇H₆O₄ e o peso molecular é de 154,12 g/mol. Sua atividade carcinogênica é atribuída à insaturação α , β , juntamente com uma dupla ligação conjugada externa na posição 4 do anel lactona (Figura 1). Sua absorção ultravioleta (UV) máxima é de 256,5 nm e apresenta solubilidade em água e solventes orgânicos comuns, exceto éter de petróleo. É instável em solução alcalina, observando-se queda em sua atividade biológica (SCUSSEL, 1998).

Figura 1- Estrutura molecular da patulina.



Fonte: Moss, (2008).

Vários patógenos fúngicos foram identificados como agentes causais de doenças da maçã, mas as espécies de *Penicillium* são as mais abundantes. A contaminação pode acontecer por motivos como diferenças geográficas, condições climáticas, práticas agrícolas, cultivares e ambiente pós-colheita, os quais podem afetar a composição da maçã (PAL et al., 2017).

A maior parte desses fungos inicia a colonização quando feridas ou danos físicos estão presentes na pele das maçãs, ocasionados por insetos ou aves no campo ou por manipulação imprópria durante a pós-colheita. O *Penicillium expansum*, conhecido como o agente causador da chamada podridão azul ou mofo azul, é um dos mais frequentemente relatados. Esses patógenos oportunistas podem apodrecer o fruto na pré e na pós-colheita, tanto interna quanto externamente (SHEN, 2018). A apresentação inadequada de frutas no mercado ainda pode gerar contaminação cruzada entre os produtos, e os maus métodos de higiene dos trabalhadores podem levar à contaminação durante as técnicas de exibição. Além disso, qualquer prática imprópria de fabricação é avaliada como um possível caminho de contaminação (MAILAFIA et al., 2017). Outras vias de exposição à PAT foram estudadas e comprovadamente causam toxicidade, mas é pouco provável que ocorram; portanto, a via de ingestão foi considerada como a principal (PAL et al., 2017).

A produção de PAT pelo *P. expansum* pode ocorrer entre 0° e 24° C, já a umidade requerida pode variar entre espécies. Algumas espécies podem colonizar substratos sem água; outras, no entanto, podem invadir e destruir substratos com umidade em equilíbrio com a umidade relativa de 90% ou maior, em temperatura entre -2° e +5° C (GILBERT e POHLAND, 2003).

Muitos fungos que atacam as maçãs se desenvolvem no interior da fruta, acarretando podridão no núcleo mofado. Os patógenos podem contaminar o fruto na pré-colheita, quando os esporos dos fungos obtêm acesso às flores envelhecidas, ficando em estado adormecido sem determinar sintomas até a colheita ou mesmo após a colheita. A infecção também pode

incidir em qualquer estágio do desenvolvimento do fruto se esporos de fungos acessarem a parte interna das sementes (RAJ et al., 2017). Algumas das espécies podem ter seu crescimento relativamente acelerado em temperaturas de refrigeração, indicando que a incidência e a gravidade da doença aumentam com o período de armazenamento em câmaras frias, tanto em atmosfera convencional quanto controlada (GAO et al., 2013).

A exposição aguda a PAT pode causar sintomas gastrointestinais, incluindo náusea, vômito, úlcera, hemorragia intestinal e lesões do duodeno. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), a PAT é classificada como carcinógeno do grupo 3, o que significa que não há estudos baseados em pesquisas com animais ou epidemiológicos suficientes para apoiar sua carcinogênese (IARC, 2018). Song et al. (2014) e Moake et al. (2005) relatam problemas como agitação, convulsões, congestão, ulceração, edema, hiperemia, inflamação intestinal e degeneração das células epiteliais, além de efeitos imunotóxicos, neurotóxicos, hepatotóxicos, genotóxicos, teratogênicos e cancerígenos, com a ingestão de PAT em excesso. Células humanas têm sido usadas para avaliar a toxicidade dessa micotoxina, e os danos no DNA têm sido observados ao expor culturas de células embrionárias de rim a diferentes concentrações de PAT (WU et al., 2005).

2.3.LEGISLAÇÃO

Devido aos riscos para a saúde humana, organizações nacionais e internacionais estabelecem limites máximos para micotoxinas em alimentos, a fim de garantir a segurança dos mesmos. A ocorrência de micotoxinas em frutas não é um problema exclusivo de países em desenvolvimento; essas toxinas influenciam o agronegócio mundial, pois comprometem a viabilidade de exportação e importação das frutas (GONZÁLEZ et al., 2010). A legislação sobre micotoxinas varia de acordo com o país, sendo que o limite aceitável é diferente para cada produto.

Brasil, os limites máximos constituídos pela legislação visam resguardar os consumidores das prováveis decorrências tóxicas que agentes contaminantes como as micotoxinas e resíduos de fungicidas podem gerar à saúde. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina o LMT para micotoxinas em alimentos através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011; o nível máximo de contaminação estabelecido para PAT em suco e polpa de maçã é 50 µg/L (ANVISA, 2011). A União Europeia preconiza esse mesmo limite para PAT nesses produtos, além de instituir 25 µg/L para itens sólidos compreendendo compota e purê de maçã. O limite máximo de 10 µg/kg também é determinado para produtos de maçã destinados à alimentação

infantil (CE, 2006). A Organização Mundial de Saúde (OMS), em associação com a Food and Drug Administration (FDA), recomenda um consumo máximo de PAT de 50 µg/kg (WHO, 1995).

O LMT para as micotoxinas determinado pelas legislações nacionais e internacionais acrescenta a precisão da ampliação de novos métodos e otimização daqueles já existentes, uma vez que resultados não garantidos de um determinado laboratório podem ocasionar problemas graves de segurança alimentar; conseqüentemente, pode haver o bloqueio de exportações (JESTOI, 2008).

2.4.PREPARO DA AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE PATULINA

2.4.1.Amostragem

A amostragem cumpre um papel muito importante no processo de análise de micotoxinas. Apesar de métodos analíticos e de controle de qualidade apropriados serem estabelecidos e implementados, os resultados analíticos podem ser anulados por erros consideráveis caso a amostragem não seja adequada. Isto acontece especialmente porque as micotoxinas se disseminam de forma bastante heterogênea nos produtos alimentares sólidos. Com relação à amostragem para a determinação de PAT em gêneros alimentícios, considera-se dois grupos de produtos que correspondem a dois métodos de amostragem diferentes

Atualmente há planos de amostragem instituídos por órgãos internacionais, propostos a garantir que amostras representativas sejam obtidas. Alguns desses planos são muito eficazes em termos de amparar a saúde na medida em que restringem ao mínimo a existência de falsos negativos, enquanto outros são mais eficazes na diminuição de falsos positivos. O plano de amostragem ideal é aquele que torna mínimo o risco associado a esses dois tipos de planos (EMAN, 2009).

No caso da análise de PAT em sumos (límpidos e turvos) e purês à base de maçã, determinou-se um plano de amostragem considerando que esses produtos poderiam ser tratados como porções líquidas, não apresentando, portanto, dificuldades pela falta de homogeneidade na disposição da contaminação. O plano de amostragem definido no regulamento 401/2006 (CE, 2006) deve ser seguido para resultados de controle oficial.

O método cromatográfico pode ser dividido em etapas: preparação, separação e quantificação da amostra. A primeira etapa é decisiva em todo o método de análise, em especial na determinação de traços e em casos onde a matriz é complexa. O procedimento de preparação deve liberar o analito da matriz, remover os interferentes e, em amostras muito

diluídas, ajustar a concentração do analito para permitir a sua detecção (MARKOWSKI et al., 2015).

2.4.2. Métodos de preparação

O preparo da amostra consiste em uma ou mais intervenções indispensáveis para transformar a amostra e proporcionar os analitos em uma configuração apropriada para a análise pela metodologia cromatográfica selecionada. A preparação da amostra, sendo uma etapa intermediária entre a coleta da amostra e a análise cromatográfica, é influenciada pelos dois lados do processo (MOLDOVEANU, 2002). O método de elaboração da amostra é um dos passos mais importantes na determinação de PAT em alimentos, assim como é para outras micotoxinas presentes em baixas a nível de concentração (VALCÁRCEL, 1997).

O custo e o tempo, bem como as fontes de erro durante a análise, são considerados no preparo das amostras para diagnóstico cromatográfico. Esta etapa representa cerca de 60% do tempo e do custo da análise (SAEGER, 2011). A organização da porção pode influenciar intensamente a recuperação dos analitos, afetando a exatidão e a precisão do método (SAEGER, 2011). O preparo da amostra pode ser dividido em três etapas: extração do analito desejado da matriz original para uma forma mais adequada e compatível com o sistema analítico; diminuição ou extinção dos interferentes da matriz; e agrupamento do analito de forma a obter uma concentração apropriada ao sistema de quantificação.

A técnica empregada no preparo da amostra depende fundamentalmente da complexidade da matriz, das características do composto a analisar, em particular sua volatilidade, polaridade e solubilidade, da concentração do analito na amostra e do processo analítico utilizado. Outros fatores, sobretudo custo, facilidade de automatização e tempo de análise, também são considerados (MOLDOVEANU, 2002).

As técnicas de preparação da amostra aplicadas à análise de micotoxinas, e em particular as que são utilizadas na determinação de PAT em alimentos, baseiam-se essencialmente na extração líquido-líquido (ELL) e na extração em fase sólida (EFS) e o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) (PRESTES et al., 2011).

2.4.3. Extração

A extração é um ponto crítico nas análises quantitativas, pois é quando se realiza a saída do analito de interesse, sua pré-concentração e a limpeza do extrato. Essa etapa é imprescindível para remoção de interferentes, principalmente para quantificação de traços em matrizes alimentícias complexas, como a maçã, uma vez que proporciona a eliminação de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos fenólicos e elementos minerais;

assim, o efeito de matriz é reduzido (LI et al., 2017; MARKOWSKI et al., 2015). No caso particular da PAT, a ELL é a técnica de preparação da amostra mais documentada (MARTINS, 2002; BAERT, 2006).

A ELL se baseia na distribuição (partição) de um analito entre dois líquidos imiscíveis. Permite a extração direta do analito com um solvente que seja capaz de não se misturar. A razão da distribuição do analito entre as duas fases será influenciada pela escolha do solvente extrator, pH da fase aquosa e razão do volume da fase orgânica e da aquosa. As condições iniciais da extração devem ser tais que o analito tenha distribuição preferencial na fase orgânica (LEGGOTT e SHEPHARD, 2001).

Nessa metodologia explora-se a diferente solubilidade dos compostos nos solventes aquosos e orgânicos, extraíndo o(s) analito(s) para um dos solventes e deixando os compostos restantes da matriz (interferentes) no outro solvente. Essa técnica de preparação de amostra é bastante empregada e utilizada como referência, sendo descrita na Norma Europeia EN 14177 de 2003. Diversos autores utilizam a ELL na determinação da PAT em produtos alimentares (CEN, 2003).

Atualmente, as análises de PAT em maçã são realizadas utilizando a partição líquido-líquido com acetato de etila, sendo esta adotada como método oficial da AOAC Internacional (Associação das Comunidades Analíticas) (AOAC; 2000; LI et al., 2017). Nesse método, o suco é extraído três vezes com acetato de etila e limpo por partição líquido-líquido com uma solução de carbonato de sódio (1,5%). Em seguida, sulfato de sódio anidro é adicionado para adsorção da água e o solvente é evaporado sob corrente de nitrogênio gasoso; a ressuspensão do resíduo é feita em água acidificada (pH 4). Contudo, a adição de carbonato de sódio é indesejável, tendo em vista que a PAT é instável em soluções alcalinas; além disso, é um método demorado (LI et al., 2017; MOAKE et al., 2005).

A EFS é um procedimento de separação onde os analitos a serem extraídos são divididos entre uma fase sólida e uma fase líquida, sendo indispensável buscar ajustes que propiciem maior semelhança deles com a fase sólida (LANÇAS, 2004). Fundamenta-se em princípios parecidos aos da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e é empregada para a adsorção seletiva de analitos ou interferentes presentes em matrizes simples ou complexas (MAJORS, 2008). Para usar esse tipo de extração, é necessário considerar alguns fatores que podem interferir na execução da técnica, como: o tipo de adsorvente, o volume da amostra, os solventes utilizados nos vários passos do processo e a quantidade de adsorvente (SUPELCO, 1998). Ou seja, para que a EFS seja aplicada de maneira satisfatória, são

necessários alguns conhecimentos sobre o analito de interesse para assim ser feita a escolha do adsorvente correto para a interação.

Existe uma vasta gama de materiais de enchimento que podem ser utilizados no preparo de fases sólidas para extração (MOLDOVEANU, 2002). Alguns desses adsorventes são de origem natural, como o carvão grafitizado, a terra de diatomáceas, a alumina, a sílica, a sílica ligada, o silicato de magnésio (florisil) e a celulose; outros são polímeros sintéticos, como é o caso do poliestireno-divinilbenzeno e do poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona). Os materiais sintéticos possuem um grau superior de porosidade que lhes atribui uma maior superfície de ativação real, admitindo uma maior habilidade de adsorção.

Essa nova geração de polímeros admite extrair uma grande abundância de analitos independentemente da sua natureza, quer sejam ácidos, básicos ou neutros, polares ou apolares, sendo por vezes designados por Equilíbrio Lipofílico-Hidrofílico (ALMEIDA, 2004). A sílica gel é uma matéria muito utilizada por sua habilidade de estabelecer ligações através de múltiplas interações eletrostáticas devido ao grupo silanol (Si-OH) que possui na superfície, conseguindo um caráter bastante polar (ALMEIDA, 2004).

O método de extração QuEChERS, por sua vez, é muito utilizado atualmente; foi desenvolvido em 2003 e tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (Figura 2) a partir de matrizes complexas, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (ANASTASSIADES et al., 2003).

Figura. - 2. Características do método QuEChERS.



O emprego do QuEChERS abrange o preparo da amostra, extração com solvente (acetonitrila, acetato de etila ou acetona) e partição com sulfato de magnésio isoladamente ou em combinação com outros sais, acompanhado de limpeza utilizando EFS. É um método muito flexível e várias transformações da técnica foram realizadas desde a sua invenção, dependendo dos tipos de analitos, matrizes, instrumentação e preferências dos analistas

quanto aos compostos a extrair (MAJORS, 2008). Uma particularidade importante é sua eficácia para a extração de analitos com polaridades diferentes em nível de traços em amostras complexas, sendo ajustado para a extração em vários cereais e derivados, como arroz, trigo e milho (HACKBART et al., 2012). Assim, a metodologia é promissora para extração de distintas toxinas em diversas matrizes (BEMVENUTI et al., 2012). É também utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos como frutas e verduras, que são matrizes complexas, permitindo a extração de vários analitos de interesse em apenas três etapas: extração com solvente, partição com sais e limpeza (PRESTES et al., 2011).

2.5. METODOLOGIA ANALÍTICA

Os métodos convencionais atuais para a determinação das micotoxinas em baixas concentrações dependem da CLAE acoplada a um detector UV ou de fluorescência, e mais recentemente a detecção por MS/MS. O detector de massa oferece o efeito de alta sensibilidade, seletividade, exatidão na identificação do analito e quantificação precisa (CHANDRA, et al., 2017).

Ainda que as metodologias instrumentais para detecção e quantificação de outras micotoxinas reguladas tenham apresentado evoluções expressivas nos últimos anos (BERTHILLER et al., 2014), a disponibilidade de técnicas analíticas para detecção de PAT ainda é bastante restrita. Os métodos mais frequentemente empregados são fundamentados em CLAE acoplada a técnicas de detecção convencionais, como detectores de UV e diodo-arranjo (DAD) (BARREIRA et al., 2010, MARSOL-VALL et al., 2014). Esses processos, que na maioria das vezes demandam um pré-tratamento de amostra bastante exaustivo (purificação da amostra para extrair interferências de absorção de UV/visível-VIS), também podem necessitar de uma aplicação de outros diferentes processos de confirmação.

Ultimamente, os métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa em tandem (CLAE-MS/MS) competem, sem dúvida, com as estratégias analíticas mais apropriadas na análise de micotoxinas (BERTHILLER et al., 2014). A MS/MS é uma das técnicas mais importantes de análise molecular e, quando acoplada com técnicas cromatográficas, combina a capacidade de separação da cromatografia com seu alto potencial em fornecer informações estruturais de massa molecular (COLLINS et al., 2006; LI et al., 2017). Além disso, apresenta alta seletividade e, em alguns casos, permite a quantificação de picos sobrepostos, diferentemente dos detectores por absorbância no UV e no VIS. Os espectrômetros de massas podem diferir entre si pelo tipo de fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons (COLLINS et al., 2006).

2.6. VALIDAÇÃO

Os métodos analíticos desempenham um papel essencial no cumprimento adequado dos atributos de qualidade do produto. No entanto, a qualidade adequada só pode ser alcançada se o método passar por um processo de validação adequado. A validação analítica compreende uma ferramenta formal, sistemática e documentada que mede a capacidade de um método analítico de fornecer resultados confiáveis, precisos e reproduzíveis (ANVISA, 2017).

O objetivo final da validação de um método analítico é garantir que todas as medições futuras em análises de rotina sejam próximas o suficiente do valor verdadeiro desconhecido para o conteúdo do analito na amostra. Consequentemente, os objetivos da validação não são simplesmente obter estimativas de veracidade ou viés e precisão, mas também avaliar aqueles riscos que podem ser expressos pela incerteza de medição associada ao resultado (EURACHEM, 2014).

Um requisito muito importante que confere certa credibilidade na validação e a incerteza da medição remete a deficiência de conhecimento do valor exato. A estimativa de incertezas de medição é um importante elemento do processo analítico em laboratórios químicos, visto que apenas com um resultado de medição expresso pelo valor adquirido e sua respectiva incerteza, é possível obter conclusões aceitáveis em relação à grandeza medida. Esta preocupação tem destaque em especial quando o objetivo dos ensaios é obter evidências do atendimento a requisitos legais e regulamentares. (EURACHEM, 2014).

Os parâmetros da validação de métodos analíticos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organização internacionais e nacionais. A Decisão da Comissão CE 2002/657, por exemplo, que é uma das diretrizes europeias que determina sobre performance de métodos analíticos e interpretação de resultados, define os seguintes parâmetros: especificidade/seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação e precisão (CE, 2006). Já os parâmetros adotados pela ANVISA consideram as características individuais de desempenho; de acordo com a abordagem de validação interna, os principais parâmetros de validação são linearidade/faixa de trabalho, especificidade, sensibilidade, recuperação de extração, exatidão, precisão, LOD e LOQ, robustez, curva de calibração, precisão intermediária, reprodutibilidade e repetibilidade (ANVISA, 2003). Certos valores, como os de repetibilidade e reprodutibilidade (Tabela 2), são recomendados para alguns critérios da validação e precisam ser seguidos para dar credibilidade aos resultados.

Tabela 2 - Critérios de desempenho para a determinação dos níveis de patulina (PAT) em alimentos (Tabela adaptada do Regulamento da Comissão (CE) n.º 401/2006).

Analito	Faixa de concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Valor recomendado dos critérios		
		Precisão RSD _r (%)	Precisão RSD _R (%)	Recuperação (%)
PAT	<20	≤ 30	≤ 40	50-120
	20–50	≤ 20	≤ 30	70-105
	>50	≤ 15	≤ 25	75-105

RSD R - Desvio padrão relativo calculado a partir dos resultados gerados em condições de reprodutibilidade; RSD r - Desvio padrão relativo calculado a partir dos resultados gerados em condições de repetibilidade.

Outro elemento importante para certificar a qualidade do método analítico é a realização de testes de proficiência. Os ensaios de proficiência são considerados ferramentas de controle de qualidade externo (EURACHEM, 2014). Nesses ensaios, cujos os processos são harmonizados entre AOAC International, ISO e IUPAC, os laboratórios participantes analisam o material distribuído pelo organizador, empregando o procedimento analítico utilizado em suas rotinas de trabalho. O objetivo fundamental é aferir o desempenho do método analítico para um certo analito (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2017). A atuação é avaliada pelo *z-score*, que indica se o laboratório tem desempenho aceitável. Os resultados são estimados corretos se o *z-score* estiver entre + 2 e - 2, sendo que valores mais próximos a 0 são considerados os melhores resultados.

3. ARTIGO

Development and validation of an extraction method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine patulin in apple juice

Cristiane Rosa da Silva^a, Cristina Tonial Simões^a, Juliano Kobs Vidal^a, Magdiél Antonio Reghelin^a, Carlos Alberto Araújo de Almeida^a, Carlos Augusto Mallmann^{a*}

^aLaboratory of Mycotoxicological Analyses (LAMIC), Federal University of Santa Maria (UFSM)

C.P 5011, 97105-970, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil; mallmann@lamic.ufsm.br

(Artigo submetido à revista Food Chemistry)

* Corresponding author: mallmann@lamic.ufsm.br

C.A. Mallmann

Laboratory of Mycotoxicological Analyses (LAMIC), Federal University of Santa Maria (UFSM)

Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Phone/FAX: +55 55 3220-8445

Abstract

Patulin (PAT) is a potent mycotoxin commonly found in apples and apple-based products such as juice, thus affecting global food safety. Therefore, development of fast and simple analytical methods to effectively control its contamination is of great importance. This study developed and validated a technique for the analysis of PAT in samples of industrialized apple juice based on liquid-liquid extraction and using acetonitrile as the extraction solvent. Detection via mass spectrometry was performed after Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI). Mean recoveries of 97.5, 92.49 and 96.92% were reached for 4, 8 and 20 µg/L of PAT, respectively. The analyte was monitored with an APCI source in negative ion mode to identify its fragments. The 24 analyzed samples presented PAT levels below the limit of quantification. It may be concluded that the method fulfilled all of the validation criteria, thus being appropriate for routine surveillance of PAT in apple juice.

Keywords: Acetonitrile, Apple juice, HPLC-MS/MS, liquid-liquid extraction.

1. Introduction

Brazil is a large apple producer, having harvested 939 thousand tons in 2019 (ABPM, 2019). This fruit is typically used in human and animal diet; nevertheless, it is susceptible to patulin (PAT) contamination. Although PAT occurrence in apple is mainly associated with rotten spots, it can penetrate into healthy fruit tissue (Lazzarotto et al., 2012). Thus, mycotoxicological monitoring of apples and apple-based food products, such as juice, is of paramount importance (Song et al., 2021).

PAT (a polyketide lactone 4-hydroxy-4 *H*-furo (3,2c) pyran-2 (6*H*) -one), which is a common contaminant of food and feed, belongs to a class of toxic compounds named mycotoxins (Zbyňovská et al., 2016). This metabolite is produced by a diversity of fungi, including *Penicillium expansum*, *P. patulum*, *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. claviforme*, *Saccharomyces vesicarium*, *Alternaria alternata*, and *Aspergillus* (Moake et al., 2005; Kumar et al., 2021).

In Brazil, the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) establishes the maximum tolerable levels of mycotoxins in foods through Resolution RDC n. 7, Feb 18, 2011; the limit set for PAT in apple juice and pulp is 50 µg/kg (ANVISA, 2011). The European Union fixed the same level of PAT for such items, and 25 µg/kg for solid apple products including compote and puree. Moreover, 10 µg/kg is recommended as a maximum permitted limit for apple products intended for children (Commission Regulation, CE, 2006).

Due to concerns with PAT toxicity and wide distribution, there is a need to develop fast and simple analytical methods to effectively control its contamination. Composition of apple juice is complex; therefore, influences on PAT quantification may occur. Besides water, total solids present in apple juices include especially sugar, phenolic compounds, sorbitol, amino acid, ester, organic acid and mineral elements. Thus, proper sample pretreatment must be carried out to preconcentrate PAT contained in this complex matrix (Li et al., 2018).

Sample preparation and extraction techniques are required prior analytical processes. Liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) are used worldwide to extract PAT (Turner et al., 2015). The extraction solvent is similarly relevant and must meet the following criteria: be immiscible with water; have a high extraction efficiency for the target analytes; present a lower density than water; have a limited solubility in water; display a good chromatographic behavior; and favor emulsion formation upon vortexing (Jia et al., 2010).

The current conventional methods applied to determine mycotoxins at low concentrations depend on high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to an ultraviolet (UV) or fluorescence detector and, more recently, detection via mass spectrometry (MS). The MS detector offers high sensitivity, selectivity, accurate analyte identification and precise quantification (Chandra, et al., 2017).

Even though the instrumental methodologies employed for detection and quantification of other regulated mycotoxins have markedly evolved in the past years (Berthiller et al., 2014), analytical techniques for PAT detection are still very restricted. Currently, the most frequently used methods are based on HPLC coupled to conventional detection techniques, such as UV and diode array (DAD) detectors (Barreira et al., 2010, Marsol-Vall et al., 2014).

Undoubtedly, the methods based on HPLC-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) compete with the most appropriate analytical strategies for mycotoxins analysis (Berthiller et al., 2014). MS is one of the most important techniques of molecular analysis; when coupled to chromatographic methods, its high potential to provide molecular mass structural information is combined with the separation capability of chromatography (Collins et al., 2006; Li et al., 2017). Furthermore, it presents high selectivity and, unlike UV and visible absorbance detectors, allows quantification of overlapping peaks.

Methodology development may take multiple forms, from adjusting an existing method through minimal variations to conceptualizing a new one from an experimental sketch

(Magnusson and Örnemark, 2014). Validation must prove that the analytical method complies with the criteria applicable to the particularities relevant to performance (EC, 2006). Thus, this study aimed to determine and validate a method for PAT extraction in apple juice using acetonitrile (ACN) as solvent.

2. Material and Methods

2.1. Chemical products and reagents

ACN, methanol (MeOH) and ethyl acetate (EtOAc) (HPLC grade) were used as organic solvents, and acetic acid (AcOH) and ammonium acetate (NH₄AC) (J.T Baker, USA) as reagents (for analysis, HPLC grade, 98-99.9% purity). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q[®] Advantage A10 Water Purification System (Millipore - USA).

2.2. Standard

The lyophilized PAT standard with a concentration of 5 mg (product reference P1639) was purchased from Sigma Aldrich (USA). A stock solution was prepared at a concentration of 100,000 µg/L in ACN and stored at -20 ° C. From the stock solution, it was prepared an intermediate standard at 1,000 µg/L in a mixture of ACN and water (10:90, v:v), which was employed to build the calibration curve and to fortify the samples.

2.3. Sample fortification

The apple juice samples which were previously analyzed by MS spectrometry and showed no PAT contamination were fortified with the standard to estimate recovery of the method. The blank samples (free of contamination) were fortified at 4, 8 and 20 µg/L by adding adequate volumes of the solution prepared in the diluent; then the samples were allowed to rest for 30 min prior to analysis.

2.4. Sample preparation and extraction

Twenty-four apple juices were acquired in Brazilian commercial establishments in 2020 and tested at the Laboratory of Mycotoxicological Analyses (LAMIC, Santa Maria, Brazil). All the samples were sourced from clear appearance juices, of which three were organic while the others were conventional juices. When absence of PAT was verified, they were used in the evaluation as blank samples.

Different known and normally used extraction procedures were assessed to determine the best method for PAT extraction.

A sample volume of 1 mL was added to a 50 mL centrifugal tube; 10 mL of ACN was also added, then the tube was placed in an MA563 shaker (Marconi, Brazil) for 20 min. Next, the extract was spun (Eppendorf - 5804R) at 10,000 rpm, 10 °C, for 5 min, and 5 mL was evaporated under a nitrogen stream at 40 °C. The residue was then reconstituted in 0.2 mL ACN and agitated for 1 min. The obtained eluate was placed in a vial for posterior injection of 50 µL into the HPLC-MS/MS system.

2.5. High-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

The 1200 Series HPLC system (Agilent Technologies Inc., USA) was coupled to a 4000 TRAP mass spectrometer (Sciex, Canada) equipped with Atmospher Pressure Chemical Ionization (APCI) source in negative mode. The mobile phases in gradient elution were composed of water:AcOH (90:10, v/v) and ACN:AcOH (90:10, v/v). Chromatographic separation was carried out using an Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 x 150 mm, 5 µm particle diameter, Agilent Technologies Inc., USA). Retention time for PAT was 3.6 min.

The gradient program was started with 1% B for 1 min. Next, the gradient was increased to reach 100% B for 3.5 min and kept at 99% B for 1 min. Finally, the gradient was returned to

the starting conditions of 1% B for column re-equilibration, resulting in a total running time of 10 min. The temperature column was adjusted to 40 °C; the injection volume was 50 µL at a flow rate of 1 mL/min.

Electrospray ionization (ESI) and APCI were tested to select the source for ionization of the PAT molecule. A full scan was performed in the m/z 100-200 range to determine the most accurate ionization configuration of the PAT molecule; the precursor ion was also monitored (m/z 152.9 in negative mode) with the use of a 1,000 µg/L standard.

2.6. Limit of detection and limit of quantification

Signal-to-noise ratio, which should be at least 3, was analyzed to determine the limit of detection (LOD). The limit of quantification (LOQ) was calculated on the basis of different standards injected in ascending concentration order. The standard which provided a signal-to-noise ratio at least 10 times greater than the baseline oscillations measurement was determined as LOQ.

2.7. Analytical curve and linearity

The working range (curve and calibration) was established according to the standards prepared in ascending order, based on the estimated LOQ. Linearity was assessed on the base of the linear equation and the correlation coefficient (r) obtained via the Analyst[®] software used to quantify the analyte under study. The calibration curve for seven concentrations of the standard was used to confirm linearity. The points 1, 2, 3, 5, 10, 20 and 30 µg/L were used to build a standard curve based on the intermediate standard of 1,000 µg/L; the dilutions were prepared with ultrapure water:ACN (90:10 v/v).

2.8. Recovery, selectivity and matrix effect

Estimation of method recovery was based on the mean and the relative standard deviation (RSD) obtained through the analysis of fortified samples with three levels of PAT contamination: 4, 8 and 20 µg/L. The findings were examined as stated by Commission Regulation (EC) No. 401/2006: contaminations ranging from 20 to 50 µg/L must show recoveries between 70 and 105%. Quantification was performed via external calibration curves. Acceptable recoveries ranging from 70 to 120% and RSD below 20% were set considering recommended values (EC, 2006).

Selectivity was verified by comparing the chromatogram obtained when analyzing the uncontaminated sample with the chromatogram of the sample to which PAT standard was added. Repeatability of the method was evaluated by extracting and quantifying the fortified samples in septuplicate, in three concentration levels. The obtained results were studied according to the RSD between the concentrations found for each fortification. Assessment of the intermediate precision was based on extraction and analysis of fortified samples on three different days by three distinct analysts.

To evaluate the matrix effect, tests were performed with the apple juice matrix, evaluating whether it generates any suppression of the analyte signal. Standard curves were prepared, in 5 replicates, being: standard curve without adding matrix and standard curve with addition of matrix. The results obtained for the validated method can be observed by F Test (MAPA, 2011). In this study, the variances for the replicates with and without matrix aimed at verifying the homogeneity of the variances. One variance is divided by the other (with the largest variance in the numerator) and the value obtained is compared with the table of F values, considering degrees of freedom ($n - 1$) and 95% of confidence index.

2.9. Analytical quality assurance and uncertainty

The signal-to-noise ratios for LOQ and LOD were set at 10/1 and 3/1, respectively, to ensure reliability of results. Reproducibility of the method was also tested by extracting a sample of the PAT proficiency test from Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) in apple juice, FAPAS® Proficiency Test 1672. The certified apple juice sample containing PAT at 39.6 µg/L was used to assess the efficacy of the method.

The uncertainty of the method was calculated according to Magnusson et al. (2013) and Meerpoel et al. (2018). The combined standard uncertainty (u_c) is equal to the positive square root of the intermediate precision and the bias of the analytical method, which comprises the uncertainty of the purity of the standards used ($U[C_{ref}]$), the precision of the bias (S_{bias}) and the root mean square of the bias (RMS_{bias}). The combined expanded measurement uncertainty, expressed as U , was obtained by multiplying the standard measurement uncertainty by a coverage factor ($k = 2$) and gave a range that contained the result with 95% confidence. Finally, the uncertainty of the method was calculated using the following equation:

$$U = 2 \times u_c = 2 \times \sqrt{(RSD_R^2 + U [C_{ref}]^2 + S_{bias}^2 + RMS_{bias}^2)}$$

2.10. Validation of the analytical method

The guidelines on validation of analytical methods adopted by the National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO, 2003) were followed for method validation. The samples with added contamination were extracted and examined according to the developed procedure; the process was reproduced on three different days by three distinct analysts.

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation parameters

This study assessed the effect of important parameters which may influence the extraction efficiency of PAT in apple juice, as sample phase, organic extraction solvent, column and extraction time. Optimizations were performed in 8 µg/L PAT solutions for four repetitions. Choosing a proper extraction solvent is one of the most relevant aspects related to the LLE procedure. EtOAc and hexane were the predominant extraction solvents used in a study in liquid-phase extraction (Li et al., 2017). EtOAc is typically used as extraction solvent for PAT analysis. Besides EtOAc, the current investigation also tested ACN to determine extraction efficiency. As well as in Moake (2005) and Murillo et al. (2008), ACN was chosen for generating more defined chromatographic peaks. Moreover, EtOAc was much less efficient, *i.e.*, ACN showed higher recovery (91.5%), higher precision and a cleaner baseline. Similarly, other researchers (Coton et al., 2020; Taspinar et al., 2021) have recently opted for ACN as a patulin solvent extractor.

Jia et al. (2010) investigated the influence of vortex time on extraction and mass transfer of the analytes, which ultimately affects extraction efficiency. Likewise, the present study evaluated vortex time in the range 10-25 min, at 2,500 rpm. Peak areas of PAT were slightly larger when extending time to 20 min, but there was no marked increase when applying longer times; therefore, in agreement with other studies (Yu and Fan, 2017; Li et al., 2018), a vortex time of 20 min at 2,500 rpm was used.

In this assessment, water-MeOH and water-ACN with and without modifiers (NH₄AC and AcOH) were observed to determine the most appropriate mobile phase, *i.e.*, the one which leads to maximum sensitivity preserving a good shape of the chromatographic peak. The peaks were well separated in the composition of pairs of both phases, showing very consistent chromatograms. Nevertheless, in disagreement with Yu and Fan (2017) who used methanol and water at 10:90 ratio (v/v) to achieved better results, in the present study ACN provided better

results than MeOH regarding chromatographic definition, improved peak shapes and higher resolution for the compounds.

In accordance with Wang et al. (2017) the method described herein achieved good results by acidifying the mobile phases with acetic acid, unlike Li et al. (2017), who acidified the mobile phases with a low signal response in the final result. As well as Torović et al. (2017), C18 stationary phase was chosen for achieving better separation, besides more defined peaks.

3.2. Instrumental optimization

Mass spectrometric parameters were optimized in order to identify the optimal conditions for MS/MS detection of PAT. APCI was the source chosen for PAT ionization, since it provided higher sensitivity and signal constancy. In keeping with Sewram et al. (2000) and Vaclavikova et al. (2015), a higher signal intensity was obtained in negative ion mode. Rosinská et al. (2009) and Moreno-González et al. (2020), in turn, selected ESI ionization in positive mode to analyze apple juice and other apple-based products.

After choosing the ionization source, a product and precursor ions scanning experiment was performed to determine the fragments to compose the analytical method in order to select the best parameters to monitor the precursor ion and its respective fragments. Greater intensity of the ion signal was found for fragments m/z 108.9, m/z 134.8 and m/z 124.8, which are in line with previous data (Zhou et al, 2012).

Ion source-dependent parameters were obtained by Flow Injection Analysis (FIA) using automated optimization; different combinations of values were applied to determine which is best for PAT detection. Table 1 displays the parameters dependent on the compound established for the method.

Table 1 - Mass spectrometric parameters for patulin.

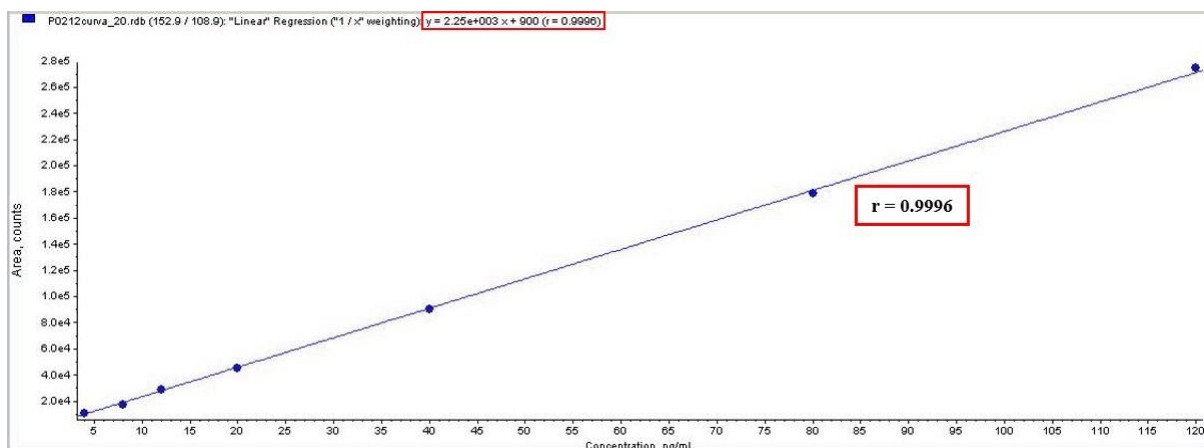
Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Declustering potential (v)	Collision energy (v)	Collision cell exit potential (v)
	108.9	-35	-14	-5
152.9	124.8	-35	-14	-21
	134.8	-35	-12	-5

3.3. Method validation

The working range was 1-30 µg/L; the points that constitute the calibration curve were 1, 2, 3, 5, 10, 20 and 30 µg/L, which correspond to the following contamination levels, respectively: 4, 8, 12, 20, 40, 80 and 120 µg/L. Linearity of the calibration curve is supported by the correlation coefficient $r = 0.9997$ (Figure 1), which was the same obtained by Li et al. (2018) and Taspınar et al. (2021). Therefore, such value allows to conclude that the model is adequate, since r was higher than 0.999, which was estimated as evidence of an ideal fit of the data for the regression line.

With respect to the matrix effect, the calculated F value (1.23) was lower than the tabulated F value (10.67), demonstrating that the matrix has no effect, as occurred with Sadok et al. (2018). Because it did not present a matrix effect and the method was developed by using a detector considered sensitive and selective (MS/MS), it was decided, as well as in previous studies (Sadok et al., 2018; Taspınar et al., 2021), not to use an internal PAT standard.

Figure 1 - Linearity of the analytical curve for patulin with and without the matrix.



Method selectivity is the capacity to correctly measure the analytes in the presence of elements that may interfere with determination in a complex sample. The selectivity of this method corroborates the selectivity of the study conducted by Sadok et al. (2018) when it was verified by duplicate analysis of 10 strawberry samples without fortification. For all samples evaluated in the present assay, no peak of interfering compounds was detected in the PAT retention time, thus confirming the selectivity of the method. When comparing the chromatogram of the uncontaminated sample (Figure 2) with the chromatogram of the sample to which PAT standard was added (Figure 3), it may be verified that there is no chromatographic signal at the same retention time and showing the same fragments of PAT, thus evidencing that the method is selective.

Figure 2- Chromatogram of patulin-free sample (blank sample).

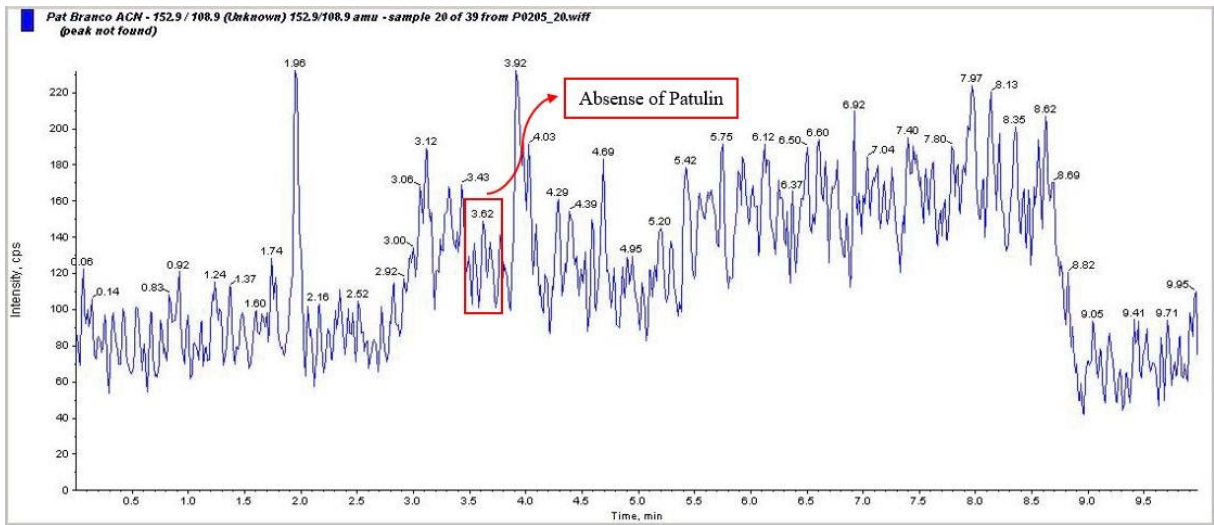
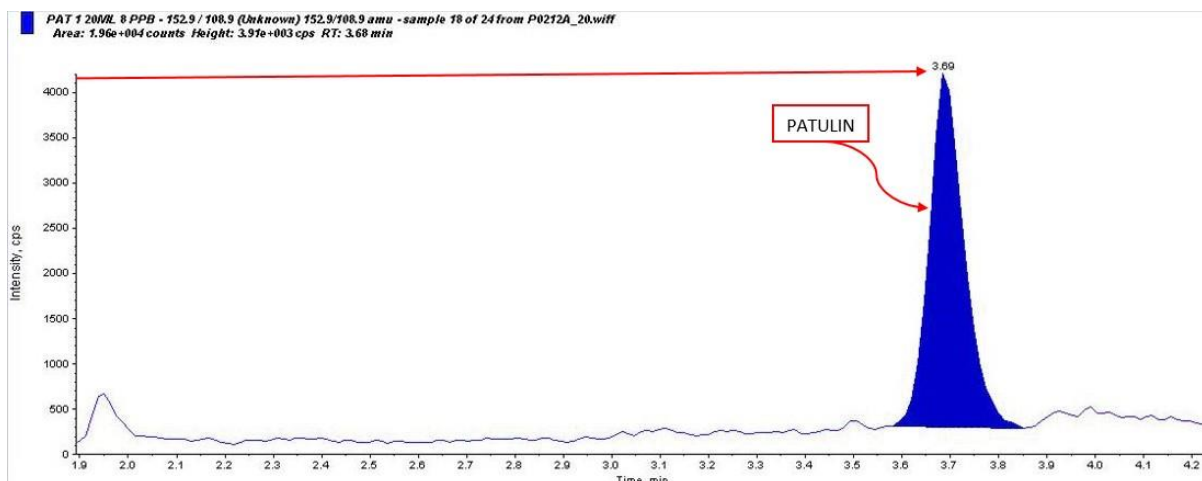


Figure 3- Chromatogram of patulin-contaminated sample (fortified sample).



Analysis of the fortified samples showed the RSD for repeatability of 5.19, 4.43 and 5.68% for contaminations of 4, 8 and 20 $\mu\text{g/L}$, respectively. The intermediate precision, calculated over three days of sample repetitions, indicated an RSD of 8.08, 4.64 and 5.09% for the lower, the intermediate and the higher concentrations, respectively. Mean recoveries of 97.5, 92.49 and 96.92% were reached for the lower, the intermediate and the higher concentrations, respectively. The mean recovery for all concentration levels, *i.e.*, total recovery of the method, was 95.64%. Similar results were achieved by Taşpınar et al. (2021), who optimized a method below the LOD ($3.5 \mu\text{gL}^{-1}$) with good recoveries (94-104%). The results achieved for repeatability, intermediate precision and recovery (Table 2) are in agreement with the parameters established by Commission Regulation (EC) No. 401/2006, thus evidencing that the method is legitimate.

Table 2 - Results of the repeatability, intermediate precision and recovery tests.

Fortification ($\mu\text{g/L}$)	Repeatability		Intermediate precision	
	Mean recovery (%)*	RSD (%)**	Mean recovery (%)***	RSD (%)**
4	99.36	5.19	97.50	8.08
8	97.93	4.43	92.49	5.69
20	99.14	5.68	96.92	5.09

*Mean of the samples analyzed in septuplicate on the same day. **Relative standard deviation. ***Mean of the 21 replicates analyzed on three different days.

Literature confirms that the choice for using HPLC-MS/MS was appropriate, since it delivers more selectivity and sensitivity than other instrumental methods. In the present study, mean recovery ranged from 86.52 to 100.3%, which is consistent with the ranges 91.6-95.7% obtained in a previous assessment employing the same detection method (Yang et al., 2017) and 90.2-106.9% obtained by Altunay et al. (2019) for fruit juices. Another investigation found mean recoveries of $101 \pm 6\%$ (50 $\mu\text{g/L}$), $103 \pm 5\%$ (250 $\mu\text{g/L}$) and $102 \pm 5\%$ (1,000 $\mu\text{g/L}$), but an atmospheric pressure photoionization method was applied (Zhang et al., 2014). Wang et al. (2016) also used an ESI source to analyze a variety of fruits, including apple, and obtained recoveries between 74.2 and 102.4%. Rosinská et al. (2009) employed UV and MS/MS to evaluate PAT in cloudy apple juice; both detectors proved to be efficient, but MS/MS provided enhanced results, as shorter analysis time.

The uncertainty of the method described in the present study was estimated on three different days for three different concentrations 4, 8 and 20 $\mu\text{g/L}$ in replicates of 7 times for each concentration, obtaining 0.37%, 6.62% and 1.13% of uncertainty each, respectively. These uncertainty results appear to be satisfactory, as Li et al. (2018) achieved an uncertainty of 4.8% with 50 μg patulin/L and Zhang et al. (2014) estimated the expanded uncertainties with 50, 250, and 1000 $\mu\text{g/L}$ at 26, 11, and 9%, respectively.

In the present study, a LOD of 0.5 $\mu\text{g/L}$ was found; the limit of instrumental quantification was 1 $\mu\text{g/L}$, which corresponds to a LOQ of 4 $\mu\text{g/L}$ after correlation with the dilution factor. Analysis of the apple juice sample supplied by FAPAS resulted in a contamination level of 38 $\mu\text{g/L}$, thus showing an acceptable recovery of 95.9%. According to the organizer of the proficiency test, findings are considered satisfactory if the *Z-score* is within -2 and 2. The result obtained by FAPAS 1672, expressed in *Z-score*, was -0.19 (Table 3), thus ratifying that the analytical method offers an appropriate reliability.

Table 3 - Results from the Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS®) proficiency test for the analysis of patulin in apple juice.

FAPAS® N°	FAPAS result (µg/L)	Method result (µg/L)	<i>z-score</i> ¹
01672	39.6	38	-0.19

¹ $Z\text{-score} = (x - x_a) / \sigma_p$, where x = concentration found by the participant, x_a = value attributed by FAPAS, and σ_p = standard deviation for proficiency.

The method described herein was applied to analyze commercial apple juices, which included concentrated samples. None of the tested juices was contaminated with PAT. Zhou et al. (2012), in turn, reported natural occurrence of PAT in two of 25 samples of apple juice. Another study conducted by Cunha et al. (2014) found that five out of nine samples of apple juice contained PAT at levels ranging between 1.86 and 45.77 µg/L; such results may be due to the fact that the investigated juices were concentrated; besides, the DNA barcoding technique was used for molecular identification of the fungi isolated from the samples. A method developed in Japan analyzed seven apple juice samples and found that three of them were contaminated with PAT (Li et al., 2018). In Malaysia, Lee et al. (2014) examined fruit juices for the presence of PAT and observed that 5% of the 56 tested samples were contaminated with the toxin; nevertheless, the study employed the UV detector, which may interfere with the final results since it is not as sensitive as MS/MS.

4. Conclusion

PAT contamination is a global issue and its toxicity demands permanent surveillance. A sensitive and reliable method was optimized for PAT quantification in apple juice using the HPLC-MS/MS system. The method applicability was confirmed by the analysis of fortified samples in the method validation, and satisfactory results regarding accuracy and precision were achieved. APCI was the source of choice for demonstrating more defined chromatograms, and ACN was used as the extraction solvent for the same reason. Reproducibility of the method was confirmed by the 95.9% recovery obtained when performing the proficiency test for PAT

provided by FAPAS; a good selectivity was also demonstrated. Therefore, the method described herein offered acceptable results in all steps of validation; it proved to be sensitive, precise and accurate, which suggests it is adequate for quantification of PAT in apple juice. None of the analyzed samples was contaminated with PAT. It may be concluded that the method fulfilled all of the validation criteria, *i.e.*, it is appropriate for routine surveillance of PAT in apple juice.

Acknowledgments

Carlos Augusto Mallmann is grateful for the fellowship of research productivity (PQ) granted by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors also thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for providing graduate fellowship to Cristiane Rosa da Silva, Carlos Alberto Araújo de Almeida, Cristina Tonial Simões, Juliano Kobs Vidal, and Magdiél Antonio Reghelin.

References

- ABPM, 2019. Associação Brasileira dos Produtos de Maçã. Retrieved from: <http://www.abpm.org.br>. Accessed February, 2, 2021.
- Altunay, N., Elik, A., Gürkan, R. (2019). A novel, green and safe ultrasound-assisted emulsification liquid phase microextraction based on alcohol-based deep eutectic solvent for determination of patulin in fruit juices by spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, Article 103256. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103256>
- Barreira, M.J., Alvito, P.C., Almeida C.M.M. (2010). Occurrence of patulin in apple-based foods in Portugal, *Food Chemistry*, 121, 653-658 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.085>
- Berthiller, F., Burdaspal, P.A., Crews, C., Iha, M.H., Krska, R., Lattanzio, V.M.T. et al. (2014). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. *World Mycotoxin Journal*, 7, 3-33. <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/WMJ2013.1637>.
- BRASIL, 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitárias. (ANVISA). Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos, 2011.
- BRASIL, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. – Brasília: Mapa/ACS, 2011. 72 p. ISBN 978-85-7991-053-1.

Chandra, S., Patras, A., Pokharel, B., Bansode, R.R., Begum, A., Sasges, M. (2017). Patulin degradation and cytotoxicity evaluation of UV irradiated apple juice using human peripheral blood mononuclear cells. *Food Process Engineering*, 40, article e12586. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12586>

Collins, C. H.; Braga, G. L. & Bonato, P. S. (2006). Fundamentos de Cromatografia. 5º ed. p.456.

Commission regulation (EC). (2006). N°. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal European*, L41 p. 12-15. Retrieved from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32006R0401>

Coton, M., Bregier, T., Poirier, E., Debaets, S., Arnich, N., Coton, E., Dantigny, P. (2020). Production and migration of patulin in *Penicillium expansum* molded apples during cold and ambient storage. *International Journal of Food Microbiology*, 313, 108-377. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108377>

Cunha, S.C., Faria, M.A., Pereira, V.L., Oliveira, T.M., Lima, A.C., Pinto, E. (2014). Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control*, 44, 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.043>

INMETRO (2003). Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e. Qualidade Industrial – DOC CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaio químico. Rio de Janeiro, 35p.

Jia, C., Zhu, X., Wang, J., Zhao, E., He, M., Chen, L., Yu, P. (2010). Extraction of pesticides in water samples using vortex-assisted liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography*, 1217, 5868 – 5871. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.055>

Kumar, D., Kamle, M., Sharma, B., Pandhi, S., Devi, S., Dhawan, K., Selvakumar, R., Mishra, D., Kumar, A., Arora, S., Singh, N.A., Kumar, P. (2021). Patulin in food: A mycotoxin concern for human health and its management strategies. *Toxicon*, 198, 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.027>

Lazzarotto, J. J., Zanús, M. C., Girardi, C. L., Taffarel, J. C., Monteiro, R. Ben, R. L. (2012). Sidra com padrão tecnológico diferenciado: uma avaliação junto ao setor produtivo da maçã brasileira, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. Retrieved from: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/938695>

Lee, T.P., Sakai, R., Manaf, N.A., Rodhi, A.M., Saad, B. (2014). High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. *Food Control*, 38, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.018>

Li, X., Li, H., Li, X., Zhang, Q. (2017). Determination of trace patulin in apple-based food matrices. *Food Chemistry*, 233, 290-301. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.117>

Li, X., Li, H., Ma, W., Guo, Z., Li, X., Li, X., Zhang, Q. (2018). Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid

chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 257, 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.077>

Magnusson, B and Örnemark, U. (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for purpose of analytical methods – A Laboratory guide to method validation and related topics, 2nd ed., Eurachem, 2014, ISBN 978-91-87461-59-0. Retrieved from <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>

Marsol-Vall, A., Delpino-Rius, A., Eras, J., Balcells, M., Canela-Garayoa, R. (2014). A fast and reliable UHPLC-PDA method for determination of patulin in apple food products using QuEChERS extraction. *Food Analytical Methods*, 7 (2), 465-471.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-013-9648-y>

Meerpoel, C., Vidal, A., di Mavungu, J.D., Huybrechts, B., Tangni, E.K., Devreese M., Croubels S., De Saeger, S. (2018). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin a in a variety of feed and foodstuffs. *Journal of Chromatography A*. 1580, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.039>

Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W. (2005). Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4 (1), 8-21. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00068.x>

Moreno-González, D., Jáč, P., Riasová, P., Nováková, L. (2021). In-line molecularly imprinted polymer solid phase extraction-capillary electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry for the determination of patulin in apple-based food. *Food Chemistry*, 334, Article 127607, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127607>

Murillo, M., Gonzalez-Penas, E., Amezcua, S. (2008). Determination of patulin in commercial apple juice by micellar electrokinetic chromatography. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (1), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.024>

Rosinská D., Vierikova, M., Lehotay, J. (2009). Determination of Patulin in Apple Products using HPLC with Photodiode Array Detector and Ultra Performance Liquid Chromatography with Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32 (4), 500–511. <https://doi.org/10.1080/10826070802671358>

Sadok, I., Szmagara, A., Staniszewska, M.M. (2018). The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. *Food Chemistry*, 245, 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.093>

Sewram, V., Nair, J.J, Nieuwoudt, T.W., Leggott, N.L., Shephard, G.S., (2000). Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 897, 365-374. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00830-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00830-X)

Song, X., Wang, D., Kimb, M. (2021). Development of an immuno-electrochemical glass carbon electrode sensor based on graphene oxide/gold nanocomposite and antibody for the detection of patulin. *Food Chemistry*, 342, 128-257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128257>

Taşpınar, H., Elik, A., Kaya, S., Altunay, N. (2021). Optimization of green and rapid analytical procedure for the extraction of patulin in fruit juice and dried fruit samples by air-assisted natural deep eutectic solvent-based solidified homogeneous liquid phase microextraction using experimental design and computational chemistry approach. *Food Chemistry*, 358, 129-817. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129817>

Torović, L., Dimitrov, N., Assunção, R., Alvito, P. (2017). Risk assessment of patulin intake through apple-based food by infants and preschool children in Serbia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34, 2023-2032. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2017.1364434>

Turner, A.D., McNabb, P.S., D.T. Harwood, A.I. Selwood, M.J. (2015). Single-laboratory validation of a multitoxin UltraPerformance LC-hydrophilic interaction LC-MS/MS method for quantitation of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish. *Journal of AOAC International*, 98 (3), 609-621. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-275>

Vaclavikova, M., Dzuman, Z., Lacina, O., Fenclova, M., Veprikova, Z., Zachariasova, M., Hajslova, H. (2015). Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC–MS/MS analytical procedure. *Food Control*, 47, 577-584. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.064>

Wang, M., Jiang, N., Xian, H., Wei, D.Z., Shi, L., Feng, X.Y. (2016). A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1429, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.004>

Wang, Y., Wen, Y., Ling, Y.C. (2017). Graphene oxide-based magnetic solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography for determination of patulin in apple juice. *Food Analytical Methods*, 10 (1), 210-218. Doi: 10.1007/s12161-016-0570-y

Yang, Y., Shao, B., Zhang, J. (2017). A Simple and Rapid Method for Determination of Patulin in Juice by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10, 2913–2918. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-017-0859-5>

Yu, Y. and Fan, Z. (2017). Determination of patulin in apple juice using magnetic solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34 (2), 273-281. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1266394>

Zhang, K., Wong, J.W., Mai, H., Trucksess, M.W. Dopant-Assisted Atmospheric Pressure Photoionization of Patulin in Apple Juice and Apple-Based Food with Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. (2014). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4112-4118. <https://doi.org/10.1021/jf5006726>.

Zbyňovská, K., Petruška, P. Kalafová, A., Capcarová, M. (2016). Patulin—a contaminant of food and feed: A review. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 19 (2), 64-67. <dx.doi.org/10.15414/afz.2016.19.02.64-67>

Zhou, Y. Kong, W., Li, Y., Logrieco, A.F., Xu, J., Yang, M. (2012). A new solid-phase extraction and HPLC method for determination of patulin in apple products and hawthorn juice in China. *Journal of Separation Science*, 35, 641–649. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100919>

4. CONCLUSÃO

A contaminação por PAT é um problema mundial e sua toxicidade demanda vigilância global. Um método sensível e confiável foi otimizado para a quantificação de PAT em suco de maçã utilizando o sistema CLAE-MS/MS. A aplicabilidade do método foi confirmada pela análise de amostras fortificadas na validação do método, com resultados satisfatórios em termos de exatidão e precisão. A fonte escolhida foi APCI por apresentar cromatogramas mais definidos, assim como o acetonitrila como solvente extrator. A reprodutibilidade da metodologia foi confirmada pelos resultados de um teste de proficiência de FAPAS, o qual apresentou uma recuperação aceitável de 95,9%; além disso, uma boa seletividade também foi obtida. Sendo assim, o método estudado ofereceu resultados aceitáveis em todas as fases de validação, mostrando ser sensível, preciso e exato; portanto, é adequado para a quantificação de PAT em suco de maçã. Nenhuma amostra analisada apresentou contaminação por PAT. A utilização de CLAE-MS/MS se demonstrou muito eficiente e sensível para a detecção do analito, evidenciando sua capacidade em gerar ótimos resultados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM. **Associação Brasileira dos Produtos de Maçã**. Disponível em: <http://www.abpm.org.br>. Acesso em: 20 de junho de 2019.

ABPM. **Associação Brasileira dos Produtos de Maçã: Anuário da maçã**. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/maca-e-tudo-de-bom/anuario-brasileiro-da-maca-2019>. Acesso em: 20 de junho de 2019.

ABRUNHOSA, L.; MORALES-VALLE, H.; SOARES, C.M.G.; CALADO, THALITA, C.; VILA-CHÃ, A.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A. Micotoxinas detectadas en productos alimentícios en Portugal: Revisión. **Revista Bio Ciencias**, v. 2, n. 1, p.5 – 31, 2012.

ALBERTI, A.; SANTOS, T.P.M.; ZIELINSKI, A.A.F.; MONGRUEL, C.; SANTOS, E.; BRAGA, C.M.; DEMIATEA, A.M.; NOGUEIRA, A. Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 436–443, 2016.

ALMEIDA C, SERÔDIO P, NOGUEIRA J. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. **Química**, v. 95, p. 69-77, 2004.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D., SCHENC, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, 86 (2) pp. 412-431, 2003. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de métodos Analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de mar. 2011. Seção 1, p. 66-67, 2011.

ANVISA. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166*. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de julho de 2017. https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/d01-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official Method 995.10: determinación de patulina en frutas y alimentos. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17. ed. Washington: AOAC International, 2000.

ASTOVIZ, M. B.; SUAREZ, M. M.S. **Micotoxinas y câncer**. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**. v. 24, n. 1, jan./mar.,2005.

BAERT K, DE MEULENAER B, KAMALA A, KASASE C, DEVLIEGHERE F. Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. **J Food Prot.** v.69, nº 6, p. 1371-1378, 2006.

BARREIRA MJ, PC ALVITO, CMM ALMEIDA. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal, **Food Chemistry**, nº 121, pp. 653 – 658, 2010.

BEMVENUTI, R. H.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e hplc/uv-fl. **Química Nova**, v XY, nº 0, p. 1-6, 2012.

BERTHILLER, F., BURDASPAL, P.A., CREWS, C., IHA, M.H., KRŠKA, R., LATTANZIO, VMT. Desenvolvimentos na análise de micotoxinas: uma atualização para 2012-2013. **World Mycotoxin Journal**, 7 pp. 3 – 33, 2014.

BRASIL. Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Estabelece o regulamento técnico para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para a polpa de fruta. **Diário Oficial** [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, nº. 6, p. 54-5.10 jan. 2000.

CARBONE, K.; GIANNINI, B.; PICCHI, V.; SCALZO, R.L.; CECCHINI, F. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. **Food Chemistry**, v. 127, nº 2, p. 493–500, 2011.

COMMISSION REGULATION (EC). Nº. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal European**, L41 pp. 12-15, 2006.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32006R0401>

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION **EN 14177**: Foodstuffs - Determination of patulin in clear and cloudy apple juice and puree - HPLC method with liquidliquid partition clean-up, 2003.

CHANDRA, S.; PATRAS, A.; POKHAREL, B.; BANSODE, R.; AFROZA BEGUM, A.; SASGES, M. Patulin degradation and cytotoxicity evaluation of UV irradiated apple juice using human peripheral blood mononuclear cells. **Food Process Engineering**, 40:e12586, 2017.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**.5º ed. p.456, 2006.

CRP. Guide pour L'élaboration pasteurisation des jus de fruits. In: PASTEURISATION, C. R. DE (Ed.). Guide pour L'élaboration la pasteurisation des jus de fruits. **Lausanne**: [s.n.]. p. 1–36. <https://www.jus-de-pomme.org/docs/guide/guide.pdf>

EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS Network EMAN. [20-01-2009]; ACESSO: 19/05/2020 <http://www.mycotoxins.org/>.

EURACHEM. Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - **A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 2ª ed., 2014. ISBN 978. ISBN 978 -91-87461-59-0. Disponível em: <http://www.eurachem.org>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO STAT. **Produção Mundial de Maçã**.2018. Disponível em: <www.faostat.fao.org. Acesso em: 16 de junho de 2019.

FOOD SURVEY INFORMATION SHEETS: Survey of baby foods for mycotoxins, FSIS 68/04. 2004 [20-01-09] <https://www.ifst.org/resources/information-statements/mycotoxins>

GAO, Q. ZHANG, XY SUN, L. JIANG, R. ZHANG, GY SUN, YL ZHA, AR Biggs Etiology of Moldy Core, Core Browning, and Core Rot of Fuji Apple in China, **Planta Dis**, 97, pp. 510 – 516, 2013.

GILBERT J, POHLAND AE. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. **Ames(IA): Council for Agricultural Science Technology**; 2003.

GONZALEZ-OSNAYA L, SORIANO J, MOLTO J, MANES J. Exposure to patulin from consumption of apple-based products. **Food Addit Contam** 24(11), p.1268-74, 2010.

GRIMI, N.; MAMOUNI, F.; LEBOVKA, N.; VOROBIEV, N; VAXELAIRE, J. Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 1, p. 52–61, 2011.

HACKBART, H.C.S.; PRIETTO, L.; PRIMEL, E.G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALEFURLONG, E. Simultaneous Extraction and Detection of Ochratoxin A and Citrinin in Rice. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, nº1, p. 103-109, 2012.

IARC. Agents Classified by the International Agency of Research on Cancer Monographs.2018. Disponível em: https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/List_of_Classifications.pdf

International Organization for Standardization. ISO/Guide 35:2017 Reference materials — guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. **International Organization for Standardization**.://www.iso.org/standard/60281.html

JANZANTTI NS, FRANCO MRB, WOSIACKI G. Efeito do Processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência Tecnologia Alimento**, v.23, nº 3, p.523-8, 2003.

JESTOI M. Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin - A review. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v.48, nº 1, p. 21-49, 2008.

KIST, B. B. **Anuário Brasileiro da Maçã**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 72p.

KOZLOWSKA, K; JERUSZKA , M, I; MATUSZEWSKA, I.; ROSZKOWSKI, W.; BARYLKO PIKIELNA, N BRZOZOWSKA, A. Hedonic test in different locations as predictors of apple juice consumption at home in elderly and Young subjects.. **Food Qualit.** Pref. v 14, p. 653-661, 2003.

LANÇAS, FM. A Cromatografia líquida moderna e a Espectrometria de massas: Finalmente compatíveis. **Scientia Chromatographica**. V.1, nº 2, p.36-61, 2004.

LAZZAROTTO, J. J., ZANUS, M. C., GIRARDI, C. L, TAFFAREL, J. C. MONTEIRO, R. BEN, R. L. (2012). Sidra com padrão tecnológico diferenciado: uma avaliação junto ao setor produtivo da maçã brasileira, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/938695>

LEGGOTT NL, SHEPHARD, GS. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, nº 12, p.73-76, 2001.

LI, X., LI, H., LI, X., ZHANG, Q. Determination of trace patulin in apple-based food matrices. **Food Chemistry**, 233 pp. 290-301, 2017.

MAILAFIA, S., GR OKOH, HOK OLABODE, R. Osanupin Isolation and identification of fungi associated with spoilt fruits vended in Gwagwalada market, Abuja, Nigeria, **Veterinary World**, 10, pp. 393-397, 2017.

MAJORS, R.E. QuEChERS — A New Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples. **LCGC Asia Pacific**, v. 11, p. 22-31, 2008.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Pallotti, pp. 238, 2007.

MARKOWSKI, J.;BARON, A.; LE QUÉRÉ, JM; PŁOCHARSKI, W. Composition of clear and cloudy juices from French and Polish apples in relation to processing technology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 813–820, 2015.

MARSOL-VALL, A., DELPINO-RIUS, A., ERAS, J., BALCELLS, M., CANELA-GARAYOA, R. A fast and reliable UHPLC-PDA method for determination of patulin in apple food products using QuEChERS extraction. **Food Analytical Methods**, 7 (2) pp. 465-471, 2014

MARTINS M, GIMENO A, MARTINS H, BERNARDO F. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. **Food Addit Contam.**, v,19, nº 6, p. 568-574, 2002.

MOAKE, M.M., PADILLA-ZAKOUR, O.I., WOROBO, R.W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 4 (1) pp. 8-21, 2005.

MOLDOVEANU S, DAVID V. Sample Preparation in Chromatography (**Journal of Chromatography Library**). 1st Edition ed: Elsevier Science; 2002.

NAETS, M., M. VAN DAEL, E. VANSTREELS, D. DAELEMANS, P. VERBOVEN, B. NICOLAÏ, W. KEULEMANS, A. Geeraerd To disinfect or not to disinfect in postharvest research on the fungal decay of Apple. **Int J Food Microbiol.**, 266, pp. 190 – 199, 2018.

NOGUEIRA, A.; SERGIO HENRIQUE TEIXEIRA; IVO MOTTIN DEMIATE; GILVAN WOSIACKI. Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 259–264, 2007.

OPAS. Pan American Health Organization / World Health Organization, 2019. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5960:seguranca-dos-alimentos-e-responsabilidade-de-todos&Itemid=875. Acesso em: 1 ago. 2019.

PAL, S., N. SINGH, KM ANSARI, Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: An overview, **Toxicology Research**, 6, pp.764-771, 2017.

PASA, S. P; CASTRO, M.C & SILVA, C.P. Recursos genéticos da macieira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.18, p. 44–53, 2012.

PEREIRA, A. S. G. **Avaliação da bioacessibilidade de compostos antioxidantes em variedades de maçã produzidas em Portugal**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Nova Lisboa, Nova Lisboa, 2014.

PINOTTI, M. OTTOBONI, C. GIROMINI, V. DELL'ORTO F. CHELI. Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on cereal byproducts, **Toxins**, 8, p. 45, 2016.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B. & ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p.51–64, 2011.

RAJ, H., SHARMA, J.N., GUPTA, D. Epidemiology of Mouldy Core and Core Rot of Apple in Himachal Pradesh, **Indian Phytopath.** 70, pp. 63 – 68, 2017.

ROMANO, K. R.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R. How do brazilian consumers perceive a non-traditional and innovative fruit juice? An approach looking at the packaging. **Food Research International**, v. 74, p. 123–130, 2015.

ROSA, S. E. S.; COSENZA, J. P., LEÃO, L. T. S. Panorama do setor de bebidas no Brasil BNDES, **Setorial**, n. 23, p. 101-150, 2006. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2607/1/BS%2023%20Panorama%20do%20Setor%20de%20Bebidas%20no%20Brasil_P.pdf >. Acesso em: 14 de junho de 2019.

SAEGER, 2011 Saeger, S. (2011). **Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed**. 1º ed. Cambridge, UK, p. 415.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

SHEN Y., NIE J., LI Z., LI H., WU Y., DONG Y., ZHANG J. Differentiated surface fungal communities at point of harvest on apple fruits from rural and peri-urban orchards, **Scientific Reports**, 8, pp. 1 – 12, 2018.

SHEPHARD G. **Mycotoxins in the contexts of food risks and nutrition issues. The mycotoxin factbook**, 21-32. Barug D, Bhatnagar D, van Egmond HP, Van der Kamp JW, Van Ossenbruggen WA, Visconti A, editors. Wageningen: Wageningen Academic; 2006

SONG J, YANG Q, YANG J, LARSSON L, HAO X, ZHU X, Essential Genetic Interactors of SIR2 Required for Spatial Sequestration and Asymmetrical Inheritance of Protein Aggregates. **PLoS Genet** 10(7): e1004539, 2014.

SUPELCO, 1998 SUPELCO, 1998).SUPELCO. Bulletin 910, Guide to Solid Phase Extraction, **Sigma-Aldrich Co**,1998.

TODA FRUTA, 2008 **Característica da Maçã**. Disponível em: www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=4192.. Acesso em: 11 de abril 2019.

TOURNAS, V. H. & MEMON, S. U. **Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi.***International Journal of Food Microbiology*, v. 133, n. 1–2, p. 206–209, 2009.

VALCÁRCEL, M., Tena, M. Applications of supercritical fluid extraction in food analysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 358, p. 561–573, 1997.

VENTURINI, W. G. F. Suco de maçã. In: **Bebidas não alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. [s.l] Edgardo Blucher. v. 2p. 269 – 301, 2010.

World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO. Forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **Geneva: Technical Report Series 859**: p. 36 – 38, 1995. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37246>

WU, T.S.; YU, F.Y.; SU.; C.C.; KAN, J.C.; CHUNG, C.P.; Activation of ERK mitogen-activated protein kinase in human cells by the mycotoxin patulin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, n.2, 103-111, 2005.