

## Estudo da bioacessibilidade da patulina em sumos de fruta: o que acontece após a ingestão?

### Patulin bioaccessibility in fruit juices: what happens after ingestion?

André Lopes<sup>1</sup>, Carla Martins<sup>2,3</sup>, Ricardo Assunção<sup>2,3</sup>, Paula Alvito<sup>2,3</sup>

[paula.alvito@insa.min-saude.pt](mailto:paula.alvito@insa.min-saude.pt)

(1) Faculdade de Ciências de Lisboa, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(2) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

#### \_Resumo

As micotoxinas são contaminantes identificados com frequência em diversos géneros alimentícios incluindo fruta e produtos derivados. A exposição a estes metabolitos secundários produzidos por fungos pode provocar efeitos tóxicos para a saúde humana e animal. A patulina é uma micotoxina que ocorre sobretudo em maçãs e alimentos à base de maçã, incluindo os que são consumidos por crianças, tais como purés ou sumos de fruta. A ingestão de alimentos contaminados é considerada a principal via de exposição à patulina pelo que se considera relevante estudar a influência do processo digestivo na potencial toxicidade desta micotoxina. Para o efeito, neste estudo foram determinados os valores de bioacessibilidade da patulina nas fases oral (O), gástrica (G) e intestinal (I) quando presente em sumos de fruta à base de maçã, contaminados artificialmente, aplicando-se, pela primeira vez, o método harmonizado de digestão *in vitro*. Os valores de bioacessibilidade obtidos (O: 77,8%; G: 79,3%; I: 21,6%) sugerem uma redução dos teores de patulina que ocorre maioritariamente durante a fase intestinal, revelando também a existência de elevada bioacessibilidade nas fases oral e gástrica (superior a 75%). Os resultados indicam a necessidade de um estudo mais detalhado sobre os efeitos da patulina na fase gástrica atendendo ao potencial impacto na saúde humana, em especial em populações mais vulneráveis como as crianças.

#### \_Abstract

Mycotoxins are contaminants usually found in foodstuffs including fruit and products thereof. These secondary metabolites produced by fungi can cause serious human and animal health problems. Patulin is a mycotoxin that occurs primarily in apples and products thereof, including those consumed by children, such as apple purées or fruit juices. The ingestion of contaminated food is the main route of exposure to patulin therefore, it is important to clarify the influence of the digestive process on the potential toxicity of this mycotoxin. The patulin's bioaccessibility values in the oral (O), gastric (G) and intestinal (I) phases were determined in this study, considering artificially contaminated apple-based juices and applying, for the first time, the harmonized *in vitro* digestion method. The bioaccessibility values obtained (O: 77.8%, G: 79.3%, I: 21.6%) suggest that the reduction of patulin occurs mostly during the intestinal phase, also revealing the existence of high bioaccessibility during the oral and gastric phase (above 75%). These results point the need for further studies on the potential toxic effects of patulin at gastric phase particularly for vulnerable population groups as children.

#### \_Introdução

As micotoxinas, metabolitos secundários produzidos por fungos, podem constituir um grave problema de saúde, considerando os potenciais efeitos tóxicos em animais e humanos.

A patulina (PAT) é uma micotoxina habitualmente detetada em fruta, sobretudo em maçãs e alimentos à base de maçã, e tem sido referida a sua ocorrência em alimentos consumidos por crianças<sup>(1,2)</sup>. Dado que a via mais frequente de exposição a estes contaminantes é a ingestão alimentar, o estudo da influência do processo digestivo na biodisponibilidade dos contaminantes alimentares, como a patulina, assume particular importância.

A biodisponibilidade de um contaminante corresponde à fração deste composto que alcança a circulação sistémica, podendo exercer o seu efeito tóxico nas células e tecidos do organismo. Por outro lado, a bioacessibilidade corresponde à fração de um contaminante que estará disponível para absorção, no intestino, após o processo digestivo. A quantidade biodisponível resulta dos processos de libertação da matriz alimentar ao longo do processo digestivo, absorção, transporte e metabolização da fração bioacessível<sup>(3)</sup>. Dado que a bioacessibilidade de um contaminante pode ser considerada um indicador da biodisponibilidade máxima do mesmo a nível intestinal, neste estudo foram determinados os valores de bioacessibilidade de patulina para a avaliação do potencial máximo de interação com o organismo, e discutidos os efeitos tóxicos decorrentes da exposição à mesma.

## \_Objetivo

O presente estudo teve como principal objetivo determinar, pela primeira vez, a variação da bioacessibilidade da patulina adicionada artificialmente em sumos de fruta à base de maçã, ao longo das diferentes fases do processo digestivo (oral, gástrica e intestinal) através do método harmonizado de digestão *in vitro* (IVD).

## \_Materiais e métodos

Em 2017 foram adquiridos na região de Lisboa, quatro sumos à base de maçã (contendo um teor mínimo de 50% de maçã): dois sumos límpidos (maçã e maçã-laranja) e dois sumos turvos (maçã e maçã-marmelo). O método harmonizado de digestão *in vitro*, desenvolvido no âmbito da Rede INFOGEST *Cost Action*, foi utilizado para determinar os valores de bioacessibilidade de PAT (4,5). Os sumos foram contaminados artificialmente para uma concentração de 40 µg/kg. Para a determinação da bioacessibilidade foi seguida a metodologia descrita por Assunção e colaboradores (2016) (1) considerando ligeiras modificações. Este método inclui três fases sequenciais: oral (O) que inclui a adição ao alimento contaminado de suco salivar (pH 7), α-amilase (75 U/mL) e incubação a 37°C durante 2 minutos; gástrica (G), adição de suco gástrico (pH 3), pepsina (2000 U/mL), e incubação a 37°C durante 120 minutos; e intestinal (I), adição de suco intestinal (pH 7), pancreatina (numa atividade de tripsina de 100 U/mL), bílis (10 mM), e incubação a 37°C du-

rante 120 minutos. Foram utilizadas diferentes quantidades de sucos consoante a fase digestiva estudada, e a reação enzimática foi terminada pela ação da temperatura (-80°C) e na fase intestinal, pela adição de Pefabloc®. Foram efetuadas cinco réplicas por cada fase digestiva estudada. A bioacessibilidade de PAT foi determinada no final de cada uma das três fases do processo de digestão (O, G e I). A determinação de patulina foi efetuada segundo a metodologia descrita por Barreira e colaboradores (2010) (2). Para a determinação dos valores de bioacessibilidade, compararam-se os valores de PAT obtidos no controlo da contaminação (amostra contaminada não submetida a digestão *in vitro*) e os valores de PAT nas amostras submetidas a digestão *in vitro*. Os dados foram avaliados estatisticamente recorrendo ao software IBM® SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, NY). O teste Kruskal-Wallis foi usado para avaliar os resultados de bioacessibilidade obtidos nas diferentes fases.

## \_Resultados

Os resultados de bioacessibilidade de PAT obtidos após a aplicação do método harmonizado IVD encontram-se resumidos na tabela 1.

Os valores médios de bioacessibilidade obtidos para o sumo de maçã límpido foram de 89,9 ± 2,7%, 91,4 ± 6,1% e 21,4 ± 2,5% nas fases oral, gástrica e intestinal, respetivamente. Os valores médios de bioacessibilidade para o sumo de maçã

Tabela 1: Valores de bioacessibilidade de PAT (%) em 4 sumos à base de maçã após a digestão *in vitro*.

Sumo	Natureza	Bioacessibilidade (%)					
		Fase oral (O)		Fase gástrica (G)		Fase intestinal (I)	
Maçã	Límpido	93,8	89,9	98,0	91,4	25,5	21,4
		87,4	± 2,7	82,4	± 6,1	19,0	± 2,5
Maçã	Turvo	81,1	71,6	81,8	76,3	7,1	6,1
		61,4	± 7,7	65,1	± 7,2	5,4	± 0,9
Maçã-marmelo	Turvo	94,1	85,3	83,6	80,9	51,2	44,0
		72,5	± 8,3	78,3	± 2,4	30,2	± 8,6
Maçã-laranja	Límpido	71,6	64,5	75,7	68,4	19,3	14,7
		56,8	± 5,9	62,6	± 5,7	10,1	± 3,5

Os valores de bioacessibilidade estão expressos em média ± DP (desvio padrão) (n=5); Max = máximo; Min = mínimo.

turvo foram  $71,6 \pm 7,7\%$ ,  $76,3 \pm 7,2\%$ ,  $6,1 \pm 0,9\%$ , nas mesmas fases, respetivamente. A análise dos valores de bioacessibilidade do sumo turvo maçã-marmelo (O:  $71,6 \pm 7,7\%$ ; G:  $76,3 \pm 7,2\%$ ; I:  $6,1 \pm 0,9\%$ ) e do sumo límpido de maçã-laranja (O:  $64,5 \pm 5,9\%$ ; G:  $68,4 \pm 5,7\%$ ; I:  $14,7 \pm 3,5\%$ ) sugere que os valores de bioacessibilidade são influenciados pela matriz estudada, isto é, diferentes matrizes alimentares apresentam diferentes valores de bioacessibilidade.

As diferenças observadas nos valores de bioacessibilidade quando analisados por fase (O:  $77,9 \pm 12,1\%$ ; G:  $79,3 \pm 10,0\%$ ; I:  $21,6 \pm 15,1\%$ ) indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de bioacessibilidade das fases oral e gástrica (mais elevadas) quando comparadas com a fase intestinal (mais reduzida) ( $p < 0,05$ ).

## Discussão e conclusão

Este estudo apresenta os primeiros resultados que descrevem a bioacessibilidade de PAT, adicionada artificialmente, em sumos de fruta à base de maçã ao longo das três fases do processo de digestão *in vitro* aplicando o método harmonizado IVD.

Assunção e colaboradores (2015) (6) reportaram valores médios de bioacessibilidade intestinal de  $27,7 \pm 13,5\%$  em sumos de fruta à base de maçã. Apesar de terem aplicado uma metodologia de simulação *in vitro* da digestão diferente da utilizada no presente estudo, os valores obtidos estão de acordo com os observados agora. A redução dos teores de patulina no final da fase intestinal poderá ser atribuída à ação dos processos digestivos que poderão originar alterações na sua estrutura química ou eventual formação de novos compostos. Em contraste, são de realçar os elevados valores de bioacessibilidade na fase oral e gástrica (superiores a 75%).

Estes dados vêm alertar para potenciais perigos para a saúde, decorrentes da exposição a patulina em alimentos contaminados, face ao período de permanência desta micotoxina no organismo durante a digestão, em particular, na fase gástrica (7).

Assim, uma atenção particular deverá ser dedicada aos valores de bioacessibilidade gástrica obtidos, atendendo ao potencial impacto na saúde humana, em especial em popu-

lações mais vulneráveis como as crianças. As crianças têm maior probabilidade de exposição à patulina, já que consomem produtos à base de maçã (sumos, farinhas lácteas e purés) com maior regularidade, que os indivíduos adultos (8).

Considerando os resultados obtidos, estudos futuros que permitam clarificar os potenciais efeitos tóxicos da patulina ao longo do processo digestivo assumem particular relevância, sobretudo em populações vulneráveis.

## Referências bibliográficas:

- (1) Assunção R, Martins C, Dupont D, et al. Patulin and ochratoxin A co-occurrence and their bioaccessibility in processed cereal-based foods: a contribution for Portuguese children risk assessment. *Food Chem Toxicology*. 2016;96:205-14.
- (2) Barreira MJ, Alvito P, Almeida CM. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chem*. 2010;121(3):653-8.
- (3) Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicology*. 2005;43(1):31-40.
- (4) Minekus M, Alminger M, Alvito P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct*. 2014;5(6):1113-24.
- (5) Egger L, Ménard O, Delgado-Andrade C, et al. The harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method: from knowledge to action. *Food Res. Int*. 2016;88 (Part B):217-25.
- (6) Assunção R, Martins C, Ferreira M, et al. Aplicação de modelo de digestão *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2015;4(13):30-32. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3106>
- (7) Boland M. Human digestion – a processing perspective. *J Sci Food Agric*. 2016;96(7):2275-83.
- (8) Ioi JD, Zhou T, Tsao RF, Marcone M. Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins (Basel)*. 2017;9(5). pii: E157. [www.mdpi.com/2072-6651/9/5/157](http://www.mdpi.com/2072-6651/9/5/157)