

# ARSÊNIO INORGÂNICO EM ARROZ: FUNGOS NATIVOS DA RIZOSFERA COMO AGENTES DE BIORREMEDIAÇÃO.

Fabiana Roberta Segura<sup>1</sup>; Ana Carolina Cavalheiro Paulelli<sup>2</sup>; Gilberto Úbida Leite Braga<sup>3</sup>; Fernando Barbosa Júnior<sup>4</sup>; Walter dos Reis Pedreira Filho<sup>5</sup>; Fábio Ferreira Silva<sup>6</sup>; Bruno Lemos Batista<sup>7</sup>

Palavras-chave: Biotransformação de arsênio, Especificação química, Arroz, HPLC-ICP-MS

## INTRODUÇÃO

Conhecidamente, a presença de arsênio inorgânico ( $As_i$ ) em arroz representa risco considerável à saúde pública, em especial de países asiáticos e no Brasil, grandes consumidores desta commodity. Sendo assim, a comunidade científica ligada a este tema tem procurado formas para o monitoramento da quantidade de  $As_i$  nos grãos (desenvolvimento de técnicas de análises químicas adequadas), bem como formas de mitigação deste risco.

Das formas de mitigação ou remediação abordadas pela literatura, temos técnicas que vão desde a lavagem e cocção (Raab, A.A et al, 2009), até trabalhos com engenharia genética de cultivares de arroz capazes de volatilizar arsênio (Meng, X. Y. et al, 2011). Alguns trabalhos desenvolvidos também relatam a capacidade de microrganismos isolados da rizosfera de arrozais, serem capazes de metilar arsênio (Jia, Y. et al., 2013).

Em um trabalho previamente realizado por nosso grupo, foram isoladas algumas espécies de fungos nativos de rizosfera de arrozais e feito estudo *in vitro* da resistência a exposição ao  $As_i$  e a capacidade de volatilização de arsênio, entre outros fenômenos envolvidos na metabolização deste elemento, conforme rota metabólica de Challenger (Batista et al., 2016). Observamos neste trabalho, que *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. apresentaram resistência a arsênio e capacidade de volatilização.

Sendo assim, neste trabalho, estudamos a capacidade do *Aspergillus* sp. quanto a volatilização de arsênio *in vivo*, isto é, cultivando arroz em presença dos fungos até amadurecimento dos grãos. Após colheita dos grãos, realizamos a determinação de arsênio total por ICP-MS e a determinação da concentração de arsênio inorgânico nos grãos por HPLC-ICP-MS, e comparamos os valores com os valores de cada grupo de controle.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ cm) em todos os experimentos (Gehaka, Master System MS2000, SP, Brasil). Materiais plásticos (Nalgene®), e vidros foram limpos em banho de  $HNO_3$  a 15% (v / v), enxaguados com água ultrapura e depois secos numa cabine de fluxo laminar (Filterflux, Piracicaba, Brasil). A determinação de  $As$  total foi realizada utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS 7900, Agilent, Japão). Para especificação química, um cromatógrafo líquido de alta performance acoplado a um ICP-MS foi utilizado (HPLC 1290, Agilent, EUA e ICP-MS 7900, Agilent, Japão). As soluções padrão multi-elementar (10 mg L<sup>-1</sup> contendo arsênio) foram adquiridas a PerkinElmer, (Shelton, EUA). As espécies de arsênio (para especificação

<sup>1</sup> Doutoranda, Universidade Federal do ABC

<sup>2</sup> Doutoranda, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto

<sup>3</sup> Doutor, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

<sup>4</sup> Doutorando, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

<sup>5</sup> Doutor, Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Ministério do Trabalho e Previdência Social

<sup>6</sup> Doutor, Universidade Federal do ABC

<sup>7</sup> Doutor, Universidade Federal do ABC, Rua Santa Adélia, 09210-170 Santo André, SP, Brasil. bruno.lemos@ufabc.edu.br

ou adição nos vasos de plantas) foram preparadas como descrito por Batista et al. (2011) utilizando reagentes da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Materiais para a cultura de fungos foram esterilizados em autoclave. O preparo das amostras para determinação de arsênio total e para especiação foi realizado em banho termostático (Solab, Piracicaba, Brasil).

Os microrganismos foram isolados do solo conforme nosso trabalho prévio (Batista et al., 2016). Depois do crescimento, a cultura foi removida das placas de petri e homogeneizadas como caldo, cujo alíquotas de 50 mL eram adicionados a cada vaso do experimento.

O cultivo foi realizado em vasos plásticos. Foram feitos dois grupos, cada qual com seu grupo de controle. O solo do Grupo 1, foi exposto ao caldo contendo *Aspergillus* sp. O solo do Grupo 2 recebeu caldo contendo fungo e solução contendo 5 As V mg Kg<sup>-1</sup>. O cultivo dos grãos se deu por 6 meses. A adição de caldo contendo fungos foi feita a cada 30 dias. Após amadurecimento dos grãos, estes foram coletados, descascados, moídos e tamisados (<250µm). Para determinação de arsênio total, foram pesadas 200 mg de amostra de grãos, e adicionado 1 mL de ácido nítrico sub destilado. As amostras foram aquecidas a 85°C. Após digestão as amostras foram avolumadas para 14 mL, filtradas e a determinação de arsênio total foi feita por ICP-MS. Amostras para especiação química de arsênio foram pesadas (200 mg) em tubos de fundo cônico. Foram adicionados 5mL de ácido nítrico 2% (v/v). As amostras foram agitadas vigorosamente e deixadas em pré-extração por 24 horas. Após este tempo, foram colocadas em banho de água a 85°C por 2,5h. Após resfriamento foram avolumadas para 10 ml com água ultrapura e levadas para banho a 85°C por mais 1,5h. As amostras foram filtradas e injetadas no sistema HPLC-ICP-MS. Os dados de arsênio total e da especiação química foram tratados estatisticamente pela utilização do Prism 3.0, teste t, assumindo p<0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Grupo 1 - amostras cultivadas em solo sem fortificação com As (V)

As amostras de arroz foram cultivadas em quadruplicata. Neste grupo de amostras, o solo não foi fortificado com As (V). Em relação a arsênio total as amostras não apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle (Tabela 1). Em contrapartida, a concentração de arsênio trivalente apresentou-se 66% mais baixa do que no grupo controle. Ao analisar os dados de concentração das outras espécies, podemos verificar que As (V) aumentou sua concentração significativamente (54.7±1%), DMA apresentou concentração 21% maior em relação ao grupo controle. Estes dados nos mostram que *Aspergillus* sp. colaborou para a transformação das espécies de arsênio, mas não houve volatilização significativa. A conversão de As III em MMA e DMA e explicada pela rota metabólica de Challenger (1978). Resumidamente, As V e As III entram na célula, As V e convertido em As III e posteriormente e metilado a MMA e DMA, podendo ser metilado a TMAO. As espécies são excretadas pelos fungos e tornam-se disponíveis para absorção pelas raízes do arroz, e, portanto, há acúmulo nos grãos.

**Tabela 1** - concentração de arsênio total e espécies nos grãos de arroz cultivados em presença de *Aspergillus* sp. (média ± desvio padrão).

Amostra*	t-As	As (III)	As (V)	MMA	DMA	NRE
	mg kg <sup>-1</sup>	%	%	%	%	%
ERM BC211 - RICE	330.5 ± 10.9	43.7±4	> LoQ	> LoQ	128.5 ± 2.8	> LoQ
Grupo de controle 1	51.5 ± 10.3	55.8±2.5	> LoQ	29.9±2.4	14.3±0.1	> LoQ
Grupo 1	44.5 ± 3.5	18.6±1.5**	54.7±1**	8.6±0.5	18.1±1.1**	> LoQ
Grupo de Controle 2	498 ± 92.6	18.6±1.7	13.2±0.9	2.3±0.2	60.7±3.2	5.3±0.2
Grupo 2	339 ± 45.4**	15.9±0.4	16.4±1.8	2.3±0.2	61.1±2.5	4±0.4**

**Nota:** \* n=4. \*\* apresentou diferença estatística (teste t, intervalo de confiança de 95%).

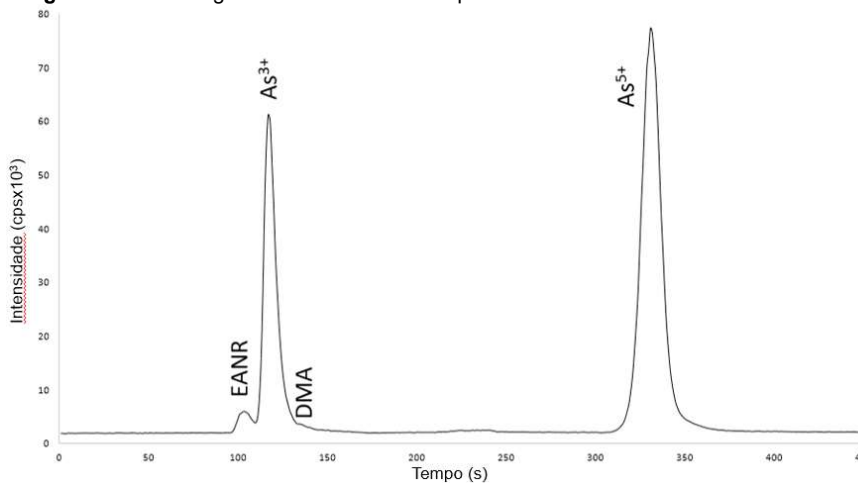
Grupo 1-amostras cultivadas em solo sem adição de arsênio pentavalente. Grupo 2-amostras cultivadas em solo fortificado com arsênio pentavalente. Os grupos de controle não receberam caldo de cultura de *Aspergillus* sp.

#### Grupo 2 - amostras cultivadas em solo fortificado com As (V)

As amostras do grupo 2, apresentaram resultados bastante diferenciados, a começar pelo arsênio total, que se apresentou 32% mais baixo que a concentração de arsênio total no grupo de controle (Tabela 1), indicando que em solos com maior concentração de arsênio, *Aspergillus* sp. tende a volatilizar este elemento.

Em relação as espécies, não houve diferença significativa nas concentrações de As (III), As (V), MMA e DMA. Em contrapartida, conforme a Figura 1, houve o aparecimento de um pico não identificado (EANR) no cromatograma e esse comportamento também foi observado em um estudo anterior feito *in vitro* (Batista et al., 2016). Esta espécie não retida representou  $4\pm 0.4\%$  de todas as espécies encontradas no grupo 2, o que nos serve como indicativo de que acontece biotransformação do arsênio devido ao metabolismo do *Aspergillus* sp., resultando não somente em volatilização, mas também no surgimento de espécies metiladas de arsênio que são absorvidas pelo arroz e acumuladas pelos grãos.

**Figura 1** – Cromatograma de amostra do Grupo 2.



## CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho, mostram que *Aspergillus* sp. resultaram na biotransformação do arsênio em espécies metiladas, (especialmente em solos com maior concentração deste elemento) bem como na volatilização de arsênio. Sendo assim, acreditamos que a utilização de *Aspergillus* sp. isolados da rizosfera de arrozais é um tópico a continuar ser desenvolvido e estudado visando a biorremediação, devido seu baixo impacto ambiental, baixo custo e efetividade, especialmente em solos contendo alta concentração de arsênio.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPESP pelo aporte financeiro. Processo Número: 2015/06674-9.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- R RAAB, Andrea et al. Cooking rice in a high water to rice ratio reduces inorganic arsenic content. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 11, n. 1, p. 41-44, 2009.
- MENG, Xiang-Yan et al. Arsenic biotransformation and volatilization in transgenic rice. **New Phytologist**, v. 191, n. 1, p. 49-56, 2011.
- JIA, Yan et al. Microbial arsenic methylation in soil and rice rhizosphere. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 7, p. 3141-3148, 2013.
- Batista, B. L., et al. A low-cost and environmentally-friendly potential procedure for inorganic-As remediation based on the use of fungi isolated from rice rhizosphere. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Netherland, v.4, n.1, p. 891-898, 2016.

