



Avaliação de métodos *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade de elementos traços em leguminosas

Jade S. A. Siqueira¹, Jéssica O. Fraga², Wagna P. C. dos Santos³

¹Bolsista de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – IFBA. E-mail: jadesiqueira@hotmail.com

²Bolsista de Iniciação Científica Júnior – IFBA. E-mail: siquinhalima_@hotmail.com

³Professora Pesquisadora - IFBA. E-mail: jolurswp@gmail.com

Resumo: A biodisponibilidade do nutriente (ou contaminante) é um importante parâmetro para avaliação nutricional de um alimento. Os métodos empregados para estimar a biodisponibilidade são, em geral, muito laboriosos e fornecem resultados discordantes entre si. O trabalho proposto tem por objetivo comparar dois processos analíticos *in vitro* que visem estimar a biodisponibilidade de elementos traço essenciais e potencialmente tóxicos em amostra de leguminosas de diferentes espécies (*Vigna unguiculata L. Walp*, *Cajanus cajan L.*, *Lablab purpureus L.Sweet*). Após pré-tratamento das amostras, foram empregados os métodos *Simple Bioaccessibility Extraction* (SBET) e *Physiologically Based Extraction Test* (PBET) para avaliar a bioacessibilidade dos elementos traços. Demonstrou-se que os percentuais de bioacessibilidade de Cu, Fe e Zn diferem-se significativamente, quando se compara os resultados obtidos nos métodos empregados, sendo inferiores os percentuais obtidos no método PBET.

Palavras-chave: biodisponibilidade, elementos traços, métodos *in vitro*, leguminosas.

1. INTRODUÇÃO

A concentração de um nutriente em um alimento não é um indicador confiável para avaliar um alimento sob o ponto de vista nutricional. Como consequência, os termos bioacessibilidade ou biodisponibilidade de um nutriente foram propostos pela comunidade científica (FENNEMA et al, 2008). Em 1984, O'Dell já referia-se à biodisponibilidade como a proporção do nutriente nos alimentos que é absorvida e utilizada nos processos de transporte, assimilação e conversão à forma biologicamente ativa (COZZOLINO, 2009). Segundo Ruby et al. (1999), a bioacessibilidade oral de uma substância pode ser definida como a fração solúvel nas condições do trato gastrointestinal e que está disponível para a absorção. Porém alguns nutrientes não necessitam ser digeridos para serem absorvidos e outros, mesmo hidrolisados não podem ser absorvidos (COZZOLINO, 2009). O ferro pode encontrar-se fortemente ligado na estrutura do quelato absorvido, não havendo liberação do íon metálico às células e incorporação pelas proteínas (FENNEMA, 2008).

Muitos fatores promotores e inibidores atuam sobre a biodisponibilidade de elementos traço, tais como: forma química do mineral no alimento; ligantes dos alimentos; atividade redox em componentes do alimento; interações entre os minerais e o estado fisiológico do indivíduo (FENNEMA, 2008). Portanto, o conceito de biodisponibilidade de micronutrientes deve reconhecer todos os fatores importantes, bem como as taxas de utilização do nutriente absorvido e as taxas de trocas e excreção, as quais podem variar consideravelmente, devido a fatores: (i) intrínsecos, ou seja, mecanismos de absorção e processos metabólicos e mútuas interações; (ii) extrínsecos, tais como solubilidade, dimensão de moléculas, efeitos químicos sinérgicos ou antagonistas. Desta forma, em 1997, por ocasião da Conferência Internacional de Biodisponibilidade, o termo biodisponibilidade passou a referir-se à fração de qualquer nutriente ingerido com potencial para suprir demandas fisiológicas em tecidos alvos. Em 2001, o conceito incorporou três aspectos: bioconversão, bioeficácia e bioeficiência (COZZOLINO, 2009).

Os métodos empregados para estimar a biodisponibilidade de elementos contam com diferentes abordagens (NAYAK e NAIR, 2003). Os testes *in vivo* fazem uso de cobaias (coelhos, ratos, porcos e macacos). A fração bioacessível dos nutrientes é determinada pelas análises das unhas, pêlos e sangue do animal após a administração da dieta de interesse. Esses testes necessitam de profissionais especializados e infraestrutura específica para a sua realização, além possuírem tempos de execução e



custos elevados (BOSSO e ENZWEILLER, 2008; OOMEN et al., 2002). Já os testes *in vitro* podem ser atrativos devido a maior velocidade analítica e baixo custo. Estes testes se fundamentam na extração seletiva ou simulam a fisiologia do trato gastrointestinal e podem ser classificados em duas categorias, estáticos e dinâmicos, sendo os primeiros mais usuais. O método estático considerado mais simples é o *Simple Bioaccessibility Extraction* (SBET), proposto pelo Consórcio para Pesquisas em Solubilidade e Biodisponibilidade (SBRC). Os ensaios que simulam as condições físico-químicas das soluções encontradas do estômago e no duodeno humano são chamados de teste de bioacessibilidade e podem ser conhecidos como *Physiologically Based Extraction Test* (PBET) (OOMEN et al, 2002; RUBY et al., 1996). Os métodos *in vitro* podem gerar resultados para estudos de avaliação de risco à saúde humana. O desenvolvimento, validação e padronização destes métodos é uma área que ainda demanda estudos (INTAWONGSE e DEAN, 2006).

O Guia Alimentar para a População Brasileira preconiza que o feijão é importante para garantir uma dieta equilibrada (BRASIL, 2006), portanto deve ter o seu consumo incentivado. As leguminosas são fontes de elementos essenciais, particularmente de K, P, Ca, Cu, Fe e Zn (IQBAL *et al.*, 2006) e fornecem quantidades suficientes de Fe, Ca e P requeridas numa dieta humana. Não obstante, é necessário mencionar a possível presença de contaminantes inorgânicos nos vegetais, pois constitui um risco eminente à manutenção da saúde (KAHLON, 2005).

De acordo com os estudos de 2012, o Brasil produziu 3.668,8 mil t/ano de feijão comum, safra 2011/2012. A contribuição do Estado da Bahia nessa mesma safra foi de 310,1 mil t/ano. O consumo de feijão no Brasil apresentou um aumento considerando o período de 2009 a 2012, passando de 3.450 a 3.700 mil toneladas. Considerando o período de 2009 a 2012, houve um aumento no consumo desse alimento, passando de 3.450 a 3.700 mil toneladas, na dieta do brasileiro (CONAB, 2012).

A busca por aprimoramentos nos meios e condições físico-químicas utilizadas nos testes *in vitro* para que se tornem cada vez mais fiéis a valores obtidos nos testes *in vivo* podem se apresentar como uma solução mais prática e confiável para investigações sobre o comportamento de nutrientes no organismo. Este artigo visa fazer um aprofundamento em fatores fisiológicos do processo de digestão gastrointestinal, assim como em detalhes da composição de amostras de três espécies de leguminosas – *Vigna unguiculata* (caupi, branco), *Lablab purpureus* (mangalô) e *Cajanus cajan* (gandu) –, em termos de elementos traços essenciais e potencialmente tóxicos, de modo a relacionar essas observações teóricas com valores práticos obtidos nos ensaios de PBET e SBET.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos para este trabalho foram conduzidos com amostras de *Vigna unguiculata* L. Walp (caupi); *Cajanus cajan* L. (gandu) e *Lablab purpureus* L. Sweet (mangalô). As amostras de caupi e gandu utilizadas nos experimentos foram obtidas na cidade de Ipirá, micro-região de Feira de Santana (Centro Norte Baiano). Já as amostras do feijão mangalô foram adquiridas na cidade de Santo Amaro (região metropolitana de Salvador). A etapa de pré-tratamento das amostras já foi realizada em trabalho anterior, o que envolveu as operações de seleção e lavagem, escorrimento e acondicionamento em embalagens plásticas contendo 100 g. Em seguida, as amostras foram mantidas sob temperatura de refrigeração. Para conservação das amostras, utilizou-se secagem em estufa a 60°C, com circulação de ar forçada. A amostra seca foi moída por 2 min, em moinho de bolas com frasco e esferas de carbeto de tungstênio. Por fim as amostras moídas foram acondicionadas em frascos plásticos descontaminados.

Para a descontaminação, todos os materiais utilizados para os experimentos foram mantidos completamente submersos em banho de ácido nítrico a 10% (v/v) durante no mínimo 24 horas. Posteriormente, os materiais foram lavados abundantemente com água deionizada e enxaguados, finalmente, com água ultrapura. Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, com resistividade específica de 18,2 M Ω .cm⁻¹.

A determinação do teor total dos analitos foi realizado em trabalho anterior, através da decomposição de 500 mg de amostra em bloco digestor com 5,0 mL HNO₃ 65% (m/m) e 10,0 mL



H₂O₂ 30% (v/v). Aos tubos digestores foram adaptados dedos frios para promover o refluxo, minimizando perdas por evaporação para posterior determinação empregando técnicas espectrométricas (NANO et al, 2009). A temperatura do bloco digestor foi ajustada segundo uma elevação gradual, de acordo com intervalos de 30 min., sendo a inicial 50 °C, a intermediária 100 °C e a final 150 °C. No momento em que se atingiu esta última temperatura foi iniciado a adição lenta de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% (v/v), em porções de 1 mL. Ao fim de cada decomposição, devido à presença de particulado, os digeridos obtidos foram filtrados para balões volumétricos de 25 mL e o volume dos balões foi completado com água ultrapura.

Para a determinação dos analitos nas soluções dos digeridos das amostras e nos extratos obtidos foi empregado o espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES) simultâneo com visão axial VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália). Foram utilizados a câmara de nebulização *Struman-Master* e o nebulizador *V-Groove* como sistema de introdução da amostra. O sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução de referência multielementar o alinhamento da tocha foi realizado com uma solução de Mn 5,0 mg L⁻¹. As linhas espectrais foram selecionadas (Tabela 1) considerando-se as intensidades dos sinais de emissão dos analitos e do sinal de fundo, o desvio padrão das medidas, a sensibilidade adequada para a determinação dos elementos presentes em altas e baixas concentrações nas matrizes, bem como o perfil dos espectros e a possibilidade de interferências. Estão apresentadas na Tabela 1 as condições operacionais do espectrômetro.

Tabela 1 – Parâmetros operacionais de medida do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

Parâmetros operacionais	Condições Instrumentais
Potência de medida (W)	1300
Tempo de integração do sinal (s)	1,0
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,70
Vazão de bombeamento da amostra (mL/min)	0,70
I: linha atômica	Cd II 226,502; Cr II 267,716; Cu I 327,395; Fe II 238,204; Mo II 202,032; Pb II 220,353;
II: linha iônica	Zn I 213,857

Foram aplicados dois métodos recomendados na literatura para avaliar a biodisponibilidade: SBET e PBET. No primeiro, que foi realizado em trabalho anterior, a simulação da digestão foi feita empregando-se 100 mL de fluido extrator, o qual contém glicina a uma concentração de 0,4 mol L⁻¹ em um pH 1,5 ajustado com ácido clorídrico concentrado, a 1g da amostra. A mistura foi então submetida a uma agitação tipo orbital a 30 rpm, por um período de 1h, a uma temperatura constante de 37 °C. Em seguida foi realizada uma filtração através de um filtro de disco de acetato celulose de porosidade 0,45 µm. Já o método PBET, descrito por Navarro et al. (2008), envolve a simulação das condições da digestão gástrica, seguida pela digestão intestinal. Foram utilizadas enzimas, aminoácidos, sais orgânicos e inorgânicos e outros reagentes. A amostra é incubada a 37 °C por 1 h com pepsina em pH 2,5 (simulação da digestão gástrica) e posteriormente, em pH 7,0 com extratos de bile e pancreatina (simulação da digestão intestinal).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos extratos das fases gástricas e intestinais, determinou-se a concentração dos analitos empregando-se ICP OES e os métodos SBET e PBET (Figura 01).

A razão entre o teor total do analito presente na amostra e no filtrado corresponde à bioacessibilidade. Essa relação é então multiplicada por um fator de 100 e o resultado final é expresso em porcentagem de bioacessibilidade (INTAWONGSE e DEAN, 2006).

Considerando o método PBET, foram obtidas concentração de Cu, Fe e Zn no extrato obtido após a fase gástrica e fase intestinal. As concentrações de Cd, Cr, Mo e Pb estavam abaixo do limite de detecção. Em trabalho recente, foram obtidas concentrações de Pb em amostras de feijão carioca variaram entre 4,6 e 6,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (SANTOS, 2008). Estas concentrações estão acima do limite máximo de tolerância (LMT) preconizado pela legislação brasileira para leguminosas *in natura* ou industrializada (0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$) (ANVISA, 2007). No entanto, os níveis foram fixados internacionalmente em 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Pb em leguminosas *in natura* e 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para leguminosas (ervilhas e feijões verdes e ervilhas maduras) processadas (em conserva) (CODEX, 2007). A Figura 1 ilustra a comparação das concentrações dos traços determinados. Observa-se que para as amostras de caupi (CNP1, CNP2 e CNP3) o Zn está presente em maior concentração, seguido do elemento Fe. Já para as amostras de mangalô, observa-se que o Fe está em maior concentração no extrato, quando comparado a Zn e Cu.

A bioacessibilidade de minerais pode variar de menos de 1% para mais de 90%, a depender da espécie química. As razões para essa ampla faixa é variada e complexa, desde que muitos fatores interagem para determinar a bioacessibilidade final de um nutriente. Em adição a tais fatores, em alguns casos, os nutrientes absorvidos podem estar em uma forma que não pode ser metabolizada pelo organismo (FENNEMA et al, 2008).

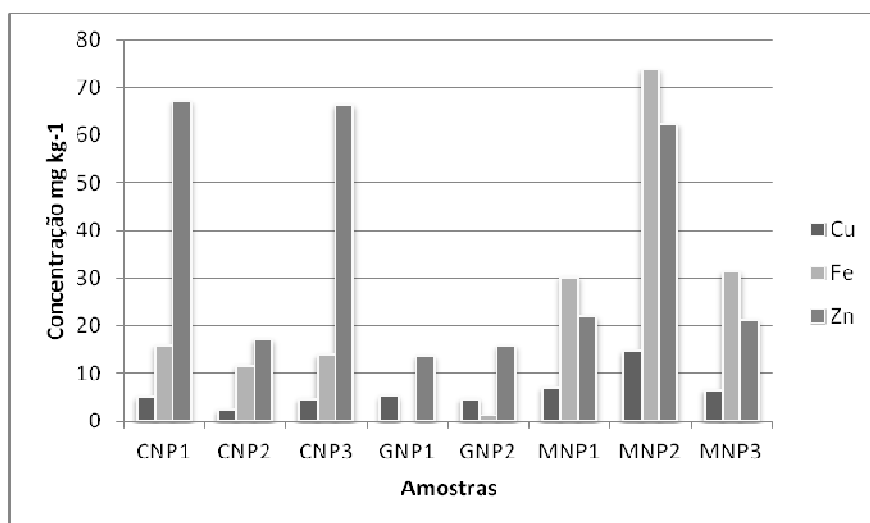


Figura 1 – Concentrações de elementos traço obtidas no extrato intestinal pelo método PBET.

Também foram comparados a extração dos elementos Cu, Fe e Zn, considerando-se os resultados obtidos empregando-se os métodos SBET e PBET. Também são comparadas as concentrações nas fases gástricas e intestinais do método PBET (Figura 2).

Enquanto no SBET o compartimento gástrico é formado por um fluido extrator, o qual contém glicina a uma concentração de 0,4 mol L^{-1} em um pH 1,5 ajustado com ácido clorídrico concentrado, no PBET utiliza-se pepsina, pancreatina e sais de bile. As alterações químicas necessárias para o processo digestivo são conseguidas com auxílio dessas enzimas do trato digestivo, que catalisam a

hidrólise das proteínas nativas em aminoácidos, dos amidos em monossacarídeos e das gorduras em glicerol e ácidos graxos (HARPER et al, 1982). Além das enzimas, são utilizados sais de ácido acético, málico, cítrico e lático, os quais podem atuar como ligantes. Desta forma, espera-se que os teores dos elementos traços presentes nos extratos obtidos, empregando-se o método PBET, sejam inferiores aos obtidos pelo SBET, devido aos efeitos de complexação dos íons metálicos. Ou seja, os percentuais de bioacessibilidade obtidos, empregando-se o método SBET, são superestimados, quando comparados ao PBET. A Figura 2 apresenta claramente esse comportamento para Cu, Fe e Zn.

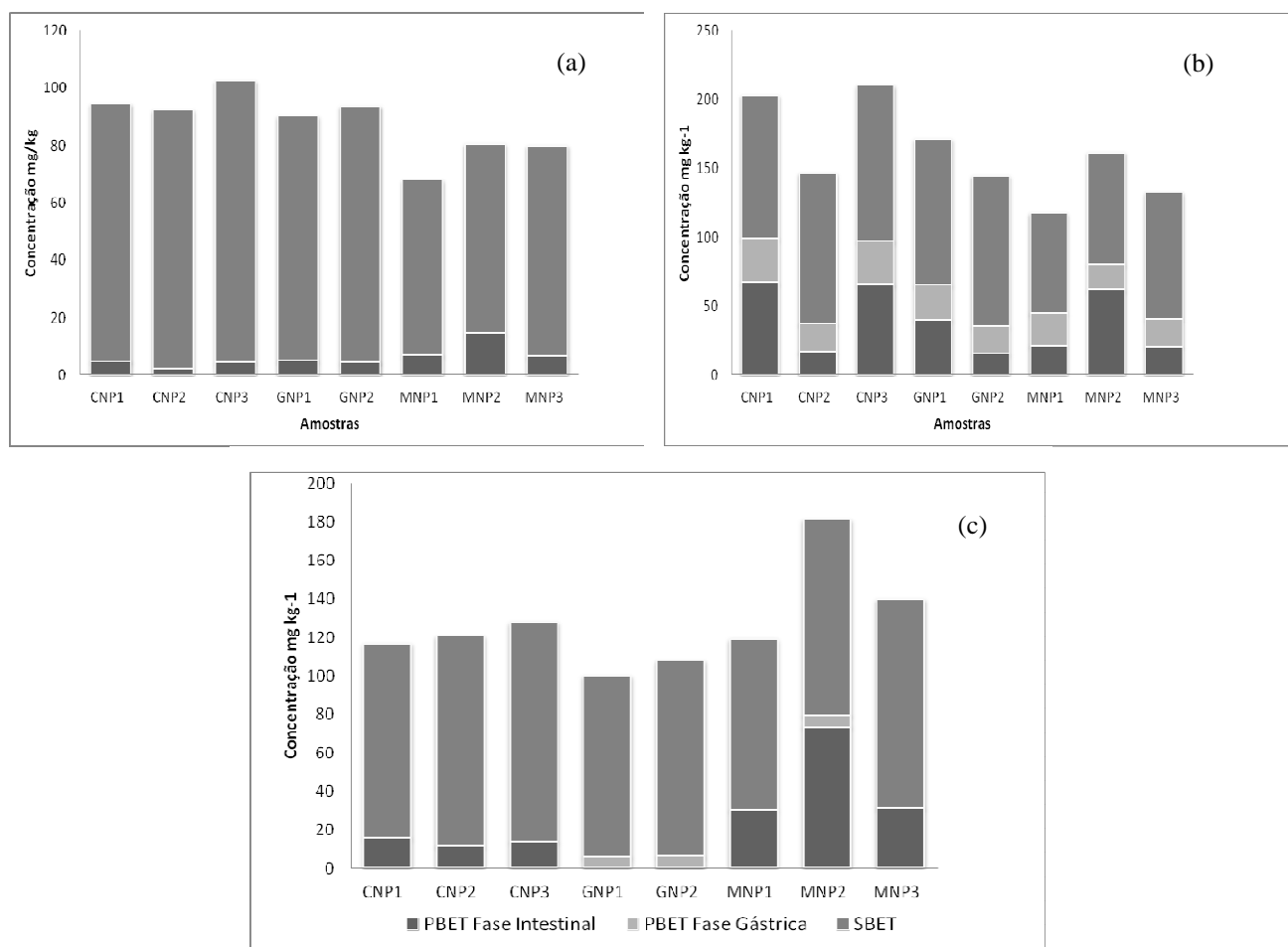


Figura 2 – Comparação das concentrações de elementos traço nas fases gástrica e intestinal obtidas pelo método PBET e fase gástrica, pelo método SBET. (a) concentrações de Cu; (b) concentrações de Zn; (c) concentrações de Fe.

Ambos os métodos desconsideram fatores, tais como: a ação de microorganismos presentes no trato digestivo; a adsorção que ocorrem preferencialmente no epitélio duodenal e a digestão inicial no compartimento bucal (BOSSO e ENZWEILLER, 2008). Apesar disto, admite-se que o PBET é um dos ensaios *in vitro* que simula com maior consistência o processo de digestão no trato gastrointestinal.

Quanto às diferentes espécies de leguminosas investigadas, observa-se comportamento semelhante com relação às extrações dos elementos nas fases. No entanto, quando se compara o comportamento dos elementos, observa-se grande variação.



4. CONCLUSÕES

Conclui-se com os resultados obtidos até o momento que os métodos *in vitro* SBET e PBET fornecem resultados consideravelmente diferentes com respeito às concentrações dos analitos, e desta forma, resultam em respostas distantes de biodisponibilidade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio do CNPq, e a Universidade Federal da Bahia pela utilização de equipamentos.

REFERÊNCIAS

BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaio para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. **Química Nova**, v.31, p. 394-400, 2008.

BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação Geral da Política da Política de Alimentação e Nutrição, 2006, 210p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, maio 2012**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_10_08_49_52_boletim_mai_2012.pdf >. Acesso em: jul. 2012.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3ª Ed. São Paulo: Manole, 2009.
FENNEMA, O. R.; PARKIN, K.; DAMODARAN, S. **Food Chemistry**. 4ª ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

HARPER, H. A, RODWELL, V.W, MAYES, P.A. **Manual de química fisiológica**. 5. Ed. São Paulo: Atheneu, 1982.

INTAWONGSE, M.; DEAN, J. R. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. **Analytical Chemistry**, v.25, n. 9, p 876-886, 2006.

IQBAL, A., KHALIL I. A., ATEEQ N., KHAN M. S. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, v.97, p. 331-335, 2006.

NANO, R.M.W.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, S. L. C.; BACCAN, N.; SOUSA, R. A.; CADORE, S. Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions. **Talanta**, v. 80, p. 559-564, 2009.

NAVARRO, P., ARANA, G., ETXEBARRIA, N., DEAN, J.R.. Evaluation of the physiologically based extraction test as an indicator of metal toxicity in mussel tissue. **Analytica chimica acta**, v. 622, p. 126-132, 2008.

NAYAK, B.; NAIR, M. In vitro bioavailability of iron from wheat flour fortified with ascorbic acid, EDTA and sodium hexametaphosphate, with or without iron. **Food Chemistry**, v. 80, p. 545-550, 2003.

OOMEN, A. G.; HACK, A.; MINEKUS, M.; ZEIJDNER, E.; CORNELIS, S. C.; SCHOETERS G.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T.; WRAGG, J.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A.;



VAN WIJNEN J. H. Comparison of five in-vitro digestion model to study the bioaccessibility of soilcontaminants. **Environment Science Technology**, v.36, p. 3326, 2002.

RUBY, M. V.; DAVIS A.; SCHOOF R.; EBERLE S.; SELLSTONE, C. M. Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. **Environment Science Technology**, v. 30, p. 422-430, 1996.

RUBY, M. V.; SCHOOF R.; BRATTIN W.; GOLDADE M.; POST G.; HARNOIS M.; MOSBY D. E.; CASTEEL S. W.; BERTI W.; CARPENTER M.; EDWARDS D.; CRAGIN D.; CHAPPELL D W. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. **Environment Science Technology**, v. 33, p. 3697–3705, 1999.