



## Aplicação de modelo de digestão *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta

Ricardo Assunção<sup>1,2,3</sup>, Carla Martins<sup>1</sup>, Mariana Ferreira<sup>1,4</sup>,  
Paula Alvito<sup>1,3</sup>

[ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt](mailto:ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt)

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(2) Universidade de Évora.

(3) CESAM-Centro de Estudos do Ambiente e do Mar. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

(4) Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

### Introdução

A ingestão de alimentos é considerada a principal via de exposição a contaminantes, contudo a quantidade total de um contaminante ingerido (dose externa) nem sempre reflete a quantidade disponível para ser absorvida a nível intestinal (bioacessibilidade) e consequentemente provocar efeitos tóxicos (1,2).

Apesar da relevância fisiológica, os ensaios *in vivo* nem sempre podem ser usados para avaliar a toxicidade de contaminantes alimentares, atendendo a razões éticas, constrangimentos técnicos, custos e elevada variabilidade interindividual (3). Por forma a contornar estas desvantagens, e no que diz respeito ao estudo da digestão, a utilização de metodologias *in vitro* de simulação da digestão constitui uma ferramenta com crescente aplicação no domínio da toxicologia alimentar. Os modelos de digestão *in vitro* simulam, de uma forma simplificada, o processo de digestão humana a nível oral, gástrico e intestinal, permitindo a determinação da bioacessibilidade de componentes alimentares a partir da sua matriz durante o trânsito gastrointestinal (4). Estes modelos de digestão *in vitro* pretendem recriar as condições fisiológicas do trato gastrointestinal, nomeadamente, a composição química dos fluidos digestivos, pH, e tempo de permanência característico de cada compartimento (1,4). A bioacessibilidade é influenciada pela composição da matriz alimentar, nomeadamente, a sua natureza e a presença de outros alimentos (5).

A contaminação de alimentos com micotoxinas representa atualmente um dos mais importantes assuntos no domínio da segurança

alimentar (6). As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos e que apresentam efeitos teratogénicos, carcinogénicos, mutagénicos, imunotóxicos ou nefrotóxicos para os seres humanos (7). A patulina (PAT), uma micotoxina produzida por fungos do género *Penicillium* spp. durante o processo de deterioração da fruta, representa uma preocupação particular uma vez que a exposição humana a esta micotoxina pode resultar em toxicidade aguda ou crónica. As crianças são uma população particularmente vulnerável à exposição a PAT devido ao elevado consumo de produtos à base de maçã ou derivados de fruta (8).

### Objetivos

O presente estudo pretende determinar a bioacessibilidade da PAT em sumos de fruta, utilizando para o efeito um modelo de digestão *in vitro*, bem como estudar a influência da composição e natureza do sumo. Considerando que habitualmente os sumos podem ser ingeridos simultaneamente com refeições sólidas, será ainda avaliado o efeito da adição de uma refeição à base de carne.

### Material e métodos

Os estudos de bioacessibilidade foram realizados de acordo com o modelo de digestão *in vitro* descrito por Versantvoort e colaboradores (2005). Os ensaios foram realizados na presença e na ausência de uma refeição sólida (preparado comercial para crianças de carne com esparguete) em duplicado. Sete sumos de fruta de composição (maçã e outros frutos) e natureza (turvos e lípidos) diferentes, foram adquiridos em supermercados da região de Lisboa. A bioacessibilidade foi expressa em percentagem (%) e determinada pela razão entre o teor de patulina antes e após digestão.

As condições analíticas usadas para determinação da PAT nos extratos digeridos foram as descritas por Barreira e colaboradores (2010), usando uma metodologia de extração em fase sólida com determinação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência e deteção por ultravioleta (SPE-HPLC-UV). Todos os extratos da digestão foram analisados em duplicado e os valores médios da PAT foram expressos em  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ . A metodologia analítica apresentou um limite de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) de  $0.9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  e  $2.9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ , respetivamente, e um coeficiente de variação de 3%.

## Resultados e discussão

Os valores de bioacessibilidade na ausência de refeição sólida variaram entre 14,33% e 48,52% com um valor médio de  $27,65 \pm 13,50\%$ . Os valores de bioacessibilidade na presença de refeição variaram entre 1,67% e 15,11% com um valor médio de  $7,89 \pm 4,03\%$  (tabela 1). A bioacessibilidade na ausência de refeição apresentou um valor significativamente mais elevado do que na presença de refeição ( $p=0,001$ ). O valor médio de bioacessibilidade para os sumos de fruta límpidos (24,68%) revelou ser inferior à dos sumos de fruta turvos (31,60%), apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa ( $p=0,088$ ), quando na ausência de refeição padrão. Pelo contrário, na presença de refeição, o valor médio de bioacessibilidade dos sumos de fruta límpidos (9,71%) revelou ser superior à dos sumos turvos (5,46%), sendo a diferença estatisticamente não significativa ( $p=0,093$ ).

Os resultados disponíveis sobre a bioacessibilidade da PAT em sumos de fruta ou produtos à base de maçã são escassos assim como relativamente à influência da adição de uma refeição sólida. Brandon e colaboradores (2012) determinaram valores superiores compreendidos entre 55-85% em produtos à base de maçã, usando o mesmo método de digestão do presente estudo (9). Raiola e colaboradores (2012) determinaram valores idênticos para dois sumos de maçã (29% e 25%), mas usando outro método de digestão (2). O desenvolvimento e utilização de metodologias de digestão *in vitro* harmonizadas é pois essencial para uma comparação mais eficaz entre resultados. A presença de outros tipos de fruta nos sumos, para além de maçã, poderá também influenciar os resultados. A bioacessibilidade de micotoxinas pode variar para diferentes tipos de alimentos, nomeadamente, massas alimentares (10).

Tabela 1: Bioacessibilidade (%) da patulina em sete sumos de fruta (límpidos e turvos), na ausência ou na presença de uma refeição sólida.

Sumo de fruta	Natureza	Bioacessibilidade (%) Ausência de refeição	Média ± SD	Bioacessibilidade (%) Presença de refeição	Média ± SD
Maçã	L	14,33	15,55 ± 1,73	6,80	9,48 ± 3,80
		16,77		12,17	
Maçã e outros 3 frutos	L	17,97	18,70 ± 1,03	13,25	12,99 ± 0,37
		19,43		12,73	
Maçã e outros 5 frutos	L	16,41	16,10 ± 0,45	15,11	8,39 ± 9,50
		15,78		1,67	
Maçã e outros 8 frutos	L	48,52	48,39 ± 0,19	9,41	7,99 ± 2,00
		48,25		6,58	
Bioacessibilidade sumos límpidos			24,68 ± 14,71		9,71 ± 4,47
Maçã	T	27,57	27,17 ± 0,57	4,50	4,65 ± 0,21
		26,76		4,80	
Maçã e cenoura	T	22,59	21,33 ± 1,78	5,39	5,05 ± 0,48
		20,07		4,71	
Maçã e outros 5 frutos	T	44,46	46,30 ± 2,60	5,14	6,68 ± 2,18
		48,14		8,22	
Bioacessibilidade sumos turvos			31,60 ± 11,77		5,46 ± 1,39
Bioacessibilidade total			27,65 ± 13,50*		7,89 ± 4,03*

L - Límpido; T - Turvo; SD - desvio padrão; \* -  $p < 0,05$  (Teste *Mann-Whitney*), comparando a bioacessibilidade de PAT na ausência e na presença da refeição.

## Conclusões

A utilização de metodologias *in vitro* permite determinar as doses efetivas que vão exercer os potenciais efeitos tóxicos nos seres humanos. O presente estudo salienta a influência da adição de uma refeição sólida na bioacessibilidade de contaminantes alimentares.

O uso combinado de modelos *in vitro* que simulem a digestão e a absorção intestinal <sup>(11)</sup>, disponibilizam uma abordagem ampla do que sucede no decurso do processo de digestão e absorção de contaminantes alimentares.

## Financiamento

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto "MycoMix" (PTDC/DTP-FTO/0417/2012), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Artigo baseado em: Assunção R, Ferreira M, Martins C, et al. Applicability of *in vitro* methods to study patulin bioaccessibility and its effects on intestinal membrane integrity. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(14-16):983-92.

## Referências bibliográficas:

- (1) Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E, et al. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(1):31-40.
- (2) Raiola A, Meca G, García-Llatas G, et al. Study of thermal resistance and *in vitro* bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(9):3068-72.
- (3) Ménard O, Cattenoz T, Guillemin H, et al. Validation of a new *in vitro* dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chem*. 2014;145:1039-45. Epub 2013 Sep 14.
- (4) Hur SJ, Lim BO, Decker EA, et al. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem*. 2011;125(1):1-12. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.036
- (5) Versantvoort, CHM, van de Kamp E, Rempelberg CJM. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. Bilthoven: RIVM, 2004 (RIVM report 320102002/2004). [http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:13066&type=org&disposition=inline&ns\\_nc=1](http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:13066&type=org&disposition=inline&ns_nc=1)
- (6) WHO global strategy for food safety : safer food for better health. Geneva: World Health Organization, 2002, p.11. <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241545747.pdf>
- (7) van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389(1):147-57.
- (8) Barreira MJ, Alvito PC, Almeida CMM. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chem*. 2010;121(3): 653-8.
- (9) Brandon EFA, Baars AJ, Te Biesebeek JD, et al. Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. *World Mycotoxin J*. 2012;5(4):391-403.
- (10) Raiola A, Meca G, Mañes J, et al. Bioaccessibility of deoxynivalenol and its natural co-occurrence with ochratoxin A and aflatoxin B1 in Italian commercial pasta. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(2):280-7. Epub 2011 Oct 8.
- (11) De Nijs M, van den Top HJ, Portier L, et al. Digestibility and absorption of deoxynivalenol-3-beta-glucoside in *in vitro* models. *World Mycotoxin J*. 2012; 5(3): 319-24.