



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Micotoxina Patulina: Incidencia, Toxicidad, Análisis
y Legislación.

Autor

Rodrigo Tapia Vera

Director

Agustín Ariño Moneva

Facultad de Veterinaria

2019-2020

INDICE

Resumen	3
Abstract	5
1. Introducción	7
2. Objetivo	9
3. Metodología	9
4. Resultados.....	10
4.1 Biosíntesis de patulina.....	10
4.2 Hongos productores de patulina	11
4.2.1 <i>Penicillium expansum</i>	13
4.3 Incidencia	15
4.3.1 Patulina en los alimentos.....	15
4.4 Toxicidad.....	21
4.5 Análisis de patulina	23
4.6 Legislación	24
5. Conclusión	26
6.Bibliografía	29

Resumen

Los hongos son organismos eucariotas, que no cuentan con presencia de un sistema vascular y clorofila. En el medio ambiente cumplen la función de reutilizar nutrientes que se originan de la descomposición de materia en el suelo, vegetación y agua. Toman el nombre de organismos saprofitos debido a que pueden parasitar a plantas y animales. Las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico de gran toxicidad, que son producidos en diferentes sustratos y bajo condiciones climatológicas específicas. Algunas especies de mohos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Byssochlamys* producen un metabolito secundario llamado patulina (4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2[6H]-one), que es una micotoxina de gran interés en seguridad alimentaria. Este metabolito es muy estable por lo cual resiste temperaturas de 125 ° C y pH de 3,5 a 5,5, por lo que dificulta su eliminación por medio de la pasterización. Aunque, recientes estudios revelaron que la PAT disminuye durante la fermentación de algunos productos. La patulina puede encontrarse en alimentos como frutas, verduras, cereales y frutos secos, pero la incidencia es especialmente importante en manzana y productos derivados (zumo, compota, puré, alimentos infantiles). El hongo *Penicillium expansum* es el principal productor de patulina en manzanas y derivados alimenticios, por este motivo se le adjudica ser el responsable de grandes pérdidas en la industria alimentaria. Según el Codex Alimentarius la contaminación por *Penicillium expansum* ocurre después de la cosecha y almacenamiento, mostrando varias formas de podredumbres (moho azul) en la parte superficial del alimento. Es un hongo psicrófilo, pero su temperatura optima de crecimiento es de 25 ° C, aunque puede crecer a -3 ° C.

Se detectó que, bebidas a base de manzanas de Brasil y jugos de manzana de Japón y de Argentina tuvieron una contaminación por patulina entre 7, 15 y 19,6 µg / L, pero hubo niveles notables de patulina de hasta 845 µg / L en jugos de manzana de India, y 376 µg / L en jugos de manzana de Turquía. La ingesta de esta micotoxina puede causar daños a la salud, como problemas gastrointestinales y hemorragias, así como afecciones en otros órganos. Estudios en roedores han mostrado efectos citotóxicos, neurotóxicos, inmunotóxicos, genotóxicos y teratogénicos, aunque la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) indica que la patulina es no clasificable como cancerígeno para humanos (Grupo 3). Varias organizaciones como la FAO, Unión Europea y la FDA han establecido una ingesta diaria máxima tolerable de 0,4 µg/kg por peso corporal por día y desde una perspectiva de seguridad alimentaria, se permite una

concentración máxima de 50 µg / kg de patulina para jugos de frutas y néctar de frutas, jugos de frutas reconstituidos, bebidas espirituosas, sidra y otras bebidas fermentadas derivadas de manzanas o que contienen jugo de manzana, 25 µg / kg para productos sólidos de manzana, mientras que el nivel máximo permitido para productos de manzana destinados a lactantes y niños pequeños es de 10 µg / kg. Para prevenir la presencia de Patulina, el Codex Alimentarius ha realizado el “Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por patulina en el jugo de manzana y los ingredientes del jugo de manzana en otras bebidas (CAC / RCP 50-2003)” y la Comisión Europea la “Recomendación del 11 de agosto de 2003 sobre la prevención y reducción de la contaminación por patulina en el jugo de manzana y los ingredientes del jugo de manzana en otras bebidas (2003/598/CE)”. Las técnicas analíticas más utilizadas se basan en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector ultravioleta.

Abstract

Fungi are eukaryotic organisms, which do not have the presence of a vascular system and chlorophyll. In the environment they fulfill the function of reusing nutrients that originate from the decomposition of matter in the soil, vegetation and in the water. They take the name of saprophytic organisms because they can parasitize plants and animals. Mycotoxins are highly toxic secondary metabolites of fungal origin, which are produced on different substrates and under specific climatic conditions. Some mold species of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Byssochlamys* produce a secondary metabolite called patulin (4-hydroxy-4H-furo [3,2-c] pyran-2 [6H] -one), which is a mycotoxin of great interest in food safety. This metabolite is very stable and therefore it resists temperatures of 125 ° C and pH of 3,5 to 5,5, making it difficult to eliminate through pasteurization. Although, recent studies revealed that PAT decreases during the fermentation of some products. Patulin can be found in foods such as fruits, vegetables, cereals and nuts, but the incidence is especially important in apples and derived products (juice, compote, puree, baby food). The *Penicillium expansum* fungus is the main producer of patulin in apples and food derivatives, for this reason it is attributed the responsibility for large losses in the food industry. According to the Codex Alimentarius, contamination by *Penicillium expansum* occurs after harvest and storage, showing various forms of rot (blue mold) on the surface of the food. It is a psychrophilic fungus, but its optimal growth temperature is 25 ° C, although it can grow at -3 ° C.

It was detected that, Brazilian apple-based drinks, Japanese apple juices and Argentine apple juices had a contamination between 7, 15 and 19.6 µg / L, but there were notable levels of patulin up to 845 µg / L in juices of Indian apples, and 376 µg / L in Turkish apple juices. Intake of this mycotoxin can cause health damage, such as gastrointestinal problems and bleeding, as well as alterations in other organs. Rodent studies have shown cytotoxic, neurotoxic, immunotoxic, genotoxic and teratogenic effects, although the International Agency for Research on Cancer (IARC) indicates that patulin is not classifiable as carcinogenic to humans (Group 3). Various organizations such as FAO, European Union and FDA have established a maximum tolerable daily intake of 0.4 µg / kg per body weight per day and from a food safety perspective, a maximum concentration of 50 µg / kg patulin is allowed for fruit juices and fruit nectar, reconstituted fruit juices, spirits, cider and other fermented beverages derived from apples or containing apple juice,

25 µg / kg for solid apple products, while the maximum level allowed for products of apple intended for infants and young children is 10 µg / kg. To prevent the presence of Patulin, the Codex Alimentarius has produced the “Code of Practice for the Prevention and Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and the Ingredients of Apple Juice in Other Beverages (CAC/RCP 50-2003)” and the European Commission the “Recommendation of 11 August 2003 on the prevention and reduction of contamination by patulin in apple juice and the ingredients of apple juice in other beverages (2003/598/EC)”. The analytical techniques most used are based on high-performance liquid chromatography (HPLC) with an ultraviolet detector.

1. Introducción

Las micotoxinas son variedades de compuestos de gran toxicidad que se originan como resultado de un metabolismo secundario de origen fúngico y que son producidos en diferentes sustratos bajo condiciones climatológicas específicas (Martínez, 2012). Los hongos son organismos eucariotas, sin presencia de clorofila y sistema vascular. Estos cumplen una función especial de reutilizar los nutrientes que proceden de la descomposición de las materias en el suelo, vegetación y en el agua, también pueden parasitar a plantas y animales, por lo cual toman el nombre de organismos saprofitos (Martínez, 2012).

Gran parte de las micotoxinas han sido identificadas como metabolitos secundarios de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Stachybotrys*, *Neotyphodium*, *Myrothecium*, *Phoma* y *Diplodia* (Martínez, 2012).

La patulina (4-hidroxi-4H-furo [3,2-c] piran2 (6H) -ona), PAT en su forma abreviada, es una micotoxina producida al menos por 60 especies de hongos, como *Penicillium expansum* en manzanas y *P. gladioli* y *P. sclerotigenum* en rizomas y bulbos. También puede ser producida por *P. carneum*, *P. claverigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomycola*, *P. formosanum*, *P. glandicola*, *P. marinum*, *P. paneum* y *P. vulpinum*. Otros productores pueden ser: *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *Byssochlamys nivea* y *B. fulva* (Soriano, 2015).

La patulina forma cristales incoloros con un punto de fusión de 111°C y sublimación en alto vacío a temperaturas de 70-100°C. Esta micotoxina es insoluble en benceno y éter de petróleo, pero es soluble en cloroformo, éter, acetato de etilo, acetona, etanol y agua. Es estable en medio ácido, pero en medio alcalino se hidroliza y pierde su actividad biológica (Soriano, 2015). PAT tiene propiedades fisicoquímicas que agregan más dificultades en su determinación: PAT es una molécula altamente polar de bajo peso molecular Su estructura química la podemos observar en la Figura 1.

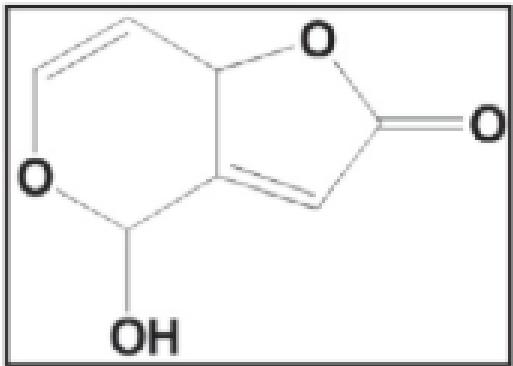


Figura 1. Estructura química de la Patulina (Soriano, 2015).

La estructura química de la patulina fue aclarada por Woodward y Singh (1950). Biosintéticamente, la patulina es una γ -lactona α, β -insaturada incluida en un grupo de compuestos comúnmente conocidos como lactonas tóxicas. Su nombre químico es 4-hidroxi-4H-furol [3,2-c] piran-2 (6H) -ona. La patulina, como ya es de conocimiento general, se la puede identificar como un metabolito secundario de bajo peso molecular, soluble en agua y solventes orgánicos polares como metanol, etanol, acetona y acetato de etilo.

Este metabolito resiste altas temperaturas y es estable en un grado de pH de 3,5 a 5,5 en el momento que se lo expone a temperaturas de 125 ° C, lo que dificulta su destrucción por pasteurización. La patulina disminuye durante la fermentación. La actividad biológica de la patulina se reduce en el pH básico y en presencia de moléculas unidas al grupo azufre como la cisteína y el glutatión. Debido a su notable estabilidad, la patulina sintetizada a menudo permanece en productos a base de manzanas y otras frutas después del procesamiento (Liu, 2018).

Las diferentes evidencias de toxicidad de la ingesta de la patulina se demuestran principalmente en experimentos con distintos animales después de la administración por vía oral, subcutánea o cutánea. Los tejidos de los principales órganos de los animales después de haber sido consumida la patulina han revelado cambios patológicos en los órganos diana (Bevardi et al., 2018).

Se ha observado la presencia de patulina en mosto de uva, y los vinos minoristas de la zona vinícola de Mosel-Saar-Ruwer (Alemania) presentaron valores medios de 15,6 $\mu\text{g} / \text{L}$ de patulina en el 54% de las muestras positivas. Los higos secos pueden ser una fuente de exposición, porque se han detectado niveles altos (39,3–151,6 $\mu\text{g} / \text{kg}$) en los higos de Turquía (Liu, 2018).

La Comisión Europea, FAO y FDA han establecido un máximo de concentración de 50 µg / kg de patulina en bebidas derivadas de manzanas o que contienen jugo de manzana, 25 µg / kg para productos de manzana sólidos y un nivel máximo de 10 µg / kg permitido para productos de manzana destinados a lactantes y niños pequeños.

2. Objetivo

- Revisar artículos científicos disponibles en la Web of Science (WOS), en el portal web de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y en otras fuentes nacionales e internacionales de carácter académico y científico.
- Seleccionar la información y realizar una revisión bibliográfica actualizada sobre la micotoxina patulina, abarcando su incidencia, toxicidad, análisis y legislación.

3. Metodología

- Buscar artículos científicos en WOS con las palabras clave 'Patulin' en el título y 'Mycotoxin' en el tema, combinadas con 'occurrence', 'toxicity', 'analysis' y 'regulation'. Seleccionar como rango de tiempo los últimos 5-10 años para obtener el listado de artículos disponibles, de los que se escogerán los más citados y que contengan información más relevante para realizar el trabajo bibliográfico.
- De manera similar, se buscará información científica sobre la micotoxina patulina en portales web y fuentes especializadas. En particular se han utilizado las siguientes: Tesis de maestrías y doctorados, Libros sobre Micotoxinas y Páginas web de organismos nacionales e internacionales que regulan sobre la presencia de Patulina en los alimentos.

4. Resultados

4.1 Biosíntesis de la patulina

La patulina es un derivado del poliacetato. La síntesis se realiza con acetil-coenzima A (CoA) y tres unidades de malonil-CoA formando 6-metil-acido salicílico (6-MSA), catalizada por la 6-metil-acido salicílica sintetasa. Este es el primer paso para la formación de la patulina. El siguiente proceso es convertir el 6-MSA a m-cresol por la 6-MSA descarboxilasa. El m-cresol se transforma en m-hidroxibencil alcohol por la m-cresol 2-hidroxilasa (Soriano, 2015).

El siguiente proceso se puede realizar por dos mecanismos, pero el resultado será el mismo de convertir el m-hidroxibencil alcohol en gentisaldehído, las sustancias intermedias entre estos dos compuestos pueden ser gentisil-alcohol o m-hidroxibenzaldehído. Se ha demostrado que ambos compuestos son posibles, siendo más frecuente el m-hidroxibenzaldehído. Para formar este último compuesto la m-hidroxibencil alcohol deshidrogenasa transforma el m-hidroxibencil alcohol en m-hidroxibenzaldehído. Esta última enzima y la m-cresol 2-hidroxilasa son dependientes del oxígeno y NADPH (Soriano, 2015). Cuando el gentisaldehído se ha formado, es transformado a isoepoxydon y luego pasa a ser 5,6-epoxigetilsilquinona, este proceso es catalizado por la isoepoxydon deshidrogenasa que depende del NADPH. Del 5,6-epoxigetilsilquinona pasa a formar la neopatulina. De la neopatulina se transforma a E-ascladiol mediante la reducción del NADPH. Y finalmente la E-ascladiol se transforma en patulina debido a su oxidación (Li et al., 2019). Este proceso de biosíntesis de la patulina se puede observar mejor en la Figura 2.

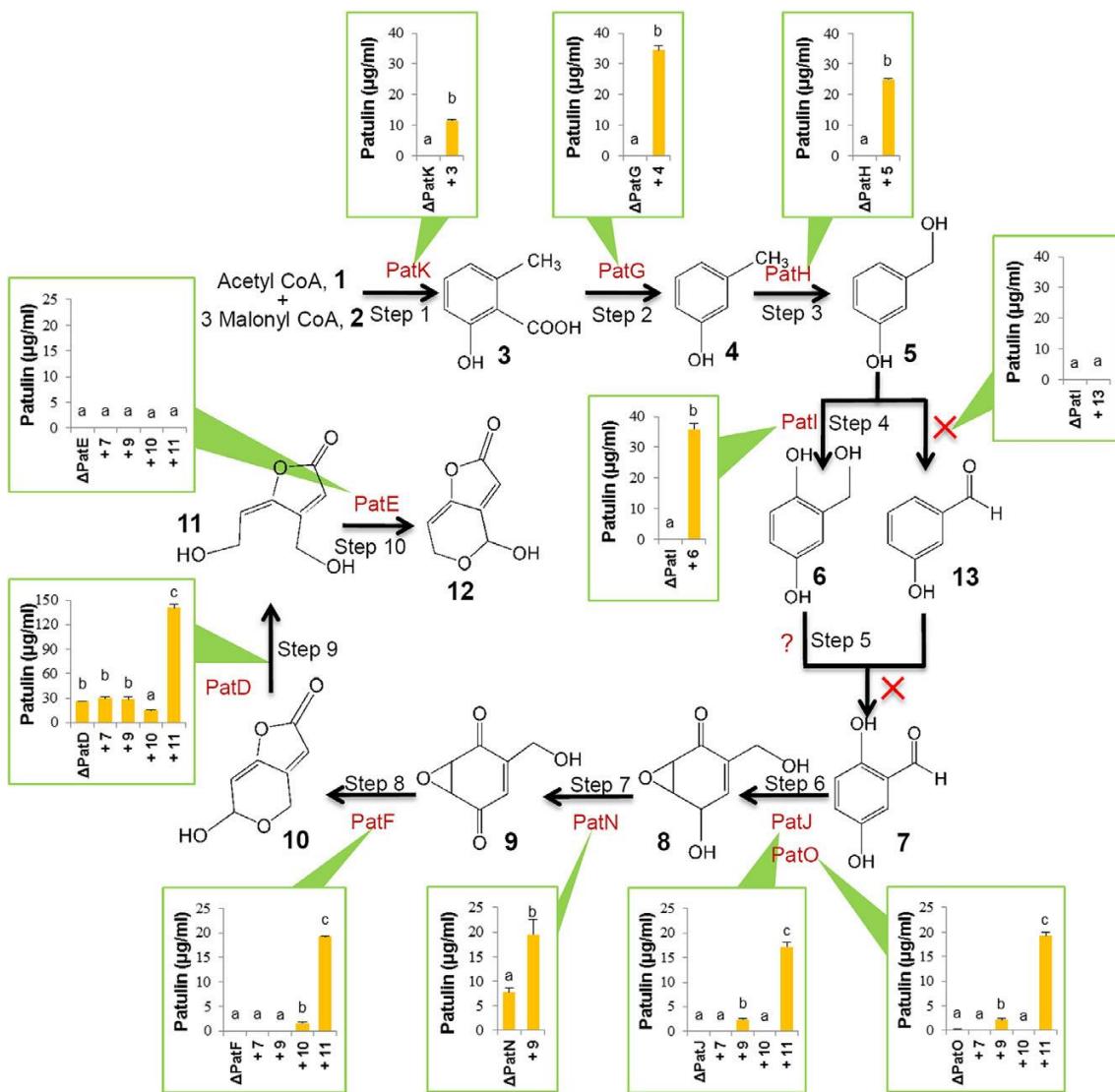


Figura 2. Biosíntesis de la patulina (Li et al., 2019).

4.2 Hongos productores de patulina

La patulina es producida por algunas especies fúngicas de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Byssochlamys*. La familia *Penicillium* se clasifica en varias secciones: *Fasciculata*, *Penicillium*, *Chrysogena*, *Osmophilic*, *Roquefortorum*, *Robsamsonia*, *Paradoxa*, *Turbata*, *Brevicompacta*, *Ramosa*, *Eladia* y *Canescens*. La patulina se produce comúnmente en *Penicillium*, *Osmophilic*, *Roquefortorum* y *Robsamsonia*, pero muy rara vez en *Fasciculata* (solo lo produce 1 de 29 especies; *P. gladioli*) y ausente en *Chrysogena*. La familia *Penicillium*, *P. expansum*, *P. marinum*, *P. sclerotigenum* y *P. clavigerum* pueden producir patulina. También, el *P. samsonianum* (sección *Osmophilic*) produjo patulina, pero la especie hermana *P. osmophilum* no produce patulina. El *P. carneum* y el *P. paneum* que forman parte de la familia

Roquefortorum también producen patulina. En la familia *Robsamsonia* varía respecto a la producción de patulina y 7 de las 11 especies lo producen: *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. compactum*, *P. glandicola* y *P. vulpinum*. Además, *P. formosanum* que no se encuentra en ninguna de las secciones de la clasificación, también produce patulina (Liu, 2018).

Los productores de patulina en el género *Aspergillus* forman parte a la sección *Clavati*: *A. clavatus*, *A. giganteus* y *A. longivesica*. Otros posibles productores de patulina son *A. terreus*, *A. candidus*, *A. amstelodami*, *A. echinulatus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. repens*, *A. variecolor* y *A. versicolor*. Mientras que en el caso de *Paecylomyces* y *Byssochlamys*, se demostró que solo el *B. nivea* y algunas cepas de *P. saturatus* producen patulina. La cepa de *P. variotii* también pueden producir patulina. En la tabla 1 se observa los mohos productores de patulina (Liu, 2018).

Genero	Sección	Especie de moho
<i>Penicillium</i>	<i>Fasciculata</i>	<i>P. gladioli</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i>
		<i>P. marinum</i>
		<i>P. sclerotigenum</i>
		<i>P. clavigerum</i>
	<i>Osmophila</i>	<i>P. samsonianum</i>
	<i>Roquefortorum</i>	<i>P. carneum</i>
		<i>P. paneum</i>
	<i>Robsamsonia</i>	<i>P. concentricum</i>
		<i>P. coprobium</i>
		<i>P. compactum</i>
		<i>P. griseofulvum</i>
		<i>P. dipodomycicola</i>
		<i>P. glandicola</i>
		<i>P. vulpinum</i>
	<i>Sin definir</i>	<i>P. formosanum</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>
		<i>A. giganteus</i>
		<i>A. longivesica</i>

<i>Paecilomyces</i>		<i>P. saturatus</i>
<i>Byssochlamys</i>		<i>B. nivea</i>

Tabla 1. Género y especies de mohos que producen patulina (Liu, 2018)

4.2.1 *Penicillium expansum*

El principal causante de deterioro de alimentos y de la producción de la micotoxina patulina es el hongo *P. expansum*, principalmente en manzanas (Demirel, 2016). Fue descrito por Link (1809) y posteriormente, Thom (1910) consideró a *Penicillium expansum* como especie (Tabla 2), basándose en características morfológicas.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Orden	Eurotiales
Clase	Eurotiomycetes
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Penicillium</i>
Subgénero	<i>Penicillium</i>
Serie	<i>expansa</i>
Especie	<i>P. expansum</i>

Tabla 2. Taxonomía de *Penicillium expansum* (Demirel, 2016)

Penicillium expansum es causante de la enfermedad del moho azul (Schinca, 2017), llamada de esta manera por sus conidios y su particularidad, la cual empieza como una lesión suave, acuosa y de color marrón, y a medida que la lesión envejece, los conidios se vuelven de color azul verde, sin olvidar que la fruta contaminada con el mismo produce un particular olor a tierra (Patriarca, 2019).

Se identificó que para retrasar el desarrollo de la descomposición por *Penicillium expansum* el almacenamiento a bajas temperaturas es vital, cabe recalcar que esto no sirve para prevenir, mucho menos para las lesiones mecánicas (Schinca, 2017).

4.2.2 Condiciones de crecimiento del *Penicillium expansum*

El hongo más importante en la producción de la patulina es *Penicillium expansum*. Es un hongo fitopatógeno que produce infección preferentemente a las frutas pomáceas, lo que

produce podredumbre del moho azul, la cual es una importante enfermedad que se produce después de las cosechas de las manzanas. Además, este moho suele ser la causa de enfermedades y descomposición después de la cosecha en otras frutas, como peras, melocotones, kiwis, albaricoques y fresas. Es un moho psicrófilo, con una temperatura de crecimiento óptima cercana a los 25 ° C, aunque puede crecer a -3 ° C. Este moho se difunde mientras el fruto se va desarrollando a toda la cosecha por diferentes vectores, por equipos y personal. Sin embargo, durante el momento después de la cosecha si no mantienen buenas condiciones de almacenamiento, esto puede producir y facilitar el crecimiento del *P. expansum*, el cual al crecer en la fruta podrá producir patulina, este moho causa fuertes estragos en la superficie de las frutas afectadas (Schinca, 2017).

Se demostró que la patulina en la mayoría de los cultivos de manzana era un factor de agresividad, lo cual facilitaba el desarrollo del hongo en la fruta; sin embargo, no necesariamente infectaba manzanas, las cepas de *P. expansum* demuestran cierto tipo de cambios en la producción y el desarrollo de la patulina. Estas alteraciones se atribuyen a distintos factores tanto genéticos, ambientales (temperatura, tiempo, pH, condiciones de la atmósfera, cultivares de frutas, etc.) y sin olvidarnos de las condiciones del cultivo. El *P. expansum* tiene un requerimiento bajo de oxígeno y pueden crecer en atmosferas del 1% de oxígeno (Liu, 2018).

4.2.3 Condiciones del *Penicillium expansum* para la producción de Patulina

La influencia que tienen los niveles de temperatura y oxígeno sobre el desarrollo y la producción de la patulina se ha analizado en un estudio in vitro, con varias cepas de *P. expansum* las cuales demostraron que las condiciones favorables de desarrollo eran diferentes a las condiciones adecuadas a la producción de patulina. La temperatura era un factor importante durante el crecimiento; en la mayoría de los casos observamos un crecimiento óptimo a 25 ° C (Liu, 2018).

Por otro lado, aunque la patulina se puede producir a temperaturas entre 1 ° C y 25 ° C, el efecto que ésta causa sobre el desarrollo no es tan clara y parece depender mucho de la cepa. Se observó una disminución en las concentraciones de patulina a temperaturas más bajas y otras condiciones de estrés (bajas concentraciones de oxígeno) (Liu, 2018).

Algunas cepas de *P. expansum* aumentaron la producción de patulina con una disminución del nivel del oxígeno, pero con atmosferas del 3% de CO₂ y 2% de oxígeno se inhibió la producción de patulina. Por lo cual se indica que las condiciones de estrés durante el crecimiento (bajas temperaturas y niveles de oxígeno) causan un retraso del metabolismo fúngico, pero no inhiben completamente la biosíntesis de la toxina. Se observó también que, el tipo de frutas y cultivar influyen en el crecimiento de hongos y producción de patulina, por ejemplo, se vio que en la etapa de almacenamiento a temperaturas de refrigeración las manzanas eran más sensibles a ataques de mohos y producción de patulina que las peras. Igualmente se vio una diferencia entre diferentes tipos de manzanas. Esta diferencia en el crecimiento de moho y producción de patulina se podría ver influenciada por los diferentes niveles de presencia de azúcares o compuestos fenólicos, contenido de ácido orgánico, pH y la capacidad oxidante de la fruta, que se relacionan con el grado de madurez de la fruta; estos factores afectan más que la variedad. Se observó que las frutas más suaves y ácidas son propensas a que desarrolle en ellas *P. expansum* y mayor producción de patulina (Liu, 2018).

4.3 Incidencia

4.3.1 Patulina en los alimentos

Desde una perspectiva de seguridad alimentaria, se permite una concentración máxima de 50 µg / kg de patulina para jugos de frutas y néctar de frutas, jugos de frutas reconstituidos, bebidas espirituosas, sidra y otras bebidas fermentadas derivadas de manzanas o que contienen jugo de manzana, 25 µg / kg para productos sólidos de manzana, mientras que el nivel máximo permitido para productos de manzana destinados a lactantes y niños pequeños es de 10 µg / kg. La mayoría de las encuestas revelaron que la concentración de patulina en jugos y bebidas derivados de la manzana estaba por encima de los niveles legales máximos (Liu, 2018).

La patulina en varios estudios se ha relacionado con la ingesta de jugo de manzana contaminado o alimentos derivados de la manzana como hemos podido identificar esto se da en el periodo de la postcosecha específicamente en su almacenamiento. Por este motivo la industria en especial las exportadoras a mercados que exigen altos estándares de calidad, ha conseguido desarrollar estrategias para prevenir, controlar o mitigar la presencia de toxinas como la patulina en los productos de frutas y sus derivados. Pero a

pesar de todos los medios de prevención se encontraron varios niveles de patulina en manzanas y sus derivados igualmente en otras frutas (Patriarca, 2019).

En términos de incidencia de contaminación por patulina, el porcentaje más bajo de muestras positivas (3%) se detectó en una encuesta con bebidas a base de manzana brasileña, seguido por el 5% de muestras positivas en jugos de manzana japoneses. Por el contrario, se informaron mayores incidencias de contaminación por patulina en los zumos de manzana turcos (100%) y en los productos de manzana comercializados en el noreste de China (87,4%) (Schinca, 2017). Los niveles máximos de contaminación por bebidas a base de manzana brasileña, jugos de manzana japoneses y jugos de manzana argentinos fueron 7, 15 y 19,6 µg / L. Se detectaron concentraciones más altas en muestras de bebidas a base de manzana y sidra procesadas y comercializadas en Michigan durante 2002–2006, con niveles de contaminación de 2700,4 µg / L de patulina. Este estudio destacó el efecto del daño de procesamiento en la contaminación por patulina relacionada principalmente con la calidad de las manzanas. Otros niveles notables de patulina detectados fueron 845 µg / L en jugos de manzana indios, y 376 µg / L en jugos de manzana turcos (Schinca, 2017). En otro estudio realizado en Portugal se obtuvo que la incidencia de patulina en pures de manzana para bebés de 76 muestras tomadas 5 fueron positivas, pero no excedían el límite máximo (10 µg/kg) tenían una presencia de 5,7 µg/kg. En bebidas a base de manzana, de 109 muestras 7 fueron positivas con una presencia máxima de 42 µg/kg, por lo cual no excedieron los valores establecidos de presencia máxima permitida (Barreira et al., 2010).

En un estudio realizado en Argentina a frutas que se comercializan se observó que la patulina también puede tener incidencia en otras frutas, por ejemplo, la pera donde de un total de 1138 muestras, 122 fueron positivas con un nivel máximo de 1749 µg/kg, otras frutas también pueden tener presencia de esta micotoxina, pero en menor proporción que la manzana. En la uva de un total de 50 muestras 5 fueron positivas es decir solo el 10% con un nivel máximo de presencia de 13808 µg/L. En el melocotón de 93 muestras solo el 9,7% dieron positivo con una presencia máxima de 24 µg/kg. Pero en frutas como la naranja y la piña no se encontró presencia de patulina (Oteiza et al., 2017).

Se buscó presencia de patulina en vinos de diferentes variedades de uvas. Se tomaron 23 muestras de las cuales se obtuvo que la concentración de PAT fue inferior al límite de cuantificación (<10 ng/g) y esto se debe al proceso de fermentación que sufren las uvas, presencia de microorganismos que degradan la patulina y aditivos que realizan la misma

función de degradación (Ostry et al., 2018). También se ha identificado que los productos molidos a base de granos, como trigo, arroz, maíz, espelta, avena, soja y tapioca, no contaban con la presencia de contaminación por patulina (Rodríguez-Carrasco et al., 2014)

En la tabla 3 se trata sobre la incidencia de la patulina en alimentos durante los últimos años.

Productos	Positivo (n)	Promedio +/- SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o $\mu\text{g}/\text{L}$)	Máximo ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o $\mu\text{g}/\text{L}$)	País	Referencia
Jugo de manzana para infantes	21 (44)	3,6 +/- 1,9	8,3	Serbia (Europa)	(Torović et al., 2017)
Puré de manzana para infantes	11 (17)	3,4 +/- 2	7,7	Serbia (Europa)	(Torović et al., 2017)
Jugo de manzana para niños	43 (43)	5,6 +/- 6,8	30	Serbia (Europa)	(Torović et al., 2017)
Manzana fruta fresca	1 (3)	----	415,2	República Checa (Europa)	(Vaclavikova et al., 2015)
Sidra de manzana	2 (2)	30,3	48,3	República Checa (Europa)	(Vaclavikova et al., 2015)
Jugo de manzana	5 (6)	16,7	28,4	República Checa (Europa)	(Vaclavikova et al., 2015)
Pulpa de manzana	25(32)	24,1	102,1	República Checa (Europa)	(Vaclavikova et al., 2015)

Comida de bebe de manzana	2 (10)	3,6	5	Republica Checa (Europa)	(Vaclavikova et al., 2015)
Jugo de pera	2 (3)	25,3	38,9	Republica Checa (Europa)	(Vaclavikova et al., 2015)
Jugo de manzana	14 (22)	9,1 +/- 9,4	36,5	España (Europa)	(Piqué et al., 2013)
Pure de manzana	6 (22)	6,9 +/- 13,6	50,2	España (Europa)	(Piqué et al., 2013)
Fruta de manzana	40 (1866)	26 +/- 330	19622	Argentina	(Oteiza et al., 2017)
Fruta de pera	11 (122)	54 +/- 53	1749	Argentina	(Oteiza et al., 2017)

Tabla 3. Incidencia de la patulina en productos alimenticios

4.3.2 Prevención de la Patulina

Para poder tener efectos positivos para disminuir la prevalencia de patulina en los productos a base de manzana y jugos de manzana las grandes industrias han buscado medidas para prevenir contaminación en la postcosecha. Estas medidas se han podido analizar en el "Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por patulina en el jugo de manzana y los ingredientes del jugo de manzana en otras bebidas (CAC / RCP 50-2003)" del Codex Alimentarius y la "Recomendación de la Comisión del 11 de agosto de 2003 sobre la prevención y reducción de la contaminación por patulina en el jugo de manzana y los ingredientes del jugo de manzana en otras bebidas (2003/598/CE)" de la Comisión Europea. En los documentos antes mencionados, las normativas y procedimientos se detallan en prácticas recomendadas basadas en Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) (Liu, 2018).

El límite máximo de patulina debe garantizarse durante la vida útil del producto. Más allá del código de práctica para prevenir y reducir la contaminación por patulina, se han realizado diversos trabajos para tratar el control de la PAT en los alimentos a base de manzana. Las medidas para prevenir la exposición a esta micotoxina se pueden dividir en

aquellas dirigidas a controlar el desarrollo de moho y la síntesis de patulina, y aquellas dirigidas a eliminar, reducir o desintoxicar alimentos a base de manzana contaminados con patulina (Liu, 2018).

Según autoridades de control, antes de que se realice la cosecha, en lo que se debe tener mayor énfasis es en eliminar y destruir tejidos enfermos; de esta manera favoreceremos la ventilación y la entrada de la luz en los árboles, haciendo pequeños mantenimientos en el crecimiento de las ramas; control de plagas y enfermedades; y evitando la germinación de esporas y el desarrollo de hongos, principalmente durante la caída y cosecha de pétalos. El enriquecimiento de la composición mineral de la fruta mediante la fertilización, para reducir la susceptibilidad a la pudrición se debe aumentar la producción de calcio a potasio (Salas et al., 2012).

En lo que se refiere al uso de fungicidas después de la cosecha deben aplicarse y tratarse de acuerdo con las condiciones autorizadas para su uso. Aunque los fungicidas sistémicos suelen ser el producto ideal según las empacadoras, el mal uso en dosis no adecuadas de estos fungicidas, como el tiabendazol (clase química de los bencimidazoles), ha dado a lugar a que aparezcan cepas resistentes. La mejor manera según estudios es la aplicación del fungicida sistémico imazalil para que se puedan controlar las cepas resistentes a los bencimidazoles, que ataca directamente a las funciones de la membrana celular. No obstante, los tratamientos que se deben hacer de manera regular consisten en una mezcla de diferentes sustancias activas, como tiabendazol e imazalil, entre otros (Liu, 2018).

No se debe almacenar por largo plazo las manzanas que se encuentren con una composición mineral por debajo de los estándares reconocidos. Durante este proceso inicial, se debe mantener y registrar datos históricos de los niveles de podredumbre en cada huerto individual, para poder observar si son buenos indicadores de los posibles niveles de podredumbre. De esta forma se puede reducir la incidencia, gracias a la aplicación de tratamientos (Funes et al., 2013).

Mientras dure la cosecha y el transporte, los procesos que regulan que haya el menor riesgo de contaminación, realizan un enfoque para poder adoptar medidas que sean adecuadas para no tener daños físicos en las manzanas y no encontrarnos con hematomas en la fruta. Todas las frutas con síntomas de daño (piel dañada, deteriorada, podrida, etc.) deben ser descartadas esto se da de igual manera para manzanas cosechadas mecánicamente como para manzanas frescas de mercado. Durante la cosecha de las

manzanas lo más recomendable hacerlo en condiciones de clima seco; De esta manera se evitará la contaminación de personas que recojan algo cualquier objeto del suelo o en su defecto que salga bajo la lluvia. Asegurar la limpieza de los contenedores, mediante la eliminación de hojas, ramitas y escombros, es una buena medida para reducir la contaminación. Los cuales deben ser debidamente secadas antes de ser utilizados (Funes et al., 2013).

Los períodos para transportar la fruta a plantas de procesamiento o instalaciones de almacenamiento deben minimizarse. Las manzanas cosechadas mecánicamente deben transportarse a las plantas procesadoras dentro de los 3 días posteriores a la cosecha, y las manzanas para la fruta fresca marcada deben almacenarse en frío dentro de las 18 horas posteriores a la cosecha y alcanzar las temperaturas recomendadas dentro de los 3 a 4 días posteriores a la cosecha (Liu, 2018).

Debemos realizar al menos una vez al mes el monitoreo de los niveles de descomposición y el estado general de las manzanas. Incluso, es necesario realizar acciones para descartar las manzanas que se encuentren en mal estado. Se estimulará el desarrollo del hongo y por ende la formación de patulina si se mantienen las manzanas a temperatura ambiente durante un periodo prolongado de tiempo. Otros estudios informaron que se puede obtener reducciones en la fase de retraso de 1 a 3 días a 20 ° C. Para que esto se desarrolle de manera ideal, las temperaturas deben mantenerse por debajo de 5 ° C en cualquier momento (Funes et al., 2013).

Tenemos mayor efectividad para el control del *P. expansum* al aumentar los niveles de CO₂ en vez de disminuirlos, especialmente en lo que se refiere a la conservación a largo plazo durante la postcosecha. Una vez se encuentren en un medio de atmósfera controlada podremos reducir la acumulación de patulina. Finalmente, para que esto sea efectivo, se maneja de mejor manera si las condiciones de la atmósfera controlada se hagan desde los 7 o 10 días posteriores el inicio de la carga de la manzana (Salas et al., 2012).

El manejo de las manzanas para el mercado de frutas frescas debe ser lo más suave posible. Además, el procesado de la fruta debe realizarse lo antes posible después de la cosecha, principalmente en productores sin instalaciones de almacenamiento controladas. La higiene durante las etapas posteriores a la cosecha minimiza el número de manzanas podridas. Por lo tanto, las instalaciones y equipos involucrados en el almacenamiento (por ejemplo, equipos de atmósferas controladas) deben verificarse, limpiarse y mantenerse

en buenas condiciones. Un estudio informó que el desarrollo de *P. expansum* en manzanas magulladas no se realizara de manera adecuada si no se encuentra un numero adecuado de esporas en el ambiente. Otros estudios más detallados demostraron que la tasa de desarrollo y la fase de retraso del *P. expansum* son determinados por el tamaño del inoculo. El desarrollo de los hongos se retrasará si mantenemos las condiciones de atmosfera inadecuada para el mismo o que lo mantengamos en bajas temperaturas. Combinar temperaturas bajas usando atmosferas controladas es bastante normal durante la vida útil de las manzanas. Los regímenes de oxígeno bajo (alrededor del 3% de O₂) y oxígeno ultra bajo ($\leq 1\%$ de O₂) y una mayor concentración de CO₂ (por encima del 2% de CO₂) conservan la calidad de las manzanas (Morales et al., 2006)

Lo ideal para controlar los niveles de pudrición de patulina tanto internos como externos es implementar procedimientos de muestreo. No obstante, la limpieza y desinfección de los equipos son formas efectivas de reducir la contaminación de conidios. Después de prensar, el jugo debe enfriarse a menos de 5 ° C y mantenerse refrigerado hasta las operaciones posteriores. Liu en su libro menciona que se deben tomar muestras representativas de jugo de manzana para el análisis de patulina (Liu, 2018).

4.4 Toxicidad

4.4.1 Toxicidad de la patulina

Las diferentes evidencias clínicas de la ingesta de la patulina se demuestran principalmente en experimentos con distintos animales después de la administración por vía oral, subcutánea o cutánea. Los tejidos de los principales órganos de los animales después de haber sido consumida la patulina han revelado que producen daños en el tracto gastrointestinal, genotóxicos, mutagénicos, cancerígenos, nefrotóxicos, teratogénicos, y efectos neurotóxicos, al mismo tiempo afecta a la actividad inmunosupresora y produce toxicidad reproductiva. Con respecto al riesgo cancerígeno, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer clasificó esta toxina en el grupo 3 (no clasificado como cancerígeno humano), por todo lo que se ha revelado en los estudios en humanos y animales (Bevardi et al., 2018).

La exposición humana a la patulina se debe en la mayoría de los casos a la ingestión de alimentos contaminados. Es claro que debamos entender que la patulina podría afectar a la mucosa intestinal en lo que se refiere a la estructura y composición. Los estudios en

diferentes modelos animales han demostrado que concentraciones agudas, puede producir diferentes síntomas en el tracto gastrointestinal (Pillay et al., 2015).

La bioquímica de la patulina y su toxicidad se ha estudiado ampliamente, y aunque el día de hoy tengamos cierta controversia, la mayoría de los investigadores y autores concuerdan con que el principal mecanismo responsable de su toxicidad se debe al contundente lazo por los grupos sulfídrico en las proteínas y los aminoácidos debido a su naturaleza electrofílica. Como consecuencia, la patulina puede inhibir las enzimas biosintéticas claves e inducir estrés oxidativo al unir fuertemente el péptido antioxidante glutatión que conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (Bevardi et al., 2018).

La aplicación por vía oral de patulina en diferentes estudios a una dosis mucho más alta que el rango permitido en el jugo de manzana en ratones suizos y ratas implicaba ulceración e inflamación del estómago y los intestinos, mientras que a dosis bajas no hay alteración del tubo digestivo. En otros órganos, como los riñones y el hígado, mostraron que la función renal no se alteró en ratones hembras después de la administración oral durante 28 días a concentraciones de 0,64 a 2,56 mg / kg. En un estudio informaron alteración de las funciones renales, aunque la dosis y la aplicación fueron diferentes. Más recientemente, otro estudio después de la administración subcutánea de 0,2 mg / kg / día durante semanas en ratas y después de la administración oral de 152,5 µg / kg diariamente durante 6 semanas con los ratones albinos informaron alteración de la función renal y cambios histopatológicos en los riñones, como hemorragia entre los túbulos de la región cortical y atrofia de algunos corpúsculos renales y glomérulos degenerados, por lo que no podríamos identificar con claridad los factores que se dieron en estos casos (Oteiza et al., 2017).

Sin embargo, varios autores han identificado que la función hepatocelular y la histología en el hígado tienen cambios o variaciones, entre ellas podemos observar la necrosis con infiltración celular inflamatoria y la vacuolización hepatocelular sin olvidarnos de una hemorragia leve. Aunque el cerebro también es sensible a la patulina, y la inyección directa de esta micotoxina en el cerebro de rata a dosis bajas (10 µg) mostró sedación conductual, hipoalgesia, rigidez de la cola y cambios posturales, mientras que a dosis altas (50 µg), cifosis, se demostró la pérdida del reflejo de corrección y la convulsión tónico-clónica. No obstante, en otros estudios se pudo observar un aumento drástico en la conducta y la locomoción después de la administración oral en ratones albinos. Para finalizar, los humanos a los que se les administro patulina por vía oral a un nivel de

exposición durante 60 y 90 días han dado como resultado diferentes cambios histológicos en el timo, como hemorragia, hiperplasia de células plasmáticas, dilatación y fibrosis en la corteza, adelgazamiento de la corteza, entre otros, que eventualmente tendría como conclusión una evidente alteración de la función del timo (Liu, 2018).

Con esto se llegó a la conclusión que la patulina induce la genotoxicidad en órganos vitales, los riñones, el hígado y el cerebro, de manera dependiente de la dosis (Maidana et al., 2016).

4.5 Análisis de patulina

4.5.1 Determinación de patulina en zumos claros y turbios y en pures de manzana, Método por HPLC con purificación por cromatografía de reparto líquido/ líquido.

Para analizar patulina en muestras de zumos claros, turbios y en purés de manzana se usa el método HPLC con purificación por cromatografía de reparto líquido/líquido. El principio de esta técnica se basa en que la pectinasa trata enzimáticamente a los zumos y pures de manzana. El acetato de etilo extrae la patulina que se produce en el zumo y pure de manzana tratado enzimáticamente, mediante extracción líquido - líquido el extracto del disolvente se purifica con carbonato sódico en disolución acuosa. El extracto de acetato de etilo se seca utilizando sulfato sódico anhidro. Cuando se evapora el acetato de etilo, la patulina se determina cuantitativamente por cromatografía líquida de altas características (HPLC) utilizando ultravioleta (UV) para su detección (Norma UNE-EN 15890 de la Asociación Española de Normalización y Certificación, 2004).

Este análisis está validado para determinar patulina en muestras contaminadas artificial y naturalmente de zumos de manzanas claros a niveles de 26 µg/l y 128 µg/l, pures de manzana a niveles entre 23 µg/kg y 121 µg/kg y zumos de manzana turbios a niveles entre 26 µg/l y 106 µg/l (Asociación Española de Normalización y Certificación, 2004).

4.5.2 Determinación de patulina en zumos de frutas y en pures de fruta para niños, Método por HPLC con purificación por cromatografía de reparto líquido/ líquido y extracción en fase sólida y detección por UV

Para precisar la cantidad de patulina en zumos de frutas y en purés de fruta para niños, se utiliza el método por HPLC con purificación por cromatografía de reparto líquido /

líquido y extracción en fase sólida y detección por UV. Este método se basa en una mezcla de acetato de etilo y hexano en presencia de sulfato sódico y de carbonato hidrogeno sódico para extraer la patulina del zumo de manzana y de la papilla a base de fruta. Con una alícuota del extracto, se purifica mediante extracción en fase sólida y se evapora. Luego ese residuo se disuelve nuevamente en agua a pH 4. La patulina se separará por el HPLC en fase inversa y se determina cuantitativamente mediante detección UV (Norma UNE-EN 14177 de la Asociación Española de Normalización y Certificación, 2011).

Este método está validado para determinar patulina en zumos de manzana usando muestras contaminadas artificial y naturalmente con rangos de contaminación de 3,0 µg/kg y 15,5 µg/kg y en papillas a base de frutas, rangos entre 3,4 µg/kg y 17,9 µg/kg (Asociación Española de Normalización y Certificación, 2011).

4.6 Legislación

4.6.1 FAO

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) varios países desde el año 1995 han reglamentado la patulina especialmente en productos de frutas, principalmente en jugos de manzana. El nivel de 50 µg/kg ha sido adoptado como reglamento o valor guía para patulina en alimentos, por una gran mayoría de países, como lo muestra en la Figura 3 (FAO, 2003).

Se dispone de metodología analíticas validadas para analizar en jugos de frutas la patulina a nivel de 50 µg/kg. Mientras que, en alimentos para bebés y lactantes la Unión Europea fijo un límite de 10 µg/kg, a proviso hasta tanto se cuente con un método analítico adecuado (FAO, 2003).

La FAO indica que una dosis diaria máxima tolerable en patulina es de 0,4 µg/kg de peso corporal.



Figura 3. Número de países que tienen niveles de patulina en alimentos (FAO, 2003).

4.6.2 UNION EUROPEA

La Unión Europea en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 indica que en lo que concierne a la patulina, el CCAH (Comité Científico de la Alimentación Humana) aprobó una ingesta diaria tolerable máxima de 0,4 µg/kg por peso corporal (Comisión Europea, 2006).

Teniendo en cuenta la ingesta diaria tolerable máxima, se fijaron contenidos máximos de patulina en los productos alimenticios para salvaguardar a las personas que consumen estos productos contra una contaminación (Comisión Europea, 2006).

Productos alimenticios	Contenido máximo (µg/kg)
Zumos de frutas, zumos de frutas concentrados reconstituidos y néctares de frutas	50
Bebidas espirituosas, sidra y otras bebidas fermentadas elaboradas con manzana o que contengan zumo de manzana	50
Productos sólidos elaborados con manzanas, incluidos la compota y el puré de manzana destinados al consumo directo a excepción de los productos alimenticios para niños y lactantes	25

Zumo de manzana y productos sólidos elaborados a base de manzanas, incluidos la compota y el pure de manzana destinados a los lactantes y niños de corta edad y vendidos y etiquetados como tales	10
Alimentos infantiles distintos de los alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad	10

Tabla 4. Contenido máximo permitido de patulina (Comisión Europea, 2006).

4.6.3 FDA

Según la FDA (Food and Drug Administration) realizó su propia evaluación independiente de los datos con JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios), que es una organización internacional la cual proporciona evaluaciones toxicológicas basadas en la ciencia. Y llegó a la conclusión que la ausencia de acumulación establece una ingesta diaria máxima tolerable de 0,4 µg/kg por peso corporal por día. La ingesta diaria máxima se deriva del NOAEL (No observed adverse effect level, o dosis sin efecto adverso) de patulina que es 0,3 mg/kg por peso corporal por semana (FDA, 2005)

La FDA también indica que el nivel máximo de presencia de patulina en jugo de manzana, jugos concentrados de manzana y productos basados en jugos de manzana es de 50 µg/kg (FDA, 2005)

5. Conclusión

Según lo investigado se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La patulina es producida por algunas especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Byssochlamys*. Pero el mayor productor de patulina es *Penicillium expansum* que es el hongo que más ataca a la manzana. Es causante de la enfermedad del moho azul. Este hongo crece a una temperatura óptima de 25 ° C, aunque puede crecer también a -3 ° C. El *P. expansum* se puede propagar por diferentes vectores como equipos, personal y por mal almacenamiento. Este

hongo tiene un requerimiento bajo de oxígeno. El *P. expansum* puede producir patulina a temperaturas entre 1 ° C y 25 ° C, aunque la temperatura óptima es de 25 ° C. Algunas cepas son capaces de producir esta toxina con bajo nivel de oxígeno. Pero con un aumento del 3% de CO₂ y 2% de oxígeno se inhibió la producción de patulina.

2. Los productos de la molienda a base de granos cereales no contenían presencia de patulina, pero otros productos alimenticios como peras y en especial manzanas y sus derivados tienen presencia de patulina. La cual se ha identificado que puede producirse en el periodo de postcosecha. Se ha encontrado presencia de patulina también en mostos de uva y vinos. En el año 2000 se observó que el 50% de los jugos y bebidas analizadas estaban contaminados, en especial en productos de origen chino con un 87,4% y productos de origen turco con un 100% de muestras contaminadas. También se observó que las muestras de frutas frescas pueden tener más cantidad de patulina que los productos derivados. Para evitar esta contaminación se debe seguir las buenas prácticas de agricultura y buenas prácticas de manufactura. En el almacenado se debe tener bajas temperaturas para evitar el crecimiento del hongo productor de patulina y tenemos mayor efectividad para el control del *P. expansum* al aumentar los niveles de CO₂ en vez de disminuirlos, especialmente en lo que se refiere a la conservación a largo plazo durante la postcosecha.
3. La toxicidad de la patulina se la ha estudiado en animales y después de administrar patulina tanto por vía oral, subcutánea o cutánea. Se observó que produce daños en el tracto gastrointestinal, genotóxicos, mutagénicos, cancerígenos, nefrotóxicos, teratogénicos y efectos neurotóxicos. Pero para el ser humano no causa cáncer por lo cual la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer clasifica esta toxina en el grupo 3 (IARC, 2020), pero afecta a la mucosa intestinal en lo que se refiere a la estructura y composición. El principal mecanismo responsable de su toxicidad se debe al contundente lazo por los grupos sulfídrico en las proteínas y los aminoácidos debido a su naturaleza electrofílica.
4. Los análisis establecidos que se realizan para la detección de patulina son procesos complejos de preparación de muestras antes del análisis, instrumentos y equipos

costosos por lo cual se justifican investigaciones para desarrollar en un futuro técnicas de detección simples y rápidas y así ayudar a la industria de los alimentos.

5. Las diferentes organizaciones mundiales sobre los alimentos han determinado una ingesta diaria máxima tolerable de 0,4 µg/kg por peso corporal por día. También que el límite máximo para alimentos como manzanas y sus derivados es de 50 µg/kg, para purés que serán consumidos por niños es de 25 µg/kg y los zumos de manzana para lactantes es de 10 µg/kg.

6. Bibliografía

- Asociación Española de Normalización y Certificación (2011). *Determinación de patulina en zumos de frutas y en pures de fruta para niños, Método por HPLC con purificación por cromatografía de reparto líquido/ líquido y extracción en fase sólida y detección por UV. UNE-EN 15870.*
- Asociación Española de Normalización y Certificación (2004). *Determinación de patulina en zumos claros y turbios y en purés de manzana, Método por HPLC con purificación por cromatografía de reparto líquido/ líquido. UNE-EN 14177.*
- Barreira, M.J., Alvito, P.C. y Almeida, C.M.M. (2010). "Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal". *Food Chemistry*, 121(3), pp. 653-658 DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.085.
- Bevardi, M., Petrović, M., Markov, K. y Bošnir, J (2018). "How sulphur dioxide and storage temperature contribute to patulin degradation in homemade apple juice". *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69(3), pp. 258-263 DOI: 10.2478/aiht-2018-69-3097.
- Codex Alimentarius (2003). Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por patulina en el jugo de manzana y los ingredientes del jugo de manzana en otras bebidas. CAC/RCP 50-2003.
- Comisión Europea (2006). *Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.*
- Demirel, R (2016). "Comparison of rDNA regions (ITS, LSU, and SSU) of some Aspergillus, Penicillium, and Talaromyces spp". *Turkish Journal of Botany*, 40(6), 576-583.
- FAO (2003). *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003.*
- FDA (2005). *Apple Juice, Apple Juice Concentrates, and Apple Juice Products - Adulteration with Patulin.* Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-510150-apple-juice-apple-juice-concentrates-and-apple-juice-products-adulteration-patulin> [Consultado: 17/06/2020].
- Funes, G.J., Gómez, P.L., Resnik, S.L. y Alzamora, S.M (2013). "Application of pulsed light to patulin reduction in McIlvaine buffer and apple products". *Food Control*, 30(2), pp. 405-410 DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.09.001.
- IARC (2020) *Agents classified by the IARC.* Disponible en: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications> [Consultado: 17/06/2020].
- Li, B., Chen, Y., Zong, Y., Shang, Y., Zhang, Z., Xu, X., Wang, X., Long, M. y Tian, S (2019). "Dissection of patulin biosynthesis, spatial control and regulation mechanism in *Penicillium expansum*". *Environmental Microbiology*, 21(3), pp. 1124-1139 DOI: 10.1111/1462-2920.14542.
- Liu, D (2018). *Handbook of Foodborne Diseases.* Taylor and Francis.

- Maidana, L., Gerez, J.R., El Khoury, R., Pinho, F., Puel, O., Oswald, I.P. y Bracarense, Ana Paula F. R. L (2016). "Effects of patulin and ascladiol on porcine intestinal mucosa: An ex vivo approach". *Food and Chemical Toxicology*, 98(Pt B), pp. 189-194 DOI: 10.1016/j.fct.2016.10.001.
- Martinez, M.R. (2012). *Micotoxinas*. Diaz de Santos.
- Morales, H., Sanchis, V., Rovira, A., Ramos, A. y Marin, S. (2006) Patulin accumulation in apples during postharvest: Effect of controlled atmosphere storage and fungicide treatments.
- Ostry, V., Malir, F., Cumova, M., Kyrova, V., Toman, J., Grosse, Y., Pospichalova, M. y Ruprich, J. (2018). "Investigation of patulin and citrinin in grape must and wine from grapes naturally contaminated by strains of *Penicillium expansum*". *Food and Chemical Toxicology*, 118, pp. 805-811 DOI: 10.1016/j.fct.2018.06.022.
- Oteiza, J.M., Khaneghah, A.M., Campagnollo, F.B., Granato, D., Mahmoudi, M.R., Sant'Ana, A.S. y Gianuzzi, L (2017). "Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina". *LWT*, 80, pp. 200-207 DOI: 10.1016/j.lwt.2017.02.025.
- Patriarca, A. (2019). "Fungi and mycotoxin problems in the apple industry". *Current Opinion in Food Science*, 29, pp. 42-47 DOI: 10.1016/j.cofs.2019.08.002.
- Pillay, Y., Phulukdaree, A., Nagiah, S. y Chuturgoon, A.A (2015). "Patulin triggers NRF2-mediated survival mechanisms in kidney cells". *Toxicon*, 99, pp. 1-5 DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.03.004.
- Piqué, E., Vargas-Murga, L., Gómez-Catalán, J., Lapuente, J.d. y Llobet, J.M (2013). "Occurrence of patulin in organic and conventional apple-based food marketed in Catalonia and exposure assessment". *Food and Chemical Toxicology*, 60, pp. 199-204 DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.052.
- Rodríguez-Carrasco, Y., Moltó, J. C., Berrada, H., & Mañes, J. (2014). A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 146, 212-219.
- Salas, M.P., Reynoso, C.M., Céliz, G., Daz, M. y Resnik, S.L (2012). "Efficacy of flavanones obtained from citrus residues to prevent patulin contamination". *Food Research International*, 48(2), pp. 930-934 DOI: 10.1016/j.foodres.2012.02.003.
- Schinca, C (2017). *Identificación y caracterización de cepas de especies de Penicillium causantes del moho azul en poscosecha de manzana*. Tesina de Grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad de la República de Uruguay.
- Soriano, José Miguel (2015). *Micotoxinas en Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- Torović, L., Dimitrov, N., Assunçao, R. y 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(11), pp. 2023-2032 DOI: 10.1080/19440049.2017.1364434.
- Vaclavikova, M., Dzuman, Z., Lacina, O., Fenclova, M., Veprikova, Z., Zachariasova, M. y Hajsova, J (2015). "Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based

products using a sensitive UHPLC–MS/MS analytical procedure". *Food Control*, 47, pp. 577-584 DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.07.064.