

AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DAS ESPÉCIES QUÍMICAS DE ARSÊNIO NATURALMENTE PRESENTES EM DIFERENTES CULTIVARES BRASILEIROS

Tatiana Pedron¹; Fábio Ferreira da Silva¹; Ariano Martins Magalhães Jr²; Bruno Lemos Batista¹

Palavras chave: Arroz, Arsênio, Bioacessibilidade, Especificação e HPLC-ICP-MS.

INTRODUÇÃO

Atualmente os principais produtores de arroz são China e Índia. O Brasil é o segundo maior produtor não asiático no mundo, onde a produção se concentra na região sul (CONAB, 2015 e 2015b; FAO, 2015).

O plantio do arroz é anual e ocorre geralmente em regiões úmidas e quentes onde pode ser produzido sob diversas formas de cultivo, sendo considerado dois grandes ecossistemas para a cultura: várzea e de terras altas.

Nos grãos de arroz, elementos essenciais como sódio (Na), cobre (Cu), zinco (Zn) e magnésio (Mg) estão presentes e são fundamentais para humanos e outros seres vivos, pois estão relacionados com a homeostasia.

Elementos não essenciais e potencialmente tóxicos como o As também são encontrados em grãos de arroz em diversas regiões do mundo (BATISTA et al., 2011; MEHARG e ZAHO, 2012), o que pode representar risco à saúde humana.

Quando comparado a outros cereais como, por exemplo, trigo e cevada, os grãos de arroz podem apresentar cerca de 10 vezes mais As (WILLIAMS et al., 2007). A exposição a As através da ingestão de arroz é mais significativa em populações que não estão expostas a altas concentrações de As através água potável (MEACHER et al., 2002; MELIKER et al., 2006; MEHARG e ZHAO, 2012; SUN et al., 2008).

A exposição a As tanto em relação a fontes naturais (atividade vulcânica) quanto antropogênicas (atividade mineradora e uso de praguicidas), em todo o mundo é um fator de risco importante para o desenvolvimento de diversos tipos de doenças, como câncer de pele, pulmão e bexiga, e doenças cardiovasculares (IARC, 2012; MON, 2012).

Arsênio no ambiente e sua relação com o arroz

O As é um metaloide ubíquo que ocorre em vários estados de oxidação (-3, 0, +3 e +5), tanto nas formas orgânicas, quanto inorgânicas, sendo encontrado no solo, na água e em tecidos biológicos. Existem mais de 200 formas de As no ambiente (SMEDLEY e KINNIBURGH, 2001; WHO, 2001). Arsenobetaina e arsenocolina são formas de As orgânico (As-o) que estão presentes geralmente em frutos do mar em altas concentrações. Por outro lado, as formas de As inorgânico (As-i), As³⁺ (arsenito) e As⁵⁺ (arseniato), são predominantes em alimentos terrestres (FRANCESCONI, 2005). Estudos têm sido realizados para determinar as concentrações de As nos alimentos, uma vez que o As é carcinogênico para humanos (WILLIAMS, 2007, FDA, 2011, IARC, 2012).

Estudos demonstram que cultivares de arroz sob condições anaeróbicas (sistema de várzea) absorvem cerca de 4 vezes mais As do que em condições aeróbicas (terras altas) (XU et al., 2008).

Atualmente a concentração As-i recomendável para arroz polido é de 200 µg kg⁻¹, enquanto, em termos de comparação, na água potável é de 10 µg L⁻¹, um valor menor que no arroz devido ao seu alto consumo (WHO, 2008; CAC, 2014). Apesar da atual regulação para o arroz, pouco se sabe ainda sobre a absorção de As ingerido através do arroz.

Bioacessibilidade

O arroz tem sido frequentemente estudado através das concentrações de As, determinando grande parte de suas propriedades toxicológicas, mas pouco se sabe sobre a liberação e absorção do As no sistema digestivo (SCHOOFF et al., 1999; WILLIAMS et al., 2007). A exposição à As é uma questão de interesse mundial e a bioacessibilidade tem um papel importante em pesquisas epidemiológicas (HE et al., 2012).

A bioacessibilidade *in vitro* possibilita uma melhor avaliação sobre exposição oral aos elementos e o risco associados à saúde, simulando geralmente as duas fases da fisiologia gastrointestinal: estomacal e intestinal (NAVARRO-ALARCON e CABRERA-VIQUE, 2008). A bioacessibilidade fornece informações acerca da fração dos elementos e/ou compostos, que são liberados da matriz (alimento) no trato gastrointestinal, tornando-se disponível para absorção intestinal. Esta é considerada a máxima concentração do elemento disponível para absorção (RUBY et al., 1999).

Técnica Analítica

Para análises de elementos traços (<mg kg⁻¹) são necessárias técnicas analíticas de alta sensibilidade e com melhores limites de detecção. Neste contexto se encaixa a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). A ICP-MS é uma técnica que se destaca com excelentes limites de detecção (10⁻⁶ a 10⁻¹⁵), capacidade de determinação da razão isotópica, análise quantitativa e qualitativa, e seletividade (determinação de isótopos). A combinação de um plasma indutivamente acoplado a uma fonte de radiofrequência com o espectrômetro de massas possibilita um analisador elementar e isotópico (WOLF, 2005; THOMAS, 2008). Na ICP-MS as amostras são introduzidas por uma bomba peristáltica e conduzidas até a fonte de plasma, onde os elementos presentes na matriz são atomizados e ionizados. Esses íons são então separados em função da sua razão massa-carga (m/Z) e por fim separadas pelo espectrômetro de massas e detectadas (THOMAS, 2008). Tanto matrizes simples quanto complexas, são facilmente analisadas com o mínimo de interferência devido à alta temperatura do plasma (6000 a 10000 K) (THOMAS, 2008). O ICP-MS é uma importante e poderosa ferramenta analítica, uma vez que é possível a hifenação com outros equipamentos como a cromatografia a gás e cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC), possibilitando assim especificação química de metais em diversos tipos de amostras (ambientais, clínicas, alimentos e farmacêuticas) (FERRARELLO, LA CAMPA e SANZ-MEDEL, 2002; THOMAS, 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e materiais

Utilizou-se água ultrapura (Master All, Gehaka, Brasil) ao longo dos experimentos. Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram armazenadas em garrafas de plástico que foram descontaminadas durante 24 h em banho de ácido a 15% v/v de HNO₃, enxaguadas cinco vezes com água ultrapura e secas em capela de fluxo laminar classe 100 (FilterFlux, São Paulo, SP). Para controle de qualidade, em todos os ensaios foi utilizado o material de referência certificado, a farinha de arroz ERM-BC211, com uma concentração de As total de 260±13 µg kg⁻¹ (IRMM, Geel, Bélgica). Ítrio (Y) a 10 µg L⁻¹ foi utilizado como padrão interno. Todos os ácidos utilizados neste trabalho foram subdestilados (DST-1000, Salvillex, MN, EUA).

Para a determinação dos totais utilizou-se ácido nítrico subdestilado a 65% v/v (Synth, São Paulo, Brasil) e peróxido de hidrogênio a 30% v/v (Fluka, St. Louis, MO, EUA).

Os padrões de As usados para especificação foram, trióxido de arsênio (As³⁺) (99,95%, Sigma, St. Louis, MO, USA), arsenato de sódio heptahidratado dibásico (As⁵⁺) (98%, Sigma, St. Louis, MO, USA), ácido monometilarsônico (MMA) (98,4%, Sigma, St. Louis, MO, USA) e ácido dimetilarsênico (DMA) (99%, Sigma, St. Louis, MO, USA).

1. Mestre. Universidade Federal do ABC, Av. Dos Estados, 5001-Bangú, Santo André – SP, t.pedron@ufabc.edu.br

2. Doutor. Universidade Federal do ABC, Av. Dos Estados, 5001-Bangú, Santo André – SP.

3. Doutor. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Parque Estação Biológica – PqEB- s/nº Brasília, DF.

1. Professor Doutor. Universidade Federal do ABC, Av. Dos Estados, 5001-Bangú, Santo André.

Para a bioacessibilidade foi utilizado HCl subdestilado (37 % v/v, Synth, Brasil), os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) sendo estes a pepsina, sais biliares (glicodeoxicolato de sódio + taurodeoxicolato de sódio + taurocolato de sódio hidratado) pancreatina e NaHCO₃ (3% m/v).

Determinação total de As (As-t)

As amostras de arroz foram moídas e tamisadas, em seguida pesadas cerca de 200 mg de amostra, adicionados 2 mL de HNO₃ subdestilado e pré-digeridas por 24 h a temperatura ambiente. Após a pré-digestão foram adicionados 1 mL de H₂O₂ e realizado a digestão em bloco digestor (EasyDigest®, Analab, Wantzenau, França) por 4h a 80°C. Ao fim, foram arrefecidas e completadas com 50 mL de água ultrapura e analisadas por ICP-MS (Agilent, Hachioji, Japão).

Determinação da fração bioacessível do As

A avaliação *in vitro* da bioacessibilidade foi realizada de acordo com Bertin *et al.*, 2016 e com a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, 2000). Para o fluido gástrico dissolveu-se 0,32 g de pepsina com 0,7 mL de HCl a 12 mol L⁻¹, seguido da adição de água deionizada para um volume de 100 mL, sendo que a pepsina foi previamente diluída em água deionizada antes da adição do HCl. Em seguida o pH foi ajustado para 1,2 utilizando uma solução de HCl (0,1 mol L⁻¹). Então em 200 mg de amostras de arroz foram adicionados 3 mL de fluido gástrico, em seguida as amostras foram colocadas em uma incubadora rotativa (SL 233, Solab, Brasil) a 37°C por 2 h. Após o período de 2 h adicionou-se 3 mL de fluido intestinal as amostras, onde foram incubadas a 37°C por mais 2 h. Para o preparo da solução intestinal foram solubilizados 0,2 g de sais biliares (0,08 g de glicodeoxicolato de sódio + 0,05g de taurodeoxicolato de sódio + 0,08g de taurocolato de sódio hidratado) e 0,5 g pancreatina em uma solução de NaHCO₃ (3% m/v) para 100mL. Por fim, as amostras foram arrefecidas a temperatura ambiente e em seguida centrifugadas (SL700, Solab, Brasil) a uma velocidade de 1077 g por 20 min. Os sobrenadantes desta etapa foram separados dos precipitados e separados uma alíquota a qual foi submetida a digestão para a determinação dos totais de acordo com método mencionado anteriormente. Os resultados analíticos obtidos através deste método foram aceitáveis entre a respectiva especificação e a totalidade da recuperação do arsênio com outros métodos de extração.

Determinação das espécies de As na fração bioacessível (sobrenadante)

A especiação de As foi realizada utilizando um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC) Infinity II 1290 (Agilent, Hachioji, Japão) equipado com uma coluna de troca iônica Hamilton PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, EUA) hífenado ao ICP-MS. Para a análise uma alíquota da fração bioacessível (sobrenadante) foi filtrada (filtro de celulose de 0,20 µm, Sartorius, Göttingen, Alemanha), diluída em água ultrapura (1+1) e injetada no HPLC-ICP-MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Arsênio total no arroz

As amostras de arroz integral de diversos cultivares foram coletadas em 2015 no estado do Rio Grande do Sul. As concentrações totais de As entre os cultivares variaram de 346,1±12,6 à 542,8±22,9 µg kg⁻¹ (média de 440,8 µg kg⁻¹) (Tabela 1). O cultivar que apresentou menor concentração foi o cultivar A, já o com maior concentração foi o cultivar H. As variações das concentrações de As-t é comparável a estudos anteriores. Estes valores estão bem próximos daqueles obtidos por Batista *et al.* (2011) encontrados em arrozes integrais do Rio Grande do Sul, que foram de 270,7 e 427,7 µg kg⁻¹. Já para o estado de São Paulo foi encontrado uma concentração de 346,9 µg kg⁻¹. Narukawa *et al.* (2014) encontraram uma concentração de As-t de 239 µg kg⁻¹ em 4 amostras de arrozes integrais de seis diferentes áreas do Japão. He *et al.* (2012) encontraram em 11 amostras adquiridas em Nova York uma concentração variando de 150 à 850 µg kg⁻¹.

As concentrações encontradas neste estudo para os arrozes integrais estão bem próximas. No entanto, os cultivares E, H e I possuem as maiores concentrações, 485,3, 542,8 e 536,2 µg kg⁻¹, respectivamente. Essas concentrações de As no arroz podem ser influenciadas por diversos fatores como, por exemplo, a água de irrigação e o solo. Segundo Abedin *et al.* (2002), a aplicação de água de irrigação com significante concentração de As é um fator antropogênico que contabiliza uma alta concentração de As no solo de cultivares de arroz o que pode conduzir uma acumulação elevada de As no arroz.

Espécies bioacessíveis de As

A Tabela 1 reporta também as espécies de As das 9 amostras de arroz integral que foram submetidas a simulação gastrointestinal. Em todas as amostras foram detectadas as espécies de As³⁺, As⁵⁺ e DMA. Na Figura 1 estão os cromatogramas de 3 amostras que apresentaram maiores concentrações (cultivares G, C e I).

Os percentuais de As-i foram de 23,5 a 68,5%, já os percentuais de As-o variaram de 31,5 a 76,5 %, o que pode indicar uma maior absorção de As-o em relação ao As-i por esses cultivares de arrozes integrais.

Em relação as concentrações para As³⁺, estes variaram de 18,2±3,6 a 124,6±12,7 µg kg⁻¹. Estes valores estão bem próximos dos encontrados por He *et al.* (2012), onde as concentrações para o As³⁺ bioacessível em amostras de arroz integrais adquiridos em Nova York variaram de 70 a 110 µg kg⁻¹, os quais representam um percentual de As-i variando de 37 a 73 %.

As concentrações de As⁵⁺ bioacessível variaram de 60,1±35,7 a 146,2±15,3 µg kg⁻¹. He *et al.* (2012) detectaram para o As⁵⁺ concentrações variando de 20 a 60 µg kg⁻¹, o que distam dos valores aqui determinados, onde o percentual de As-o bioacessível foi de 27 a 63% nessas amostras.

Meharg *et al.* (2008) encontrou em arrozes brancos uma porcentagem de As-i relativo a ~55% em comparação ao arrozes integrais, que tiveram um percentual ~65% de As-i. Isso se deve ao fato do farelo concentrar maiores quantidades de As-i (camada superficial do arroz), cerca de 10% mais elevadas de As-i quando comparado a grãos de arrozes brancos (SUN *et al.*, 2008; MEHARG *et al.*, 2008).

A única espécie bioacessível detectada para As-o foi DMA, onde as concentrações variaram de 84,3±7,0 a 383,6±26,6 µg kg⁻¹. Valores encontrados por Trenary *et al.* (2012) para As-o bioacessível em amostras de arroz integrais variaram de 11 a 40 µg kg⁻¹, onde os percentuais de DMA foram entre 8,4 a 14%.

Tabela 1. Concentração total e especiação da fração bioacessível para As em arrozes integrais

| Cultivar | As total | | Espécies bioacessíveis de As | | | | |
|----------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|-------|-------|
| | As-t µg kg ⁻¹ | As ³⁺ µg kg ⁻¹ | As ⁵⁺ µg kg ⁻¹ | DMA µg kg ⁻¹ | Soma das espécies | As-i% | As-o% |
| BC211 | 253,9±3,6 | 18,2±3,6 | 129,3±25,8 | 146,5±29,3 | 294,15 | 50,18 | 49,82 |
| A | 346,1±12,6 | 92,1±5,2 | 80,4±4,0 | 163,4±11,9 | 353,17 | 48,87 | 51,13 |
| B | 346,6±46,8 | 94,3±3,5 | 89,1±7,9 | 84,3±7,0 | 267,92 | 68,50 | 31,50 |
| C | 431,2±50,3 | 79,5±6,9 | 146,2±15,3 | 209,6±21,0 | 435,38 | 51,85 | 48,15 |
| D | 415,2±10,4 | 73,1±4,8 | 60,1±35,7 | 142,2±34,5 | 275,58 | 48,40 | 51,60 |
| E | 485,3±29,6 | 117,7±25,5 | 86,1±9,7 | 194,2±3,9 | 398,13 | 51,20 | 48,80 |
| F | 380,7±16,9 | 106,8±6,5 | 92,5±9,0 | 186,6±13,4 | 386,05 | 51,66 | 48,34 |
| G | 483,3±28,1 | 124,6±12,7 | 83,4±10,8 | 340,1±35,1 | 548,17 | 37,95 | 62,05 |
| H | 542,8±22,9 | 107,5±22,7 | 103,5±10,7 | 335,3±26,65 | 546,50 | 38,63 | 61,37 |
| I | 536,2±34,9 | 50,9±69,0 | 67,0±9,4 | 383,6±26,6 | 501,63 | 23,52 | 76,48 |

As concentrações totais e a fração bioacessível das espécies foram representadas pela $x \pm 2\sigma$ (média ± desvio padrão), n=3.

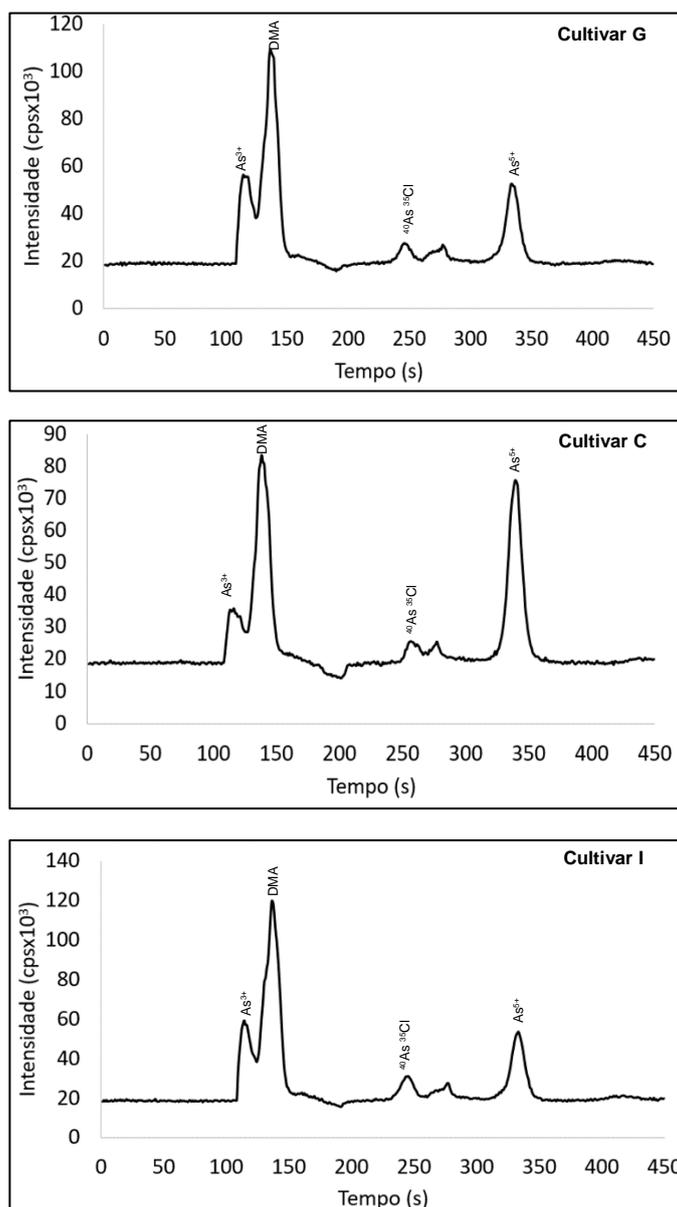


Figura 1. Cromatograma de três amostras que apresentaram maiores concentrações (cultivares G, C e I).

CONCLUSÃO

O arroz é um alimento básico importante no Brasil e para o mundo. Este estudo teve por finalidade avaliar as espécies bioacessíveis de As em arroz integrais de cultivar específico do Rio Grande do Sul. Os resultados indicam uma maior concentração das espécies bioacessíveis de As-o (31,5 - 76,5 %) em relação ao As-i (23,5 - 68,5%). Essas informações fornecem um melhor entendimento a respeito à exposição as espécies de As através da ingestão de arroz e seus possíveis riscos, o que reduz as incertezas na estimativa à exposição e fornecem dados para legislação para a segurança de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Universidade Federal Do ABC pelo apoio financeiro e bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDIN, Md Joinal; COTTER-HOWELLS, J.; MEHARG, Andy A. Arsenic uptake and accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) irrigated with contaminated water. **Plant and Soil**, v. 240, n. 2, p. 311-319, 2002.

BATISTA, B. L. et al. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. *Journal of hazardous materials*, v. 191, n. 1, p. 342-348, 2011.

BERTIN, Renata Labronici et al. Mineral composition and bioaccessibility in *Sarcocornia ambigua* using ICP-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 47, p. 45-51, 2016.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION- CAC. Report of the Eighth Session of the Codex Committee on Contaminants in Food; The Hague, The Netherlands; 31 March–4 April 2014. Rep14/CF. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. A campanha da safra brasileira de grãos. V. 2 – Safra 2014/2015, n.4 – Quarto Levantamento-Brasília. 2015.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- Conab. A cultura do arroz. 180 folhas, 2015b.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rice Market Monitor. Production International Trade Rice Utilization And Domestic Prices, v. XVIII, n. 3, 2015.

FERRARELLO, C.; DE LA CAMPA, M. Fernández; SANZ-MEDEL, A. Multielement trace element speciation in metal-biomolecules by chromatography coupled with ICP– MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 373, n. 6, p. 412-421, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA [internet] 2016. FDA Statement on Proposed Action Level for Inorganic Arsenic in Infant Rice Cereal. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Metals/ucm367263.htm>>.

FRANCESCONI, Kevin A. Current perspectives in arsenic environmental and biological research. **Environmental Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 141-145, 2005.

PHARMACOPEIA, United States. National formulary. **USP**, v. 23, n. 18, p. 2146-59, 2000.

HE, Yi et al. Bioaccessibility of arsenic in various types of rice in an in vitro gastrointestinal fluid system. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 2, p. 74-80, 2012.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS et al. Arsenic, metals, fibres, and dusts. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 100, n. Pt C, p. 11, 2012.

MEACHER, D. M. et al. Estimation of multimedia inorganic arsenic intake in the US population. *Human and Ecological Risk Assessment*, v. 8, n. 7, p. 1697-1721, 2002

MEHARG, Andrew A. et al. Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 4, p. 1051-1057, 2008.

MEHARG, A. A.; ZHAO, Fang-Jie. *Arsenic & rice*. Springer Science & Business Media, 2012.

MELIKER, J. R. et al. Major contributors to inorganic arsenic intake in southeastern Michigan. *International journal of hygiene and environmental health*, v. 209, n. 5, p. 399-411, 2006.

MOON, Katherine; GUALLAR, Eliseo; NAVAS-ACIEN, Ana. Arsenic exposure and cardiovascular disease: an updated systematic review. *Current atherosclerosis reports*, v. 14, n. 6, p. 542-555, 2012.

NARUKAWA, Tomohiro et al. Determination of sixteen elements and arsenic species in brown, polished and milled rice. **Analytical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 245-250, 2014.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. *Science of the total environment*, v. 400, n. 1, p. 115-141, 2008.

RUBY, M. V. et al. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science & Technology*, v. 33, n. 21, p. 3697-3705, 1999

SCHOOFF, R. A. et al. A market basket survey of inorganic arsenic in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 8, p. 839-846, 1999.

SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. **Applied geochemistry**, v. 17, n. 5, p. 517-568, 2002.

SUN, Guo-Xin et al. Inorganic arsenic in rice bran and its products are an order of magnitude higher than in bulk grain. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 19, p. 7542-7546, 2008.

THOMAS, Robert. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRC press, 2013.

TRENARY, Heather R. et al. An in vitro assessment of bioaccessibility of arsenicals in rice and the use of this estimate within a probabilistic exposure model. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 22, n. 4, p. 369-375, 2012.

WILLIAMS, Paul N. et al. Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environmental Science & Technology*, v. 41, n. 19, p. 6854-6859, 2007.

WOLF, R. E. *What is ICP-MS? and more importantly, what can it do*. US Geological Survey, 2005.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for drinking-water quality: incorporating first and second addenda to third edition*, Vol. 1, Recommendations. 2008.

XU, X. Y. et al. Growing rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 15, p. 5574-5579, 2008