



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

A INFLUÊNCIA DAS PRÁTICAS CULTURAIS NOS NÍVEIS DE NITRATOS EM VEGETAIS

MÓNICA ALEXANDRA MADEIRA MARQUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo  
Doutora Ana Cristina Pinto Agulheiro Santos  
Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

ORIENTADOR

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres  
Ferreira

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

A INFLUÊNCIA DAS PRÁTICAS CULTURAIS NOS NÍVEIS DE NITRATOS EM VEGETAIS

MÓNICA ALEXANDRA MADEIRA MARQUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres

Doutora Ana Cristina Pinto Agulheiro Santos

Ferreira

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

2012

LISBOA

## **Agradecimentos**

Ao Senhor Engenheiro Domingos Bastos, que me acolheu no Grupo Jerónimo Martins permitindo a realização desta dissertação. Agradeço todo o apoio e interesse prestado e a constante partilha de conhecimentos. Agradeço igualmente toda a disponibilização de recursos humanos e financeiros fundamentais à execução deste trabalho.

À Engenheira Susana Fernandes do Grupo Jerónimo Martins agradeço o incansável apoio, e as horas dedicadas a este projecto. Por todas as palavras de incentivo e amizade.

À Professora Doutora Marília Ferreira por ter aceite a orientação deste trabalho, agradeço as palavras de incentivo, de confiança e a partilha de conhecimentos.

A todos os fornecedores e produtores de hortícolas envolvidos neste projecto, agradeço a total disponibilidade e apoio prestado, fundamentais à execução deste trabalho.

À Engenheira Maria Andrade, agradeço a incansável ajuda na implementação e acompanhamento do projecto, a constante partilha de conhecimentos.

À Doutora Cristina Tendinha e ao Pedro Cabanita, agradeço toda a dedicação à implementação do projecto.

À Professora Isabel Neto Fonseca, agradeço todos os ensinamentos transmitidos e a incansável ajuda na recta final do trabalho, as horas dedicadas a este estudo.

Ao Professor Doutor Ernesto Vanconcelos agradeço o seu interesse e apoio.

Aos meus pais e ao Diogo, por sempre acreditarem em mim e estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis. O vosso apoio foi imprescindível.

## Resumo

Alguns vegetais, nomeadamente espinafres e alfaces, apresentam uma elevada capacidade em acumular nitratos, e é conhecido que o excesso de consumo deste ião pode ter implicações na saúde humana.

Neste contexto, pretendeu-se determinar alguns factores que possam influenciar o teor de nitratos em alfaces e espinafres, para que seja possível, no futuro próximo, ter algum controlo sobre esse teor.

Inicialmente realizou-se um ensaio de armazém com espinafre, para determinar se o tamanho do caule dos espinafres teria influência no teor de nitratos.

Numa segunda fase, foram realizados três ensaios de campo de espinafre e dois ensaios de campo de alface. Pretendeu-se avaliar a influência de culturas em estufa *versus* ar livre, adubo de libertação controlada *versus* adubo convencional, quantidade de adubo colocada, hora da colheita e espinafre inteiro *versus* folha de espinafre.

Dos resultados obtidos pode concluir-se que nenhuma das amostras de vegetais recolhidas atingiu os limites máximos estabelecidos na legislação. Constatou-se que as folhas de espinafre apresentam menor teor de nitratos que os espinafres inteiros. Concluiu-se também que a cultura de espinafre em estufa apresenta teores de nitratos superiores comparativamente à cultura de espinafre em ar livre.

Propõe-se o aprofundar do conhecimento dos efeitos de práticas culturais, bem como do metabolismo dos nitratos e seus efeitos no homem, de modo a garantir melhor obtenção de rendimento das culturas sem pôr em risco a segurança alimentar dos consumidores.

Palavras-chave: Nitratos, alface, espinafre

## **Abstract**

Some vegetables like lettuce and spinach have a high capacity to accumulate nitrates, and we know that the excess of consumption of this ion may have implications for human health. It was intended to determine some factors that might influence the nitrate content in lettuce and spinach.

Initially was performed a trial in storage with spinach to determine if the size of the spinach stalk would influence the nitrate content.

In the second phase, there were three field experiments of spinach and two field experiments of lettuce. It was intended to evaluate the influence of: greenhouse crops versus outdoors, release controlled fertilizer versus conventional fertilizer, amount of fertilizer placed, time of harvest and spinach versus leaf spinach.

From the results it can be concluded that none of the samples collected reached the maximum limits established by law. It was found that spinach leaves have lower nitrate content than spinach integers. It was further concluded that the spinach culture present in the greenhouse show higher levels of nitrates than the culture carried out in open air.

In order to understand the effects of cultural practices as well as the metabolism of nitrates and its effects on man, further studies must be made to ensure the best crops without jeopardizing food safety.

Keywords: Nitrates, lettuce, spinach

## Índice

Agradecimentos.....	3	
Resumo .....	ii	
Abstract .....	iii	
Índice de figuras .....	vi	
Índice de tabelas .....	vii	
Lista de Abreviaturas.....	viii	
1	Introdução.....	1
1.1	Generalidades .....	1
1.2	Nitratos e os vegetais .....	2
1.3	Factores que influenciam a concentração de nitratos em vegetais .....	5
1.3.1	Fertilização .....	5
1.3.2	Luminosidade e hora da colheita .....	6
1.3.3	Tipo de cultura.....	6
1.4	Legislação e teor máximo de contaminantes .....	7
1.5	Ingestão de nitratos .....	8
1.6	Toxicidade e efeitos no homem .....	9
1.6.1	Metahemoglobinémia infantil.....	10
1.6.2	Efeitos cancerígenos .....	10
1.7	Consumo diário admissível de nitratos .....	11
1.8	Alface.....	11
1.9	Espinafre .....	13
1.9.1	Presença de nitratos no caule de espinafres .....	14
1.10	Objectivos .....	15
2	Material e métodos .....	16
2.1	Ensaio de corte de caules de espinafre em armazém .....	16
2.1.1	Amostragem .....	17
2.1.2	Doseamento do ião Nitrato.....	18
2.2	Ensaio de campo para pesquisa de nitratos em alfaces e espinafres.....	18
2.2.1	Localização dos ensaios .....	18
2.2.2	Características dos solos e águas de rega .....	19
2.2.3	Plantas e sementes .....	19
2.2.4	Aubos .....	19
2.2.5	Delineamento experimental.....	20
2.2.5.1	Ensaio em Aruil/estufa - espinafre e alface.....	21
2.2.5.2	Ensaio em Calvos/estufa - espinafre.....	23
2.2.5.3	Ensaio em Tourinha/estufa - alface.....	24
2.2.5.4	Ensaio em Aruil/ar livre - espinafre .....	26
2.2.6	Amostragem .....	26

2.2.7	Doseamento do ião Nitrato.....	27
2.3	Tratamento estatístico .....	27
3	Resultados e discussão.....	28
3.1	Ensaio de corte de caules de espinafre em armazém .....	28
3.2	Resultados de análises de solos no ensaio de campo .....	30
3.3	Resultados de análises de águas de rega no ensaio de campo .....	31
3.4	Ensaio de campo para pesquisa de nitratos em alfaces e espinafres .....	31
4	Considerações finais .....	39
5	Bibliografia .....	41
ANEXO I	.....	46
ANEXO II	.....	49

## Índice de figuras

Figura 1 - Ciclo de azoto .....	2
Figura 2 - Esquema da assimilação do azoto nas raízes e folhas das plantas .....	4
Figura 3 - Metabolismo dos nitritos e nitratos no homem .....	9
Figura 4 - Fórmula da reacção dos nitritos com hemoglobina .....	10
Figura 5 - Alface “Bola de manteiga” (original) .....	12
Figura 6 - Alface “Batávia” (original).....	12
Figura 7 - Espinafre (original).....	13
Figura 8 - Fotografia representativa do corte de folhas de espinafre (A) e do corte de espinafres inteiros (B) (original) .....	17
Figura 9 - Esquema de modalidades de adubação em espinafre na estufa em Aruil .....	21
Figura 10 - Esquema de modalidades de adubação em alface na estufa em Aruil .....	22
Figura 11 - Adubação a lanço na parcela de espinafre em Aruil/estufa (A). Parcela de alface em Aruil/estufa (B) (original).....	23
Figura 12 - Esquema de modalidades de adubação em espinafre na estufa em Calvos .....	23
Figura 13 - Sementeira na parcela de espinafre em Calvos/estufa (A). Parcela de espinafre em Calvos/estufa (B) (original).....	24
Figura 14 - Esquema de modalidades de adubação em alface na estufa em Tourinha .....	25
Figura 15 - Adubação de fundo na parcela de alface em Tourinha/estufa (A). Parcela de alface Tourinha/estufa (B) (original).....	25
Figura 16 - Esquema de modalidades de adubação em espinafre em ar livre em Aruil .....	26
Figura 17- Distribuição dos valores médios do teor de nitratos (mg/kg) e respectivas barras de erro por produtor e produto (espinafre inteiro/espinafre folhas) .....	28
Figura 18 - Distribuição dos valores médios do teor de nitratos (mg/kg) e respectivos intervalos de confiança de 95% por produto (espinafre caules/espinafre folhas) .....	29
Figura 19 - Distribuição dos valores médios do teor de nitratos (mg/kg) e respectivos intervalos de confiança de 95% por tipo de adubo e período de colheita nos diferentes produtos .....	34
Figura 20 - Distribuição dos valores médios do teor de nitratos (mg/kg) e respectivas barras de erro por tipo de adubo e produto (espinafre inteiro/espinafre folhas) .....	36



## Índice de tabelas

Tabela 1 - Teor em nitratos ( $\text{mg NO}_3^-/\text{kg}$ ) em vegetais.....	7
Tabela 2 - Teores máximos de resíduos de $\text{NO}_3^-$ ( $\text{mg/kg}$ ) permitidos em alfaces e espinafres.....	8
Tabela 3 - Estimativas de origem de nitratos ingeridos com a alimentação.....	8
Tabela 4 - Fornecedores envolvidos no projecto .....	16
Tabela 5 - Dados sobre os espinafres utilizados no ensaio .....	18
Tabela 6 - Localização das parcelas utilizadas no ensaio .....	18
Tabela 7 - Espinafres e alfaces utilizadas no ensaio .....	19
Tabela 8 - Informações relativas aos adubos utilizados nos ensaios de espinafre .....	20
Tabela 9 - Informações relativas aos adubos utilizados nos ensaios de alfaces .....	21
Tabela 10 - Resultados de análises de solos .....	30
Tabela 11 - Resultados de análises de águas de rega.....	31
Tabela 12 - Informações relativas às amostras de espinafres recolhidas para o estudo .....	32
Tabela 13 - Informações relativas às amostras de alfaces recolhidas para o estudo .....	33

## Lista de Abreviaturas

ADI	<i>Acceptable daily intake</i>
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GOGAT	<i>Glutamato sintetase</i>
GS	<i>Glutamina sintetase</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
JECFA	<i>Joint Expert Committee of the Food and Agriculture</i>
mtHb	Metahemoglobinemia
N <sub>2</sub>	Azoto
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	lão amónio
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	lão nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	lão nitrato
NOC	Compostos do tipo N – nitroso
NPK	Azoto, fósforo, potássio
OMS	Organização Mundial de Saúde
oxyHb	Oxihemoglobina
EU	<i>European Union</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

# 1 Introdução

## 1.1 Generalidades

Segurança alimentar é um conceito que se encontra cada vez mais relacionado com a evolução das sociedades e as alterações dos hábitos alimentares dos consumidores. Actualmente existe a tendência da procura e consumo de alimentos isentos de contaminantes e de resíduos tóxicos. O consumo de hortaliças, devido ao seu baixo teor calórico e elevado valor nutricional, tem vindo a retomar o seu lugar na mesa dos portugueses.

O azoto é um dos principais nutrientes que influenciam a produção de hortícolas (Rodrigues, 2006). A deficiência deste componente condiciona a produção e composição dos diferentes tecidos vegetais, mas em excesso pode ser prejudicial para o consumidor e para o meio ambiente. Devido à baixa eficiência do azoto utilizado para este tipo de culturas, existe um grande risco de poluição de águas subterrâneas. A fertilização excessiva pode levar a que na porção comestível dos hortícolas se atinjam teores de nitratos muito superiores aos recomendados para o consumo humano (Ramos, 2001).

Sendo a produtividade o grande gerador na sustentabilidade da economia, o homem tende a interferir nas condições de desenvolvimento e crescimento dos vegetais, tentando obter o maior lucro da produção. Assim, geralmente são adicionadas grandes quantidades de azoto aos solos com o intuito de fertilizar as culturas de hortícolas, em prol da produtividade.

As hortaliças são as mais susceptíveis a esta contaminação, principalmente em espinafre e alface. Estes vegetais são de facto, dos mais preocupantes por serem os mais propensos a acumular nitratos e pela sua importância relativa na dieta humana, factores que terão levado ao estabelecimento de concentrações máximas admitidas por Lei.

Têm sido desenvolvidos diversos estudos tendo em vista minimizar a acumulação de nitratos em vegetais, tentando esclarecer que factores possam estar na origem da acumulação de nitratos, de modo a permitir aos produtores melhores práticas, boas rentabilidades e garantir a segurança alimentar nestes produtos. Neste contexto, é objectivo deste trabalho perceber os factores que possam influenciar a quantidade de nitratos presentes em alfaces e espinafres, no campo e em armazém, tendo em vista a implementação de práticas culturais que minimizem a sua acumulação nos vegetais.

## 1.2 Nitratos e os vegetais

O processo pelo qual o azoto circula através das plantas e do solo, pela acção de organismos vivos, é conhecido como ciclo do azoto (Figura 1). O azoto encontra-se presente na biosfera de diversas formas, não estando disponível directamente para as plantas. Este nutriente faz parte da clorofila, das proteínas, dos ácidos nucleicos, estando directamente envolvido na fotossíntese.

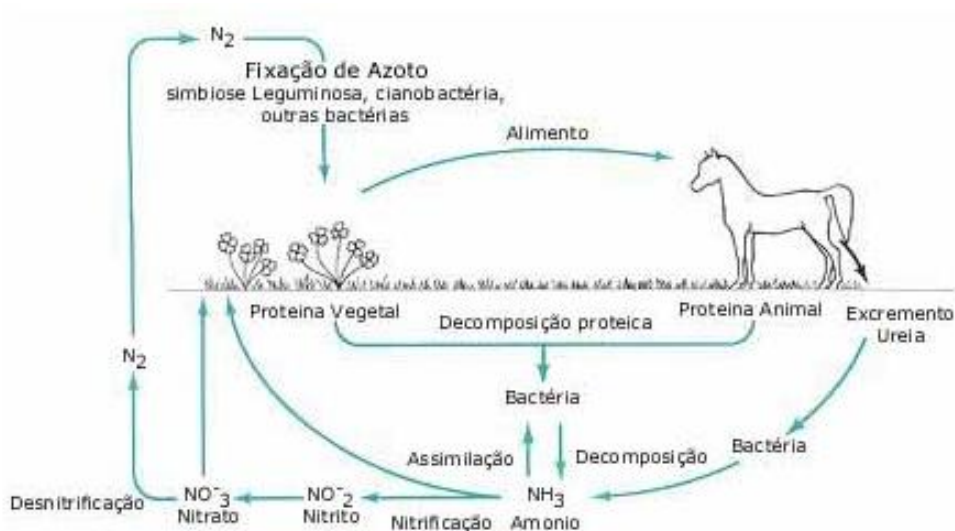


Figura 1 - Ciclo de azoto (Adaptado de: <http://naturlink.sapo.pt/Natureza-e-Ambiente/Gestao-Ambiental/content/Alteracoes-antropogenicas-do-ciclo-do-azoto/section/2?bl=1>)

As plantas conseguem absorver azoto principalmente, sob a forma de iões amónio ( $NH_4^+$ ) e iões nitrato ( $NO_3^-$ ), compostos que são obtidos através de vários processos tais como a fixação e nitrificação do azoto atmosférico (López *et al.*, 1998; Luciński, Polcyn & Ratajczak, 2002).

A fixação é o processo através do qual o azoto é capturado da atmosfera em estado gasoso ( $N_2$ ) e convertido em formas úteis para outros processos químicos, tais como amoníaco ( $NH_3$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ) e nitrito ( $NO_2^-$ ). A fixação biológica ocorre através de bactérias *Rhizobium*, numa relação de simbiose com algumas plantas (leguminosas), permitindo a captura de azoto atmosférico e a sua conversão em amoníaco. A simbiose é estabelecida quando as plantas consomem o amoníaco, que é produzido pelas bactérias que vivem nas suas raízes (Martínez-Espinosa *et al.*, 2011).

O termo nitrificação refere-se à oxidação do amoníaco, um processo que converte amoníaco em nitratos, através de bactérias nitrificantes presentes nos solos. Existem dois tipos de bactérias envolvidas: as *Nitrosomonas*, que convertem o ião amónio a ião nitrito, e as *Nitrobacter*, que convertem o ião nitrito a ião nitrato (López *et al.*, 1998).

Os nitratos ocorrem naturalmente fazendo parte do ciclo do Azoto. Considerados a mais importante fonte de azoto mineral para as plantas, são um dos principais constituintes das plantas, que são incorporados em proteínas e nucleótidos (Forde, 2000; Santamaria, 2006, EFSA, 2008). O processo pelo qual as plantas reduzem os nitratos e os incorporam em moléculas orgânicas denomina-se assimilação dos nitratos e envolve as etapas de absorção, redução dos nitratos a amoníaco e conversão em formas orgânicas de azoto (Maldonado, Agüera & Vicente, 2000).

As plantas adquirem os nitratos provenientes do solo por absorção, através da membrana plasmática da epiderme e das células da raiz, podendo acumular nos seus tecidos concentrações de nitratos excessivas relativamente às quantidades necessárias ao desenvolvimento da planta. Esta acumulação pode ser vista como uma vantagem evolutiva, permitindo às plantas manter as suas capacidades vegetativas em épocas de carência do nutriente (Forde, 2000; Rodrigues, 2006).

A absorção dos nitratos pode seguir diversas vias na planta: i) efluxo dos nitratos, mantendo elevadas concentrações junto à superfície radicular; ii) redução na raiz; iii) transporte através do xilema até às folhas, sendo aí armazenados nos vacúolos ou reduzidos no citosol. De facto, cerca de 90% dos nitratos absorvidos são transportados para as folhas e armazenados em vacúolos, podendo ser libertados à medida que as necessidades nutricionais da planta assim o exigam (Forde, 2000).

O ião nitrato para ser incorporado nas plantas tem que ser reduzido a ião amónio, que é catalizado por duas enzimas (Figura 2). O ião nitrato é primeiro reduzido a nitrito, pela *nitrato redutase* no citosol, e subsequentemente é reduzido a ião amónio pela *nitrito redutase*, nos cloroplastos (Rodrigues & Coutinho, 1995; Forde, 2000). O ião amónio é, posteriormente, incorporado em aminoácidos pelas enzimas *glutamina sintetase* (GS) e *glutamato sintetase* (GOGAT), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos (Bredemeier & Mundstock, 2000).

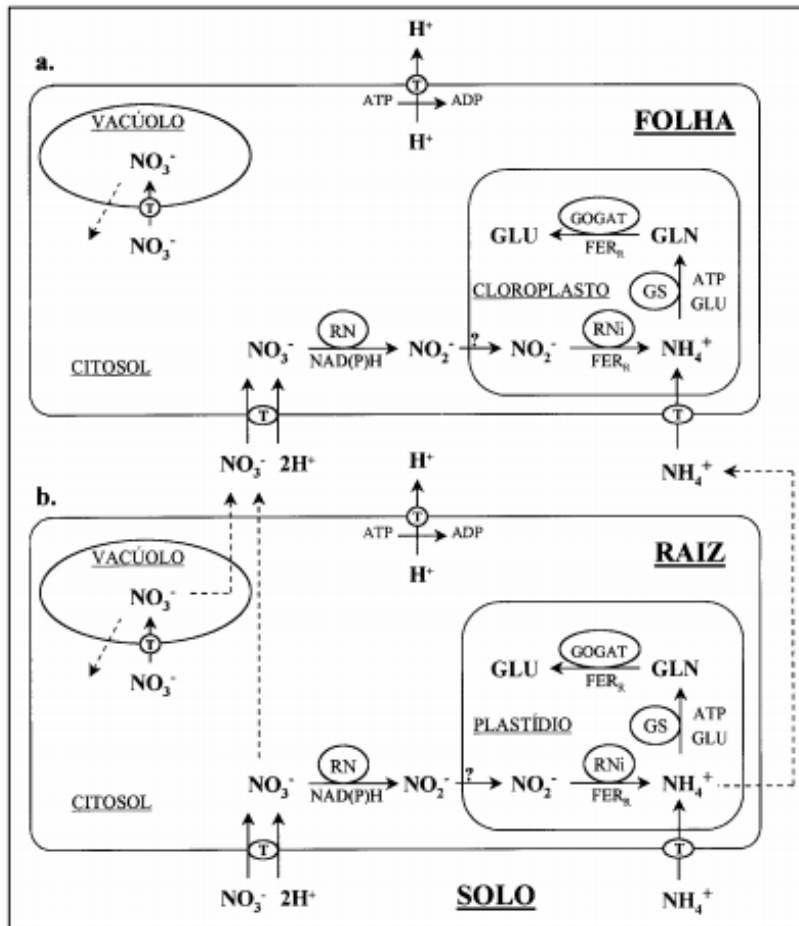


Figura 2 - Esquema da assimilação do azoto nas raízes e folhas das plantas ( $\text{NO}_3^-$ ; nitrato;  $\text{NO}_2^-$ ; nitrito;  $\text{NH}_4^+$ ; amónio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; RN: nitrato redutase; RNI: nitrito redutase; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintetase; T: transportador) (Adaptado de Bredemeier & Mundstock, 2000)

Os nitritos raramente se acumulam em plantas intactas, mesmo estando os complexos enzimáticos separados fisicamente. Este facto pode ser explicado porque a *nitrito redutase* parece ser mais abundante que a *nitrato redutase*, estando a conversão do ião nitrato a ião amónio limitada pela actividade da enzima *nitrato redutase*. A actividade desta enzima é elevada nas folhas em expansão e zona apical de raízes, permitindo uma menor acumulação de nitratos nestas regiões (Rodrigues & Coutinho, 1995).

### **1.3 Factores que influenciam a concentração de nitratos em vegetais**

A acumulação de nitratos nas folhas dos vegetais depende de uma excessiva absorção deste nutriente relativamente à capacidade da planta os reduzir e posteriormente assimilar (Pardo-Marín *et al.*, 2010).

Existem diversos factores que podem afectar a acumulação de nitratos em vegetais, nomeadamente: factores genéticos (espécie e variedade de planta), factores ambientais (a intensidade luminosa, temperatura, humidade atmosférica, fotoperíodo, a qualidade do solo) e factores nutricionais (disponibilidade do nutriente para a planta, tendo em conta a fertilização azotada) (Vieira, Vasconcelos & Monteiro, 1998; Muramoto, 1999; Santamaria, 2006; Castro, Mañas & Heras, 2009; Correia, 2009).

De acordo com Pavlou, Ehaliotis & Kavvadias (2007), a acumulação de nitratos resulta do desequilíbrio entre a absorção e a translocação dos nitratos através do xilema, e a sua redução a amónia, que é rapidamente incorporada em aminoácidos.

#### **1.3.1 Fertilização**

As fertilizações num solo são calculadas para uma dada produção esperada, tendo em conta as necessidades das plantas, a disponibilidade de azoto do solo e a eficiência das plantas utilizarem os nutrientes destes fertilizantes. Para maior precisão na aplicação de fertilizantes deve ser feito um reconhecimento prévio das características do solo, principalmente ao nível das transformações de azoto que ocorrem (Rodrigues & Coutinho, 1995; Lastra *et al.*, 2009). A incorporação de adubos no solo sem o auxílio de uma análise de terra é uma prática arriscada e desaconselhável. O custo da análise é inferior relativamente ao custo que acarreta o desperdício de adubos ou a diminuição da produção provocada por um solo desequilibrado.

O azoto utilizado na forma de fertilizante, quando aplicado em quantidades apropriadas promove o crescimento vegetativo e o desenvolvimento do sistema radicular, tão importante na absorção de água e nutrientes, controlando desta forma o crescimento das plantas. Contudo, quando aplicado em condições deficientes, provoca o amarelecimento de folhas, perdendo a planta o seu vigor e valor comercial. Quando o fertilizante é aplicado em excesso, verifica-se um crescimento exuberante, promovendo instabilidade nutritiva, principalmente devido à grande facilidade na planta obter o azoto para além das suas necessidades metabólicas (Rodrigues & Coutinho, 1995).

Para uma melhor gestão do azoto, deve-se utilizar formas de azoto mais eficientes e melhorar o seu fraccionamento. Os adubos de libertação controlada surgem como uma boa escolha, na medida em que apresentam tecnologias para aperfeiçoar a nutrição das plantas,

garantindo uma boa produção. Podem apresentar tecnologias diversas como o revestimento de grãos, permitindo uma libertação gradual dos nutrientes, ou actuar na estabilização do azoto amoniacal, através de um inibidor que actua ao nível das bactérias *Nitrosomonas*, retardando a conversão do ião amónio a ião nitrato. Este efeito permite o máximo aproveitamento do azoto e minimiza as perdas por lixiviação (Rodrigues & Coutinho, 1995).

### **1.3.2 Luminosidade e hora da colheita**

A hora da colheita é um dos factores que pode influenciar a concentração de nitratos em vegetais. Este factor encontra-se relacionado com a intensidade luminosa, que influencia o funcionamento da enzima *nitrato redutase* (Ott, Koenig & Miles, 2008, 2008; Lopes *et al.*, 2011). O teor de nitratos superior em plantas submetidas a baixa intensidade luminosa pode ser explicado por não existir nos cloroplastos um fluxo de electrões suficiente para a enzima *nitrato redutase* reduzir os nitritos presentes a amónio, originando um aumento na concentração de nitritos. Por sua vez, os nitritos acumulados promovem uma inibição da actividade da *nitrato redutase* no citoplasma, inibindo a redução dos nitratos absorvidos e consequentemente a sua acumulação nos vegetais (Krohn *et al.*, 2003; Faquin & Andrade, 2004; Weightman *et al.*, 2006). De acordo com Khron *et al.* (2003), durante o dia a intensidade luminosa é superior, a planta regista maior actividade fotossintética, mais nitratos são assimilados, e consequentemente menores teores de nitratos estão presentes na planta. No período da noite, não existe actividade fotossintética promovendo a acumulação de nitratos nos vacúolos.

### **1.3.3 Tipo de cultura**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo diário de, pelo menos, 400 g ou cinco porções de frutas e hortícolas. O consumo de fruta e hortícolas tem sido associado à redução do risco e da mortalidade ligados às doenças cardiovasculares, à obesidade e a algumas neoplasias. No entanto, importa referir que alguns vegetais tendem a ser mais susceptíveis de acumular contaminantes, nomeadamente os nitratos, e o efeito do consumo destes vegetais poder tornar-se adverso. De facto, de acordo com Santamaria (2006), existem alguns vegetais que tendem a acumular mais nitratos, relativamente a outros, como é o caso das alfaces e espinafres.

Como foi referido anteriormente, o teor de nitratos nas plantas varia entre espécie e variedade, e de facto, a genética da própria planta pode influenciar a eficácia das enzimas



envolvidas no mecanismo de redução e assimilação dos nitratos (Forde, 2000; Guadagnin, Rath & Reyes, 2005). De acordo com Santamaria (2006), os diferentes teores de nitratos entre espécies ou variedades, podem estar relacionados com a diferente localização da *nitrato redutase* nas plantas, como também podem ser devidos a diferentes graus de absorção do ião e à sua transferência na planta.

#### 1.4 Legislação e teor máximo de contaminantes

A acumulação de nitratos em vegetais pode tornar-se um grave problema de segurança alimentar, relacionado, eventualmente, com o uso desmedido de fertilizantes azotados. Segundo Weightman *et al.* (2006), os nitratos estão presentes nos vegetais, mas a alface e o espinafre estão entre os vegetais que apresentam os teores mais elevados e são a principal fonte de nitratos na dieta humana, como pode ser observado na tabela 1, em que Correia (2009) considerou cinco classes de vegetais tendo em conta o teor de nitratos acumulado.

Tabela 1 - Teor em nitratos (mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg) em vegetais

<b>Muito baixo (&lt; 200)</b>		<b>Baixo (200-500)</b>	<b>Médio (500-1000)</b>	<b>Elevado (1000-2500)</b>	<b>Muito elevado (&gt;2500)</b>
Abóbora	Ervilhas	Abóbora-menina	Couve	Aipo vermelho	Agrião
Alcachofra	Espargos	Brócolos	Couve-sabóia	Alho francês	Aipo
Alho	Fava	Cenoura	Endro	Couve chinesa	Alface
Batata	Feijão-verde	Couve-flor	Nabo	Rábano	Alface-de-cordeiro
Batata-doce	Melancia	Pepino		Endívias	Acelga
Beringela	Melão			Funcho	Cerefólio
Cebola	Pimento			Salsa	Espinafre
Cogumelos	Tomate				Rabanete
Couve de Bruxelas					

(Adaptado de Correia, 2009)

Deste modo, a ingestão continuada de dietas ricas em nitratos deve ser evitada (Santamaria, 2006; Correia, 2009).

Por forma a prevenir eventuais problemas de saúde pública a concentração máxima de nitratos em determinados vegetais encontra-se regulamentada por legislação comunitária.

O Regulamento (CE) nº 1258/2011, veio estabelecer novos teores máximos de nitratos em produtos hortícolas, alterando o Regulamento (CE) nº 1881/2006, que estipula limites dificilmente cumpríveis em certas regiões da União Europeia. De facto, a nova legislação

permite que, independentemente das condições específicas de luminosidade a que as culturas são sujeitas, e desde que salvaguardado que o produtor mantém as boas práticas agrícolas, esteja garantida a segurança do consumidor.

Os teores máximos de nitratos permitidos encontram-se descritos na tabela 2 (Regulamento (CE) nº 1258/2011).

Tabela 2 - Teores máximos de resíduos de  $\text{NO}_3^-$  (mg/kg) permitidos em alfaces e espinafres

Géneros alimentícios	Teores máximos (mg $\text{NO}_3^-$ /kg)	
Espinafres frescos		3500
Espinafres conservados, ultracongelados ou congelados		2000
Alface fresca (cultivada em estufa e do campo)	Colhida de 1 de Outubro a 31 de Março:	
	Cultivada em estufa	5000
	Cultivada em campo	4000
	Colhida de 1 de Abril a 30 de Setembro:	
	Cultivada em estufa	4000
	Cultivada em campo	3000

(adaptado de: Regulamento (CE) nº 1258/2011)

## 1.5 Ingestão de nitratos

Os vegetais são considerados a principal fonte de nitratos da dieta humana, representando 80 a 95% do total de nitratos ingeridos (Correia *et al.*, 2010), como é evidenciado na tabela 3.

Tabela 3 - Estimativas de origem de nitratos ingeridos com a alimentação

Região	Origem de nitratos na alimentação humana ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )			
	Vegetais	Água	Cereais	Fruta
África	300	400	150	100
América latina	650	150	50	100
Ásia	450	300	150	100
Europa	900	50	<50	50
Médio Oriente	650	200	100	50

(adaptado de Santamaria, 2006)

De acordo com Santamaria (2006), os nitratos podem ser obtidos de forma exógena, através da alimentação, mais propriamente nos vegetais e na água de consumo.

Os nitratos, por si, são relativamente pouco tóxicos. No entanto, após a ingestão de alimentos ricos em nitratos, estes podem ser convertidos a nitritos e outros metabolitos que podem provocar efeitos adversos no homem. Aproximadamente cerca de 5% dos nitratos ingeridos são reduzidos a nitritos, por enzimas *nitrito redutase* existentes na boca e tracto

gastrointestinal (Tamme *et al.*, 2006, Correia *et al.*, 2010). Os nitritos reduzidos são posteriormente acidificados no estômago e convertidos em óxido nítrico (NO) e compostos do tipo N-nitroso (NOC). Estes últimos formam-se quando os nitritos reagem com amidas e aminas para originarem, respectivamente, nitrosamidas e nitrosaminas (Shao-ting, Yong-song & Xian-yong, 2007; Correia, 2009).

Cerca de 25% dos nitratos provenientes da alimentação (figura 3) entram em circulação sendo absorvidos entre a saliva e o tracto gastrointestinal, sendo que a maior parte são excretados através da urina, suor e lágrimas (Shao-ting, Yong-song & Xian-yong, 2007).

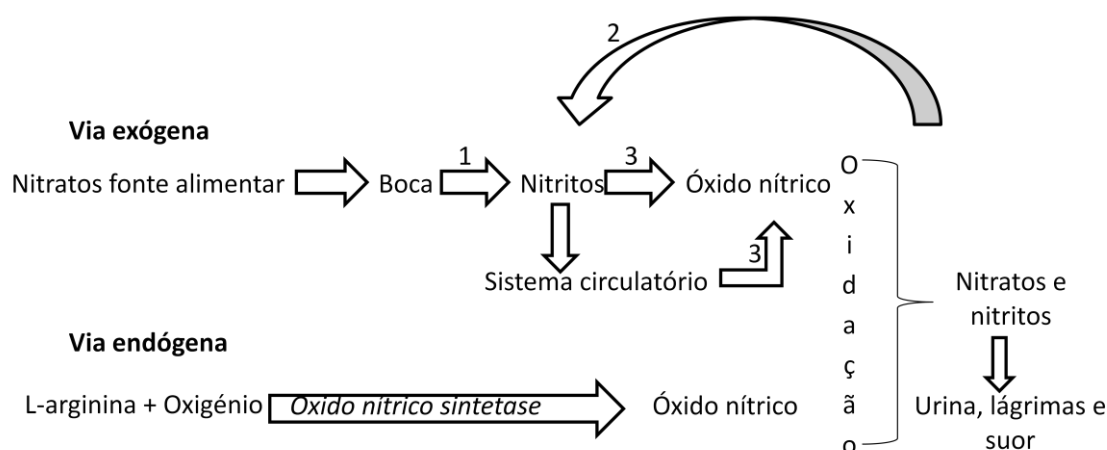


Figura 3 - Metabolismo dos nitritos e nitratos no homem (1 - Acção de bactérias nitrato redutase na boca e enzimas com actividade de nitrato redutase; 2 – Bactérias nitrato redutase; 3 – Enzimas com actividade nitrito redutase) (adaptado de Hord, Tang & Bryan, 2009)

## 1.6 Toxicidade e efeitos no homem

Os efeitos dos nitratos da dieta no homem não são consensuais (Shao-ting, Yong-song & Xian-yong, 2007; Correia, 2009), pois se por um lado, existem estudos que referem que uma dieta rica em nitratos pode ter efeitos adversos na saúde humana, com efeitos cancerígenos e incidências na metahemoglobinémia infantil (Guadagnin, Rath & Reyes, 2005), por outro, alguns autores sugerem que os nitratos ingeridos que sofrem redução a óxido nítrico no estômago podem auxiliar na destruição de microrganismos patogénicos que provocam gastroenterites (Santamaria, 2006; Powlson *et al.*, 2008).

Os efeitos negativos dos nitratos no homem têm sido postos em causa, principalmente devido à escassez de evidências científicas (L'Hirondel & L'Hirondel, 2002; Santamaria, 2006).

Muitos alimentos, incluindo os vegetais, são benéficos quando ingeridos em pequenas doses, mas a doses elevadas podem-se tornar prejudiciais. Deste modo, Santamaria (2006)

e Katan (2009) sugerem que se deve evitar a ingestão prolongada de dietas contendo doses de nitratos superiores às doses diárias recomendadas, por não serem ainda explícitos os efeitos de uma exposição continuada.

### 1.6.1 Metahemoglobinémia infantil

Um dos principais efeitos adversos dos nitratos na saúde humana é a metahemoglobinémia (mtHb). A relação entre a ocorrência de metahemoglobinémia e a presença de nitratos remonta a estudos de 1945, nos quais associaram esta doença a dietas alimentares (Shao-ting, Yong-song & Xian-yong, 2007). De acordo com Shao-ting, Yong-song & Xian-yong (2007), os nitritos produzidos endogenamente a partir dos nitratos ingeridos da dieta são considerados a principal causa de metahemoglobinémia infantil.

Esta doença, conhecida igualmente por “síndrome do bebé azul”, resulta do facto dos nitritos reduzidos no estômago e intestino delgado reagirem com a hemoglobina (oxyHb) para originar metahemoglobina e nitratos (Figura 4), levando a um estado de cianose e hipoxia (Santamaria, 2006; Shao-ting, Yong-song & Xian-yong, 2007; Hord, Tang & Bryan, 2009).



Figura 4 - Fórmula da reacção dos nitritos com hemoglobina (Adaptado de Santamaria, 2006)

A metahemoglobina, a forma oxidada da hemoglobina não se liga ao oxigénio, devido à presença de nitritos, principalmente em crianças com idades inferiores a três meses (L'Hirondel & L' Hirondel, 2002). Tal circunstância pode dever-se ao facto: i) as crianças apresentarem baixos níveis da enzima *metahemoglobina redutase*, responsável pela conversão da metahemoglobina em hemoglobina; ii) o pH gástrico ser mais elevado, favorecendo uma maior redução de nitratos a nitritos através das bactérias *nitrito redutase*; iii) e pensa-se que exista maior quantidade de hemoglobina oxidada no plasma, permitindo maiores concentrações de metahemoglobina (Santamaria, 2006; Chan, 2011).

### 1.6.2 Efeitos cancerígenos

Alguns autores defendem que a ingestão de nitratos pode promover a ocorrência de cancro. Tanto os nitratos como os nitritos não são por si só cancerígenos, no entanto, os nitritos resultantes da redução dos nitratos provenientes da dieta podem reagir com aminas, dando

origem a NOC (composto N-nitroso). Apesar de existirem estudos que revelam que o NOC pode ser cancerígeno em modelos animais, não existem evidências de que em humanos possa ter esse efeito. Deste modo, segundo alguns autores é necessário que se efectuem novos estudos por forma a confirmar o efeito cancerígeno dos metabolitos dos nitratos nos humanos (Correia, 2009; Hord, Tang & Bryan, 2009).

### **1.7 Consumo diário admissível de nitratos**

A ADI (*Acceptable daily intake*) é um conceito criado pelo *Joint Expert Committee of the Food and Agriculture (JECFA)*, *Organization of the United Nations/ World Health Organization (WHO)* e surge com o objectivo de proteger o consumidor contra a exposição excessiva a substâncias nocivas. Ficou definido que a ADI para nitratos se mantivesse entre 0-3,7 mg/kg de peso corporal (Tamme *et al.*, 2006; Rodrigues, 2006; Shao-ting, Yong-song & Xian-yong, 2007). Considerando um indivíduo de 60kg, pode facilmente ultrapassar a ADI em cerca de 13%, se ingerir 100g de um vegetal com teor de nitratos 2500mg/kg (Santamaria, 2006).

### **1.8 Alface**

A alface (*Lactuca sativa* L.), família *Asteraceae*, é uma planta herbácea de ciclo anual, vulgarmente designada por hortícola de folhas, de regiões de clima temperado. É uma planta com raiz aprumada e pouco desenvolvida, com pequeno caule, em que as folhas crescem na forma de roseta, podendo ser lisas ou frisadas, consoante a variedade. É uma planta originária de espécies silvestres do Sul da Europa e Ásia Ocidental (Almeida, 2006).

A alface é constituída essencialmente por água (95%), encontrando-se também algumas fibras, açúcares, minerais, proteínas, lípidos, vitaminas e ácidos orgânicos. O valor nutritivo é reduzido: 13 Kcal por 100 g de parte comestível, sendo apreciada não tanto pelo seu valor nutritivo mas mais pelas suas qualidades nutritivas (vitaminas e fibras) e a sua fácil preparação (Almeida, 2006).

Existe uma grande variedade de alfaces, e geralmente, a classificação baseia-se em características como a forma da folha, o tamanho, ou o grau de formação do repolho. Actualmente, as diferentes variedades dividem-se em 5 grandes grupos: as alfaces tipo “Bola de Manteiga” (alface de folhas lisas), as “Batávias” (alface de folhas frisadas), as “Romanas”, as “de folhas” ou “de cortar” e as “de caule” (Almeida, 2006). Em Portugal, o cultivo de maior expressão são as variedades que pertencem ao grupo das “Bola de Manteiga” (Figura 5) e “Batávias” (Figura 6).



Figura 5 - Alface "Bola de manteiga" (original)



Figura 6 - Alface "Batávia" (original)

A duração do ciclo cultural (desde a sementeira até à colheita) é variável, dependendo da variedade de alface e, sobretudo, da época de produção. O ciclo cultural em estufa dura aproximadamente 9 semanas na época de Primavera-Verão e 10 a 12 semanas durante o Inverno.

O ciclo vegetativo de alfaces destinadas ao consumo divide-se em 3 etapas: i) germinação e emergência; ii) formação da roseta de folhas; iii) formação do repolho (Almeida, 2006).

A alface desenvolve-se melhor em terrenos francos e com alto teor em matéria orgânica, que não retenham excessivamente a humidade. É ligeiramente tolerante à acidez do solo, crescendo melhor em solos com pH entre 6,5 e 7,2 (Almeida, 2006).

A alface é caracterizada por ter um ciclo curto e um crescimento vegetativo rápido, o que exige uma atenção especial ao fornecimento do azoto pois o excesso ou deficiência podem acarretar prejuízos elevados para a respectiva produtividade e qualidade. Os efeitos do excesso de azoto incluem, o grande desenvolvimento vegetativo, com folhas maiores, que tornam a planta mais frágil. Desta forma podem favorecer os ataques de pragas e doenças, bem como promover a acumulação de nitratos na planta. As necessidades de azoto da cultura são muito variáveis ao longo do ciclo cultural. Começam por ser muito reduzidas e vão aumentando gradualmente até à última semana antes da completa formação do repolho, onde são máximas (Almeida, 2006).

De acordo com Pavlou, Ehaliotis & Kavvadias (2007) a acumulação de nitratos nas alfaces parece ser mais influenciada pela textura do solo, tipo de fertilizante, intensidade luminosa, época de cultura e tipo de cultivar e variedade. Assim, para minimizar a acumulação de nitratos na alface, deve-se ter em consideração: i) selecionar variedades mais adequadas ao local e estação do ano; ii) evitar os excessos de fertilização azotada, principalmente próximo da altura de colheita; iii) realizar um plano de adubação equilibrado, incluindo os micronutrientes.

## 1.9 Espinafre

O espinafre (*Spinacea oleracea* L.) é uma planta herbácea pertencente à família *Chenopodiaceae*. Admite-se que o espinafre é originário da Pérsia, das regiões que actualmente constituem o Irão e o Afeganistão. Desconhecido das culturas Grega e Romana, o seu cultivo na Europa iniciou-se na Península Ibérica através da expansão do Império Islâmico para esta região (Almeida, 2006).

O espinafre (Figura 7) é uma planta herbácea anual, apresenta um caule principal curto, da base do qual surgem seis ou mais ramos laterais, radiais, que crescem horizontalmente, e as folhas dispostas em roseta são de coloração verde-escura. Apresenta um sistema radicular aprumado, pouco ramificado (Almeida, 2006).



Figura 7 - Espinafre (original)

A espécie *Spinacea oleracea* é característica de climas temperados e é cultivado preferencialmente no Outono e no Inverno, sendo intolerante a temperaturas acima dos 20°C. Os solos para a cultura do espinafre devem ser férteis, com boa drenagem e elevada capacidade de retenção de água (Almeida, 2006).

De forma a maximizar o sucesso comercial da cultura de espinafre é importante considerar os critérios de selecção das diferentes variedades: i) porte da planta; ii) tipo de folhas; iii) textura do limbo (folhas lisas, semi-rugosas ou rugosas); iv) aptidão ao consumo (frescos ou congelados); v) Adaptação à época de produção (Outono-Inverno ou Primavera –Verão) (Almeida, 2006).

A cultura de espinafre deve ser bem fertilizada de modo a suportar as elevadas taxas de crescimento e a proporção de folhas. No entanto, o risco de acumulação de nitratos nas folhas é elevado em condições de baixa luminosidade, baixa temperatura e excesso de azoto, pelo que se deve realizar um plano de adubação adequado às condições existentes.

O espinafre é uma hortaliça com elevado valor nutritivo, sendo cultivado para obtenção de folhas. O seu consumo é valorizado pelo seu elevado teor em ácido ascórbico, riboflavina e carotenos precursores da vitamina A. É uma boa fonte de ferro e ácido fólico, cálcio e fósforo (Almeida, 2006).

### **1.9.1 Presença de nitratos no caule de espinafres**

O teor de nitratos pode variar em função dos diversos tecidos vegetais. Geralmente as folhas apresentam teores de nitratos inferiores relativamente aos caules (Muramoto, 1999; Ott, Koenig & Miles, 2008; Chan, 2011).

Carranca (2000) e Santamaria (2006) referem que existem diferenças nos teores de nitratos nos diversos órgãos da planta, sendo os caules os que revelam ter maior concentração de nitratos. As diferenças na capacidade de diversos tecidos vegetais acumularem nitratos pode estar relacionada com a localização da enzima *nitrito redutase*, mas também com o facto de os níveis de absorção deste ião ou o grau de transferência na própria planta poderem ser diferentes (Santamaria, 2006). Estes estudos permitem considerar que se devem efectuar cortes no comprimento dos caules por ser um método de redução do teor de nitratos nas folhas de espinafre.



## 1.10 Objectivos

Este trabalho surge com o objectivo de se responder à necessidade de se implementarem práticas culturais que minimizem a acumulação de nitratos em vegetais.

Numa primeira fase, e tendo em conta a bibliografia consultada, pretendeu-se determinar se o tamanho dos pecíolos de espinafres em armazém teriam alguma influência no teor de nitratos, de modo a garantir um produto mais seguro ao consumidor.

Na segunda fase deste trabalho, e tendo em consideração os resultados da primeira fase, pretendeu-se avaliar e relacionar os factores que possam influenciar a quantidade de nitratos em alfaces e espinafres no ensaio em campo, para o que foi verificado e/ou comparado:

- Cultura em estufa *versus* ar livre
- Adubo de libertação controlada *versus* adubo convencional
- Quantidade de adubo colocada
- Hora da colheita
- Espinafre inteiro *versus* folha de espinafre

## 2 Material e métodos

### 2.1 Ensaio de corte de caules de espinafre em armazém

As folhas e os caules de espinafres apresentam teores de nitratos diferentes (Beninni *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Shimada & Ko, 2004; Lastra *et al.*, 2009). Pretendeu-se verificar se as folhas de espinafres apresentavam teores de nitratos inferiores, quando comparados com os teores dos espinafres inteiros.

As recolhas foram efectuadas nas instalações do Grupo Jerónimo Martins Retalhista, na Azambuja.

Pediu-se aos fornecedores envolvidos no projecto (tabela 4), que fornecessem uma caixa com molhos de espinafres para se efectuar o ensaio de corte de folhas de espinafre.

Tabela 4 - Fornecedores envolvidos no projecto

<b>Fornecedores</b>
A
B
C

Foram realizados dois ensaios em dias diferentes (28.11.2011 e 31.01.2012), com dois replicados em cada dia.

Posteriormente (16.05.2012) efectuou-se novo ensaio, tendo sido recolhido para o efeito 15 amostras do produtor C.

### 2.1.1 Amostragem

Os molhos de espinafres foram divididos em dois, uma das metades foi analisada inteira, e à outra metade retiraram-se os pecíolos. Na figura 8 encontra-se representado o corte de folhas de espinafre (A) e o aparo dos caules de espinafre (B).

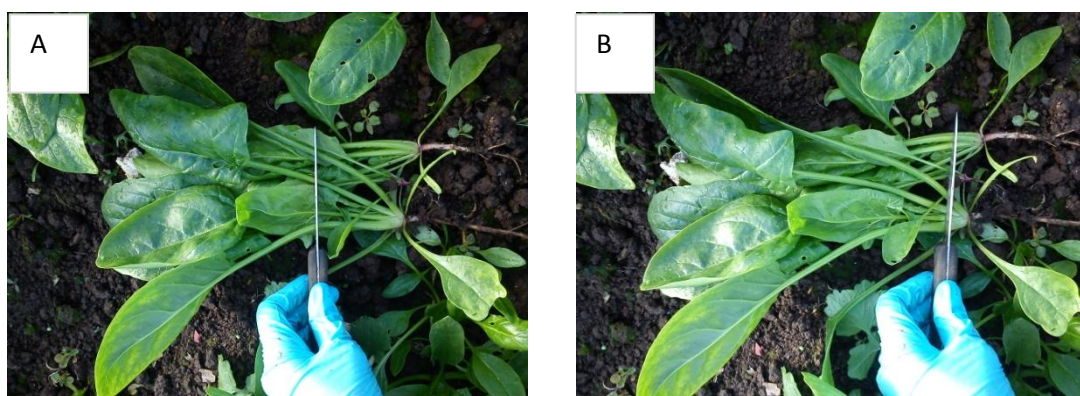


Figura 8 - Fotografia representativa do corte de folhas de espinafre (A) e do corte de espinafres inteiros (B) (original)

As amostras de espinafres inteiros e folhas (duas amostras de cada fornecedor, por dia) foram acondicionadas e identificadas em sacos de plástico individuais de forma célere.

Foi colhida aproximadamente 1kg de amostra em cada saco. Selou-se o saco imediatamente após a recolha.

## 2.1.2 Doseamento do ião Nitrato

Os sacos com as amostras foram recolhidos por um técnico da Labiagro e analisados os teores de nitratos nesse laboratório, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (“HPLC”), de acordo com EN 12014-4 (1998).

Manteve-se uma cópia da etiqueta utilizada em cada saco de plástico (tabela 5).

Tabela 5 - Dados sobre os espinafres utilizados no ensaio

Data	Fornecedor	Variedade	Adubo	Última adubação	Parcela
28 – Nov	A	Kouto	Entec 26	3 semanas antes	Ar livre
	B	Walibi	Fertigran (3.3.3), cobertura	3 dias antes	Estufa
	C	Sem inf.	Sem inf.	Sem inf.	Sem inf.
31 – Jan	A	Walibi	Entec 26	2 semanas antes	Ar livre
	B	Walibi	Foskamónio 111	5 semanas antes	Estufa
	C	Walibi	Sem inf.	Sem inf.	Ar livre
16 - Mai	C	Actos	Fertigete	4 semanas antes	Ar livre

## 2.2 Ensaio de campo para pesquisa de nitratos em alfaces e espinafres

### 2.2.1 Localização dos ensaios

A experiência foi realizada em parcelas de três produtores.

O ensaio realizado com espinafre foi efectuado em três parcelas distintas, duas de estufa e uma de ar livre (Tabela 6)

No ensaio realizado com alfaces recorreu-se a duas parcelas diferentes, ambas de estufa (Tabela 6). A cultura de alface não é viável em ar livre nos meses de Inverno.

Tabela 6 - Localização das parcelas utilizadas no ensaio

Cultura	Parcela	Localização
Espinafre	Estufa	Aruil, Sintra
	Ar livre	Aruil, Sintra
	Estufa	Calvos, Mafra
Alface	Estufa	Aruil, Sintra
	Estufa	Tourinha, Mafra

## 2.2.2 Características dos solos e águas de rega

Foram realizadas recolhas de amostras de solos e águas de rega em cada parcela.

As amostras de solos foram obtidas recolhendo-se diversas porções de terra de diferentes locais de cada parcela (a cerca de 20 cm de profundidade), sendo efectuado de seguida uma mistura dessas porções e retirado cerca de 1 Kg de amostra para sacos de plástico limpos, individuais e identificados, fornecidos pelo fornecedor C.

As recolhas de amostra de águas de rega foram efectuadas nas diferentes parcelas, tendo sido colhido 1 L de amostra de água cerca de meia hora após o início da bombagem da água (em poço ou furo). As amostras de água foram guardadas em recipientes de plástico, limpos, rolhados e identificados.

As amostras foram entregues no Instituto Superior de Agronomia, onde foram realizadas as análises. Foi determinado o teor de nitratos nos solos e águas de rega por espectrofotometria de absorção molecular.

## 2.2.3 Plantas e sementes

As plantas de alface utilizadas no ensaio foram fornecidas pelos próprios produtores.

As sementes de espinafre utilizadas neste ensaio foram cedidas pela empresa Rijk Zwaan.

As sementes de espinafre foram colocadas no solo mecanicamente, as plantas de alface foram colocadas nas parcelas, tendo sido colocado plástico perfurado no solo.

Na tabela 7 encontram-se resumidas as informações relativas aos espinafres e alfices utilizadas.

Tabela 7 - Espinafres e alfices utilizadas no ensaio

<b>Espécie</b>	<b>Variedade</b>	<b>Tipo</b>	<b>Local do ensaio</b>
<b>Alface</b>	Judita	Lisa	Aruil/estufa
	Matinale	Frisada	Tourinha/estufa
<b>Espinafre</b>	Walibi	-	Calvos/estufa
	Walibi	-	Aruil/estufa
	Esmer	-	Aruil/ar livre

## 2.2.4 Adubos

Pretendeu-se estudar o efeito de adubos convencionais e de adubos tecnológicos de libertação gradual de nutrientes (Duratec).

O adubo Duratec 14.7.14 (14% de azoto total; 7% de pentóxido de fósforo; 14% de óxido de potássio) é um adubo granulado “NPK” (Azoto, fósforo e potássio) que utiliza duas tecnologias distintas: inibição da nitrificação (actua ao nível das bactérias *Nitrosomonas*,

retardando a conversão de amónio a nitrato) e revestimento dos grânulos (os grãos são cobertos por uma membrana, e em contacto com a humidade do solo, libertam de forma gradual os nutrientes).

O adubo convencional é um adubo semelhante ao que os produtores normalmente utilizam sem libertação controlada de nutrientes.

Os adubos foram colocados a lanço.

Os adubos utilizados no ensaio foram fornecidos pela empresa COMPO.

### 2.2.5 Delineamento experimental

O plano de adubação foi elaborado em parceria com um técnico da empresa COMPO e a técnica de campo do fornecedor C.

Todos os ensaios cumpriram um delineamento experimental idêntico, existindo seis modalidades de adubação em cada parcela. Os ensaios estiveram inseridos em sectores de produção, pelo que foi necessário adaptar o espaço dos ensaios em cada produtor, garantindo a reprodutibilidade dos mesmos.

As modalidades de adubação neste ensaio encontram-se descritas na tabela 8 (ensaio de espinafre) e tabela 9 (ensaio de alface), tendo sido aplicadas nas parcelas as unidades de azoto finais descritas nas tabelas abaixo. Relativamente aos adubos convencionais nas alfoces (tabela 9) foram colocadas unidades de azoto finais inferiores às unidades de azoto pretendidas.

No adubo sem azoto (grupo controlo) apenas foram colocadas unidades de fósforo e potássio.

Tabela 8 - Informações relativas aos adubos utilizados nos ensaios de espinafre

Tipo de Adubo	Tipo de adubação	Unidades de Azoto pretendidas	Unidades de azoto Finais
<b>Sem azoto (Controlo)</b>	Fundo	0	0
<b>Convencional</b>	Fundo e cobertura	100	100
	Fundo e cobertura	125	125
<b>Duratec (14.7.14)</b>	Fundo	70	70
	Fundo	100	100
	Fundo	125	125

Tabela 9 - Informações relativas aos adubos utilizados nos ensaios de alfaces

Tipo de Adubo	Tipo de adubação	Unidades de Azoto pretendidas	Unidades de azoto Finais
<b>Sem azoto (Controlo)</b>	Fundo	0	0
<b>Convencional</b>	Fundo e cobertura	100	32
	Fundo e cobertura	125	36
<b>Duratec (14.7.14)</b>	Fundo	70	70
	Fundo	100	100
	Fundo	125	125

### 2.2.5.1 Ensaio em Aruil/estufa - espinafre e alface

O ensaio foi realizado em estufa numa empresa do tipo familiar, sediada em Aruil, na Freguesia de Almargem do Bispo, do Concelho de Sintra, com a variedade de espinafre Walibi (Figura 9) e a variedade de alface Judita (Figura 10). Optou-se por esta variedade de alface por se adaptar às condições climáticas, tendo sido considerada a experiência do produtor.

Foram utilizadas cinco linhas da parcela, separadas entre si por igual distância. Cada linha correspondeu a uma modalidade de adubação, com excepção da primeira linha que foi dividida ao meio, de modo a obter mais modalidades de adubação.

O ensaio em Aruil/estufa foi iniciado em 5 de Novembro de 2011.

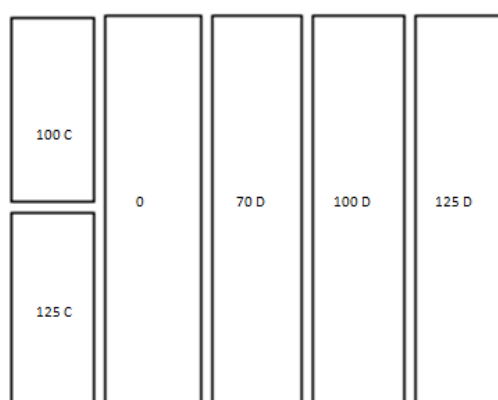


Figura 9 - Esquema de modalidades de adubação em espinafre na estufa em Aruil (100 C – adubo convencional com 100 unidades de azoto; 125 C – adubo convencional com 125 unidades de azoto; 0 – adubo sem unidades de azoto; 70 D – adubo com 70 unidades de azoto; 100 D – adubo com 100 unidades de azoto; 125 D – adubo com 125 unidades de azoto)

A 1ª linha da parcela (figura 9) foi dividida para ensaiar os adubos convencionais com 100 e 125 unidades de azoto. Utilizou-se adubo de fundo e adubo de cobertura para perfazer as unidades de azoto pretendidas. O adubo de cobertura foi colocado a 26 de Novembro de 2011.

Na 2ª linha colocou-se adubo de fundo sem unidades de azoto (0), o grupo controlo.

Na 3ª, 4ª e 5ª linha colocou-se adubo de fundo Duratec (70, 100, 125 unidades de azoto, respectivamente).



Figura 10 - Esquema de modalidades de adubação em alface na estufa em Aruil (32 C – adubo convencional com 32 unidades de azoto; 36 C – adubo convencional com 36 unidades de azoto; 0 – adubo sem unidades de azoto; 70 D – adubo com 70 unidades de azoto; 100 D – adubo com 100 unidades de azoto; 125 D – adubo com 125 unidades de azoto)

Na figura 10, referente à adubação da alface, mostra-se que a 1ª linha foi dividida em duas para ensaiar o adubo convencional com 32 e 36 unidades de azoto em fundo, não tendo sido aplicado qualquer outro adubo nestas metades de linha.

No ensaio foram utilizadas cinco linhas da parcela, de acordo com as quantidades e tipo de adubo utilizado. Tendo em conta que na área destinada ao ensaio, foi colocado plástico no solo, não foi possível efectuar adubação de cobertura. Para contornar a situação foi sugerido a fertirrigação, remoção do plástico do solo ou aplicação de adubos foliares. A fertirrigação não poderia ser feita numa única linha, porque os aspersores alcançam cerca de três linhas, pelo que os resultados ficariam inviabilizados nas linhas paralelas. O facto de se remover o plástico do solo poderia danificar as alfaces. No caso da adubação foliar, a taxa de absorção deste nutriente pelas folhas é baixa, além de que existiria o risco de queimaduras das folhas. Por tudo isso, as três alternativas foram eliminadas.

Na 2ª linha foi colocado adubo de fundo sem unidades de azoto (0), o grupo controlo.

Na 3ª, 4ª e 5ª linha foi colocado adubo de fundo Duratec (70, 100, 125 unidades de azoto, respectivamente).

Na figura 11 observa-se imagens da adubação na parcela de espinafre (estufa – Aruil) e da parcela de alface (estufa – Aruil).



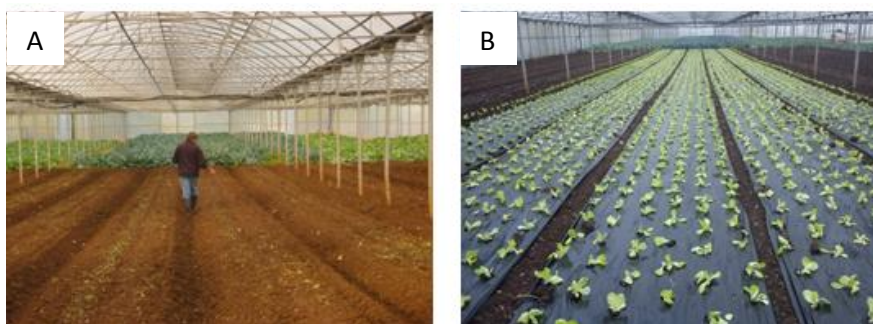


Figura 11 - Adubação a lanço na parcela de espinafre em Aruil/estufa (A). Parcela de alface em Aruil/estufa (B) (original)

### 2.2.5.2 Ensaio em Calvos/estufa - espinafre

O ensaio foi realizado em estufa numa empresa do tipo familiar, sediada na povoação da Calvos, na Freguesia do Milharado, do concelho de Mafra com a variedade de espinafre Walibi (Figura 12 e 13). Foram utilizadas seis linhas da parcela, separadas entre si por igual distância. Cada linha correspondeu a uma modalidade de adubação.

O ensaio em Calvos/estufa foi iniciado em 5 de Novembro de 2011.

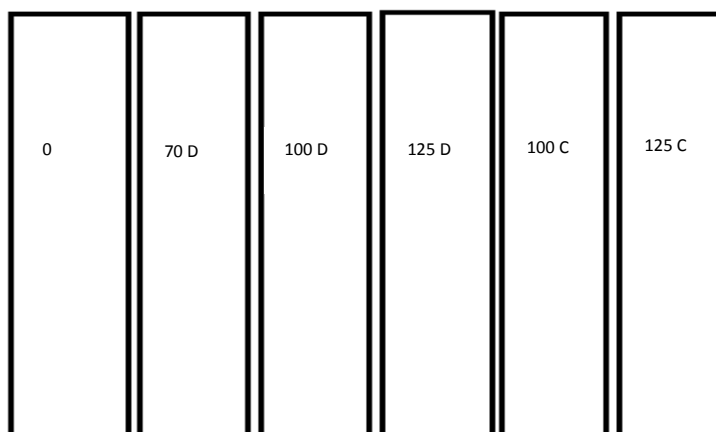


Figura 12 - Esquema de modalidades de adubação em espinafre na estufa em Calvos (0 – adubo sem unidades de azoto; 70 D – adubo com 70 unidades de azoto; 100 D – adubo com 100 unidades de azoto; 125 D – adubo com 125 unidades de azoto; 100 C – adubo convencional com 100 unidades de azoto; 125 C – adubo convencional com 125 unidades de azoto)

Na 1ª linha da parcela foi colocado o adubo de fundo sem unidades de azoto (0 N).

Na 2ª, 3ª, 4ª, 5ª e 6ª linha colocou-se adubo de fundo (70, 100, 125 unidades de azoto de adubo Duratec e o adubo convencional com 100 e 125 unidades de azoto, respectivamente). O adubo convencional de cobertura foi colocado a 25 de Novembro de 2011.

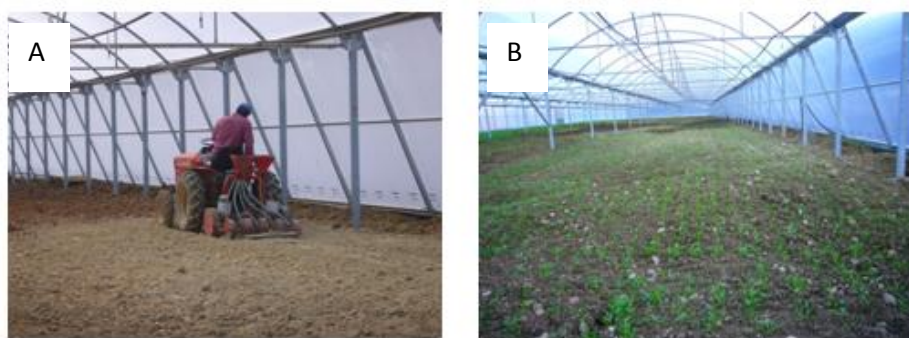


Figura 13 - Sementeira na parcela de espinafre em Calvos/estufa (A). Parcela de espinafre em Calvos/estufa (B) (original)

### **2.2.5.3 Ensaio em Tourinha/estufa - alface**

O ensaio foi realizado em estufa numa empresa do tipo familiar, sediada na povoação de Tourinha, na Freguesia da Azueira, do concelho de Mafra com a variedade de alface Matinale (Figura 14 e 15). Optou-se por esta variedade de alface por se adaptar às condições climáticas, tendo sido considerada a experiência do produtor.

Foram utilizadas três linhas da parcela, separadas entre si por igual distância. Cada linha foi dividida ao meio, sendo que cada meia linha correspondeu a uma modalidade de adubação.

O ensaio em Tourinha/estufa foi iniciado em 21 de Novembro de 2011.

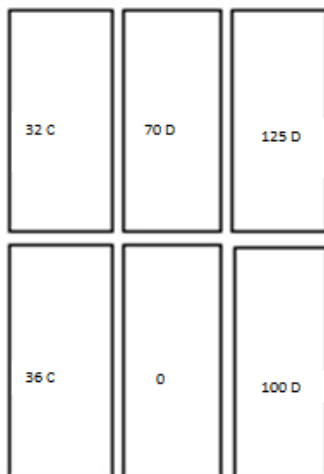


Figura 14 - Esquema de modalidades de adubação em alface na estufa em Tourinha (32 C – adubo convencional com 32 unidades de azoto; 36 C – adubo convencional com 36 unidades de azoto; 0 – adubo sem unidades de azoto; 70 D – adubo com 70 unidades de azoto; 100 D – adubo com 100 unidades de azoto; 125 D – adubo com 125 unidades de azoto)

A 1ª linha foi dividida em duas para ensaiar o adubo convencional com 32 e 36 unidades de azoto em fundo, não tendo sido aplicado qualquer outro adubo nestas metades de linha. Também neste caso, na área destinada ao ensaio foi colocado plástico no solo, pelo que, pelas razões acima expostas para a parcela de alface em estufa – Aruil, se optou por não se fazer a adubação de cobertura.

A 2ª linha foi dividida e colocou-se, na primeira metade da linha, adubo de fundo sem unidades de azoto (0) e 70 unidades de azoto Duratec na segunda metade da linha.

A 3ª linha foi dividida e colocou-se 100 e 125 unidades de azoto de adubo de fundo Duratec.

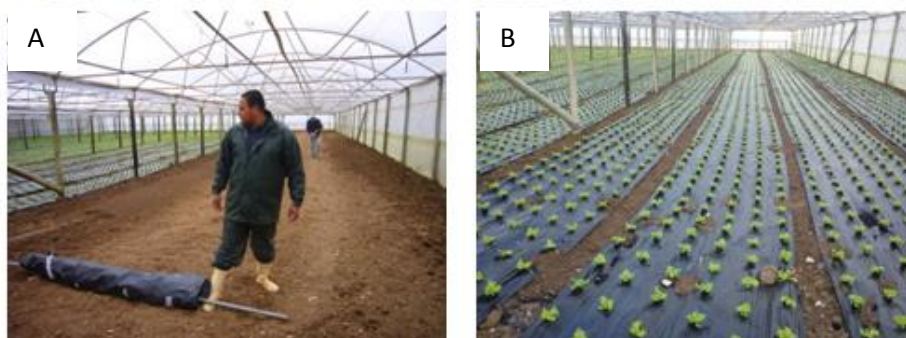


Figura 15 - Adubação de fundo na parcela de alface em Tourinha/estufa (A). Parcela de alface Tourinha/estufa (B) (original)

#### 2.2.5.4 Ensaio em Aruil/ar livre - espinafre

O ensaio foi realizado em ar livre em empresa do tipo familiar, sediada em Aruil, na Freguesia de Almargem do Bispo, do Concelho de Sintra, com a variedade de espinafre Esmer (Figura 16). Optou-se por esta variedade de espinafre para o ar livre por ser mais resistente às condições climáticas, tendo sido considerada a experiência do produtor.

Foram utilizadas cinco linhas da parcela, separadas entre si por igual distância. Cada linha correspondeu a uma modalidade de adubação, com excepção da primeira linha que foi dividida ao meio, de modo a obter mais modalidades de adubação.

O ensaio em Aruil/ar livre foi iniciado em 26 de Novembro de 2011.

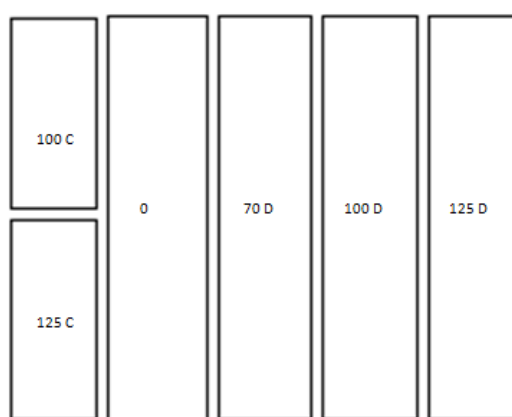


Figura 16 - Esquema de modalidades de adubação em espinafre em ar livre em Aruil (100 C – adubo convencional com 100 unidades de azoto; 125 C – adubo convencional com 125 unidades de azoto; 0 – adubo sem unidades de azoto; 70 D – adubo com 70 unidades de azoto; 100 D – adubo com 100 unidades de azoto; 125 D – adubo com 125 unidades de azoto)

A 1ª linha foi dividida em duas para ensaiar os adubos convencionais com 100 e 125 unidades de azoto. Usou-se adubo de fundo e adubo de cobertura para perfazer as unidades de azoto pretendidas. O adubo de cobertura foi colocado a 3 de Janeiro de 2011.

Na 2ª linha colocou-se adubo de fundo sem unidades de azoto (0), o grupo controlo.

Na 3ª, 4ª e 5ª linha colocou-se adubo de fundo Duratec (70, 100, 125 unidades de azoto, respectivamente).

#### 2.2.6 Amostragem

O processo de amostragem em cada parcela foi realizado aleatoriamente, tendo sido colhidas 3 replicados de cada modalidade de adubação.

No ensaio dos espinafres foram colhidos cerca de quatro pés por amostra, (aproximadamente 1 kg de amostra). Foram colhidas amostras de espinafres inteiros e amostras de folhas de espinafre. As amostras de folhas de espinafre foram obtidas de

acordo com o ponto 2.1.1., tendo-se cortado os pecíolos dos espinafres cerca de 5cm imediatamente abaixo da primeira inserção de folhas (figura 8).

No ensaio das alfaces fora colhida cerca de 1 kg de amostra.

Todas as amostras foram identificadas e colocadas em sacos de plástico individualizados, o mais rápido possível.

Os sacos com as amostras permaneceram em local fresco e seco, tendo sido recolhidos por um técnico da Labiagro ao fim de cada dia de colheita de amostras.

### **2.2.7 Doseamento do ião Nitrato**

As amostras foram analisadas no laboratório da Labiagro, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (“HPLC”), de acordo com EN 12014-4 (1998).

## **2.3 Tratamento estatístico**

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa PASW Statistics 18.0. São apresentadas estatísticas descritivas das determinações do teor de nitratos (média, mediana, mínimo, máximo, desvio-padrão, erro padrão da média) para os dados relativos ao ensaio preliminar bem como para cada uma das variedades estudadas no ensaio de campo (Alface lisa, Alface frisada, Espinafre inteiro, Espinafre em folhas).

Para as variedades de Alface (Lisa ou Frisada) foi utilizado o método de ANOVA medidas repetidas (2 níveis: período de colheita Manhã ou Tarde) com um factor de variação: Tipo de adubo (6 níveis: 0 N; 32 C; 36 C; 70 D; 100 D; 125 D), para comparar o teor de nitratos relativamente aos diferentes adubos utilizados.

Para cada uma das variedades de espinafre (Folhas ou Inteiro), foi utilizado o método de ANOVA medidas repetidas (2 níveis: período de colheita Manhã ou Tarde) para detectar diferenças no teor de nitratos, com dois factores de variação: Tipo de adubo (6 níveis: 0 N; 100 C; 125 C; 70 D; 100 D; 125 D) e Tipo de local (2 níveis: Ar livre ou Estufa), examinando também todas as possíveis interacções.

Relativamente às determinações do teor de nitratos, a percentagem de erro dos ensaios no laboratório Labiagro apresenta uma incerteza de +/- 10%, para um factor de expansão k igual a 2, que permite associar aos resultados um nível de confiança de 95%.

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Ensaio de corte de caules de espinafre em armazém

Após uma revisão bibliográfica, decidiu-se comprovar se as folhas de espinafre teriam um teor de nitratos mais elevado quando comparadas com espinafres inteiros. De acordo como os estudos de Carranca (2000), as folhas de espinafre revelam um teor de nitratos superior aos caules.

Foram efectuadas análises a amostras de espinafres inteiros e amostras de folhas de espinafre após ter sido cortado o caule (conforme ponto 2.1.1.). As variedades em estudo foram Walibi e Kouto, de diversos fornecedores e sob diferentes condições de fertilização.

Na figura 17 encontram-se representados os valores médios de teores de nitratos, de acordo com as estatísticas descritivas (ANEXO I). Considerou-se os três produtores (A, B e C), folhas de espinafre ou espinafre inteiro, em duas datas de colheita (28 de Novembro de 2011 e 31 de Janeiro de 2012).

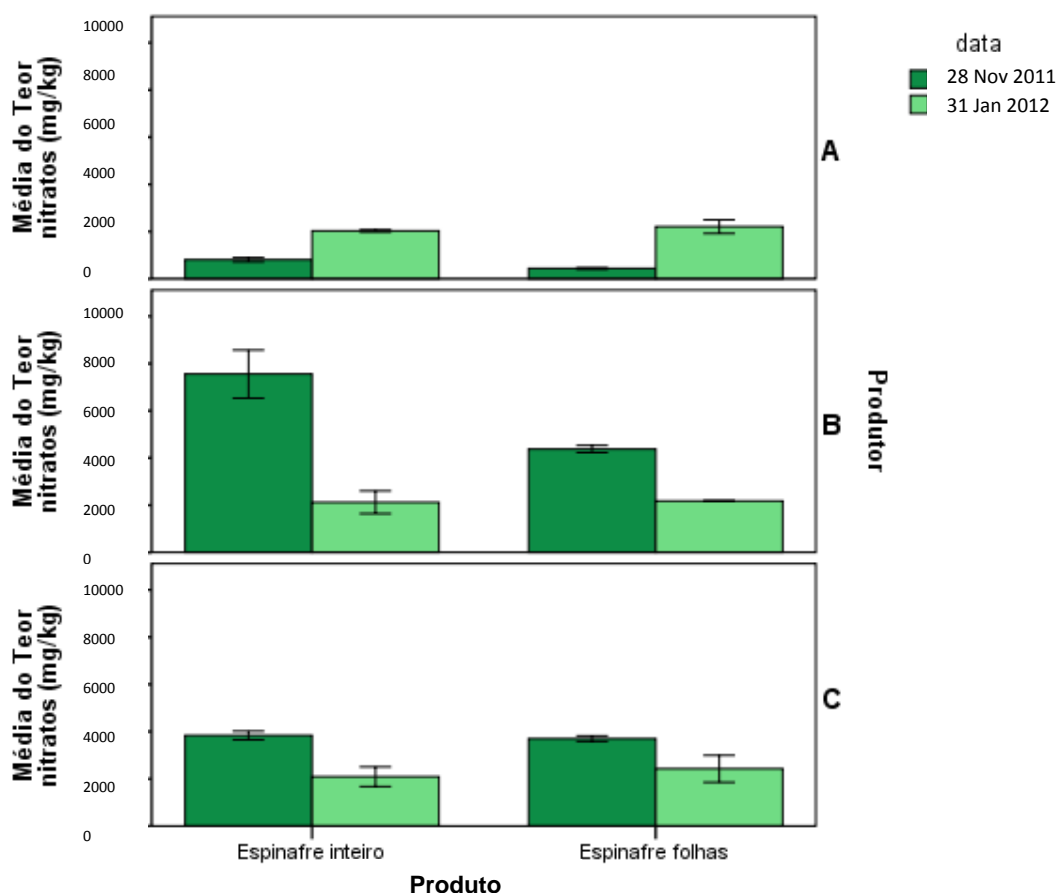


Figura 17- Distribuição dos valores médios do teor de nitratos (mg/kg) e respectivas barras de erro por produtor e produto (espinafre inteiro/espinafre folhas)

Nos produtores A e B, no dia 28 de Novembro de 2011, os espinafres inteiros registaram um teor de nitratos superior às folhas de espinafre, em cerca de 60%. No produtor C, não se

verificaram diferenças consideráveis entre os espinafres inteiros e as folhas, talvez por se tratar de uma variedade de espinafre diferente, com um caule curto e muitas folhas.

Já os resultados do dia 31 de Janeiro de 2012, ao contrário do previsto, mostram que os valores de nitratos obtidos da análise das folhas são sempre superior ao teor das plantas inteiras.

Talvez as condições meteorológicas (tempo seco e quente) atípicas deste Inverno tenham contribuído para o efeito.

Posteriormente efectuou-se nova recolha de amostras (16 de Maio de 2012), com o intuito de se verificar se os teores de nitratos nas folhas seriam inferiores quando comparados apenas com os caules e não com o espinafre inteiro. Foi efectuada uma recolha com maior número de amostras (15 amostras). A variedade utilizada foi a Actos, tendo sido recolhidas amostras de um único produtor (produtor C).

Os resultados encontram-se representados na figura 18, tendo sido seleccionada a representação "Box plot", para ilustrar a diferente distribuição de valores entre as amostras de caules e folhas de espinafre.

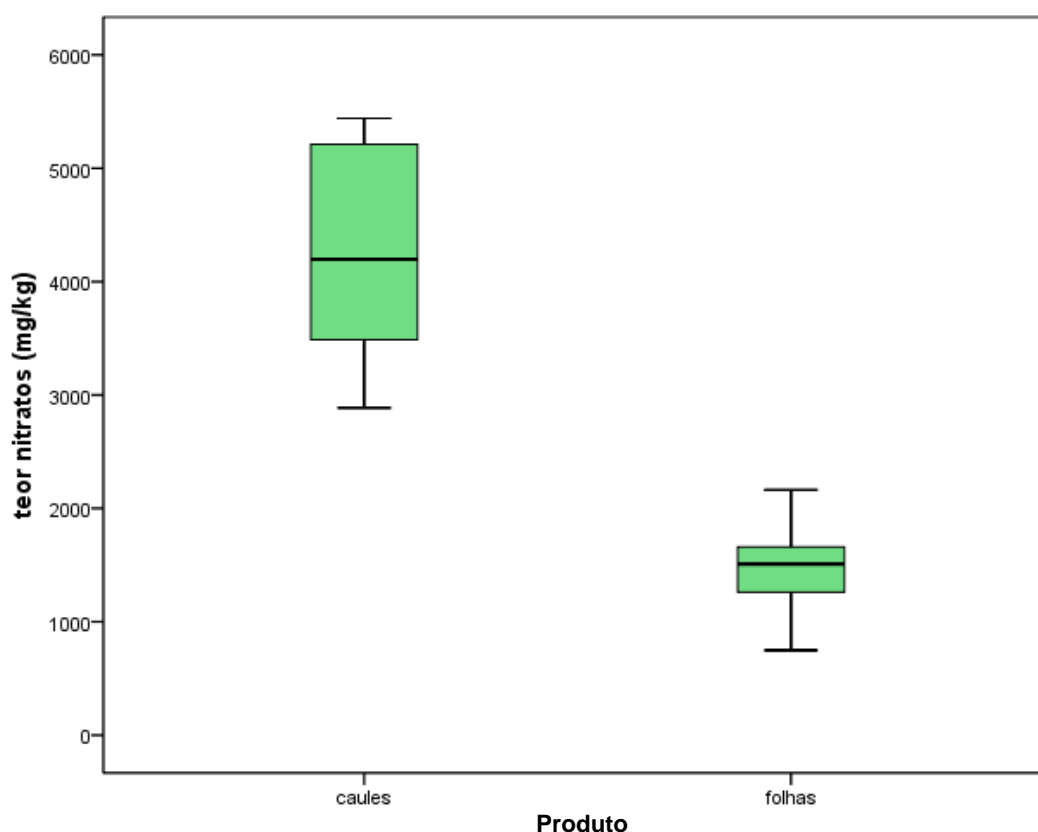


Figura 18 - Distribuição dos valores médios do teor de nitratos (mg/kg) e respectivos intervalos de confiança de 95% por produto (espinafre caules/espinafre folhas)

As amostras do dia 16 de Maio revelam que a quantidade de nitratos presentes nos caules é muito superior à verificada nas folhas. Estes resultados vêm reforçar os resultados das

amostras de folhas de espinafre e amostras de espinafre inteiro, obtidos no dia 28 de Novembro, nos produtores A e B, e vão ao encontro de alguns dos estudos efectuados por Ott, Koenig & Miles (2008), em que também analisaram os teores de nitratos em folhas e caules de espinafres, tendo verificado que as folhas registaram teores de nitratos inferiores, comparativamente aos caules.

Também Lastra *et al.* (2009) efectuaram estudos em alfaces, tendo concluído igualmente que as folhas registam teores de nitratos inferiores, relativamente aos caules.

De acordo com Santamaria (2006), os tecidos vegetais podem apresentar diferenças no que diz respeito à acumulação de nitratos, as quais podem estar relacionadas com factores como: i) a localização da enzima *nitrato redutase* (enzima envolvida na redução deste ião a nitritos); ii) os níveis de absorção de nitratos nos tecidos vegetais podem ser diferentes; iii) a intensidade de transferência deste ião no vegetal pode ser distinta.

### 3.2 Resultados de análises de solos no ensaio de campo

As amostras de solo nas parcelas onde se realizaram os ensaios de campo foram recolhidas, e posteriormente analisadas no laboratório do Instituto Superior de Agronomia, através da técnica de espectrofotometria de absorção molecular. Na tabela 10 encontram-se os resultados das análises de solos.

Tabela 10 - Resultados de análises de solos

SOLOS	pH (H2O)	pH (KCl)	Mat. Org. (%)	P disp(mg/Kg)	K disp(mg/Kg)	NO <sub>3</sub> (mg/Kg)	Textura solo
Estufa-Aruil	6.79	6.08	4.81	>200	>200	115.6	argilosa
Ar livre-Aruil	6.52	5.37	2.76	>200	>200	200.2	franco-argilosa
Estufa-Calvos	8.29	7.32	0.63	8.3	160	71.7	argilosa
Estufa-Tourinha	7.87	7.67	3.28	>200	>200	132.4	argilosa



### 3.3 Resultados de análises de águas de rega no ensaio de campo

As amostras de águas de rega utilizadas nas parcelas onde se realizaram os ensaios de campo foram analisadas no laboratório do Instituto Superior de Agronomia, através da técnica de espectrofotometria de absorção molecular. Na tabela 11 encontram-se os resultados das análises de solos.

Tabela 11 - Resultados de análises de águas de rega

ÁGUAS	Tipo	NO <sub>3</sub> (mg/L)
Estufa - Aruil	Furo	150.8
Ar livre - Aruil	-	37.3
Estufa - Calvos	Furo	30.7
Estufa - Tourinha	Poço	3

### 3.4 Ensaio de campo para pesquisa de nitratos em alfaces e espinafres

Sabe-se que o fornecimento em excesso de nitratos a vegetais, relativamente ao que conseguem absorver, favorece a acumulação deste ião nos seus tecidos. A capacidade de absorção e acumulação de nitratos e nitritos está dependente das fontes exógenas de nitratos, como seja a fertilização azotada. Assim, a disponibilidade de nitratos desempenha um papel muito importante na sua acumulação nas plantas e no próprio crescimento das mesmas (Chen *et al.*, 2004).

Neste estudo pretendeu-se investigar quais os factores que possam afectar o teor de nitratos em alfaces e espinafres, tendo em conta: i) a cultura em estufa *versus* ar livre; ii) o adubo de libertação lenta *versus* adubo convencional; iii) a quantidade de adubo colocada; iv) a hora da colheita; v) o espinafre inteiro *versus* folha de espinafre.

As variedades de alface em estudo foram Judita e Matinale, ambas cultivadas em estufa, e as variedades de espinafre analisadas foram o Walibi (cultivadas em estufa) e o Esmer (cultivado em ar livre).

Importa referir que o adubo convencional de cobertura nas alfaces (lisas e frisadas) não foi colocado por dificuldades técnicas. Estas dificuldades prendem-se com diversos factores: i) o adubo é granulado e as alfaces são colocadas em plástico perfurado, não permitindo o eficiente acesso dos grãos à planta; ii) a disposição dos aspersores nas estufas não permitiu que se realizasse a fertirrigação numa única linha, sem pôr em risco as linhas adjacentes cujas unidades de azoto colocadas eram diferentes; iii) custo e tempo associado à nova implementação do ensaio, bem como a quantidade de adubo disponível no solo, por já ter sido aplicado o adubo de fundo no mesmo.

Tendo em consideração estes factores, ficou decidido que não seria colocado adubo convencional de cobertura em alfaces (estufa). Foi apenas realizada adubação de fundo, com 32 e 36 unidades de azoto.

Outro factor limitante aquando da implementação do plano de adubação foi o tempo de espera dos resultados das análises de solo e de águas de rega das diferentes parcelas. O facto do tempo de espera ser superior a uma semana (prazo dado pelo laboratório), criou alguma ansiedade, na medida em que as parcelas utilizadas neste estudo estavam inseridas em sectores de produção, pelo que não seria possível prolongar a espera de resultados das análises, pondo em causa a rentabilidade do produtor. Deste modo, delineou-se o plano de adubação, antes de obtidos os resultados das análises de solos e de águas de rega. O plano de adubação foi delineado juntamente com o técnico de campo da empresa COMPO e um técnico de campo de um dos fornecedores, tendo em consideração a área das parcelas e a produção esperada.

Dos resultados obtidos neste ensaio de campo nenhum atingiu os teores máximos definidos no Regulamento (CE) nº 1258/2011, em vigor desde 2 de Dezembro de 2011 (Espinafre fresco – 3500 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg; Alface fresca – 5000 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg).

Na tabela 12 e 13, encontram-se resumidas as informações relativas às amostras de espinafres e alfaces recolhidas neste ensaio, respectivamente. De notar a quantidade de nitratos presentes no solo, principalmente em Aruil/estufa (115,6 mg/kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Aruil/ar livre (200,2 mg/kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e Tourinha/estufa (132,4 mg/kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), e a quantidade de nitratos presente na água de rega de Aruil/estufa (150,8 mg/kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Estes teores deveriam ter sido considerados na fase de delineamento do plano de adubação, o que não foi possível, conforme já acima explanado. De acordo com o DR nº 236/98, em vigor desde 1 de Agosto de 1998, o valor máximo recomendado de nitratos na água é de 50 mg /L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, valor de facto inferior ao obtido nas análises de águas realizadas.

Tabela 12 - Informações relativas às amostras de espinafres recolhidas para o estudo

	<b>Espinafre</b>	<b>Espinafre</b>	<b>Espinafre</b>
<b>Variedade</b>	Walibi	Walibi	Esmer
<b>Local</b>	Aruil/estufa	Calvos/estufa	Aruil/Ar livre
<b>Cultura anterior</b>	Nabiça	Terraplanagem	Pousio
<b>Data sementeira</b>	05-Nov	05-Nov	26-Nov
<b>Adubo</b>	A lanço	A lanço	A lanço
<b>Rega</b>	Furo	Furo	-
<b>Data colheita</b>	05-Jan	04-Jan	10-Fev
<b>Hora colheita</b>	8h30/14h00	8h30/14h00	9h30/14h00
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> solo (mg/kg)</b>	115,6	71,7	200,2
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> água (mg/kg)</b>	150,8	30,7	37,3

Tabela 13 - Informações relativas às amostras de alfaces recolhidas para o estudo

	<b>Alface</b>	<b>Alface</b>
<b>Variedade</b>	Matinale	Judita
<b>Local</b>	Tourinha/estufa	Aruil/estufa
<b>Cultura anterior</b>	Feijão verde	Nabiça
<b>Data sementeira</b>	21-Nov	05-Nov
<b>Adubo</b>	A lanço	A lanço
<b>Rega</b>	Poço	Furo
<b>Data colheita</b>	27-Jan	19-Dez
<b>Hora colheita</b>	8h30/14h00	8h30/14h00
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> solo (mg/kg)</b>	132,4	115,6
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> água (mg/kg)</b>	3	150,8

As recolhas de amostras, tanto de espinafre quanto de alface foram realizadas em cada produtor num único dia, repartido em dois momentos distintos - da parte da manhã (início colheita 8h30 – fim colheita 9h30) e da parte da tarde (início da colheita 14h00 – fim da colheita 15h00). A recolha de amostras de espinafre Esmer, foi efectuada às 9h30, pois nesse dia a temperatura do ar encontrava-se demasiado baixa e os campos apresentavam-se cobertos de gelo, dificultando o acesso às plantas.

No produto Alface lisa, os dados evidenciaram diferenças significativas entre as modalidades de adubação ( $F_{5;12} = 12.932$  com  $p = 0,000174$ ) e também entre as medições entre o Período da Manhã e da Tarde ( $F_{1;42} = 15.6$  com  $p = 0,002$ ). Não se verificaram interacções entre o período de colheita e as modalidades de adubação.

No produto Alface frisada verificaram-se diferenças significativas entre as modalidades de adubação ( $F_{5;12} = 6.472$  com  $p = 0,004$ ), mas não entre o período de colheita. Não se verificaram interacções entre modalidades de adubação e período de colheita.

Quanto ao produto Espinafre folhas, os dados sugerem diferenças significativas entre o tipo de local ( $F_{1;47} = 15.059$  com  $p = 0,000324$ ), mas não se verificam diferenças significativas entre as modalidades de adubação, nem se verificam interacções entre o tipo de local e as modalidades de adubação.

No caso do produto Espinafre inteiro, os dados evidenciaram diferenças significativas do teor de nitratos entre o tipo de local (Ar livre *versus* Estufa) ( $F_{1;47} = 19.268$  com  $p = 0,000064$ ) e também entre as medições no período de colheita (Manhã *versus* Tarde) ( $F_{1;47} = 4.597$  com  $p = 0,037$ ). Não se observaram interacções entre o período de colheita, modalidades de adubação ou tipo de local.

Em anexo encontra-se disponibilizado o tratamento de dados inerente a este subcapítulo (Anexo II).

Nos resultados mostrados na figura 19, os dados do espinafre (inteiro e folhas), reportam dados agrupados de dois produtores (estufas e ar livre). Estão representados na figura 19

os valores médios de teores de nitratos em alface lisa, alface frisada, espinafre inteiro e folhas de espinafre.

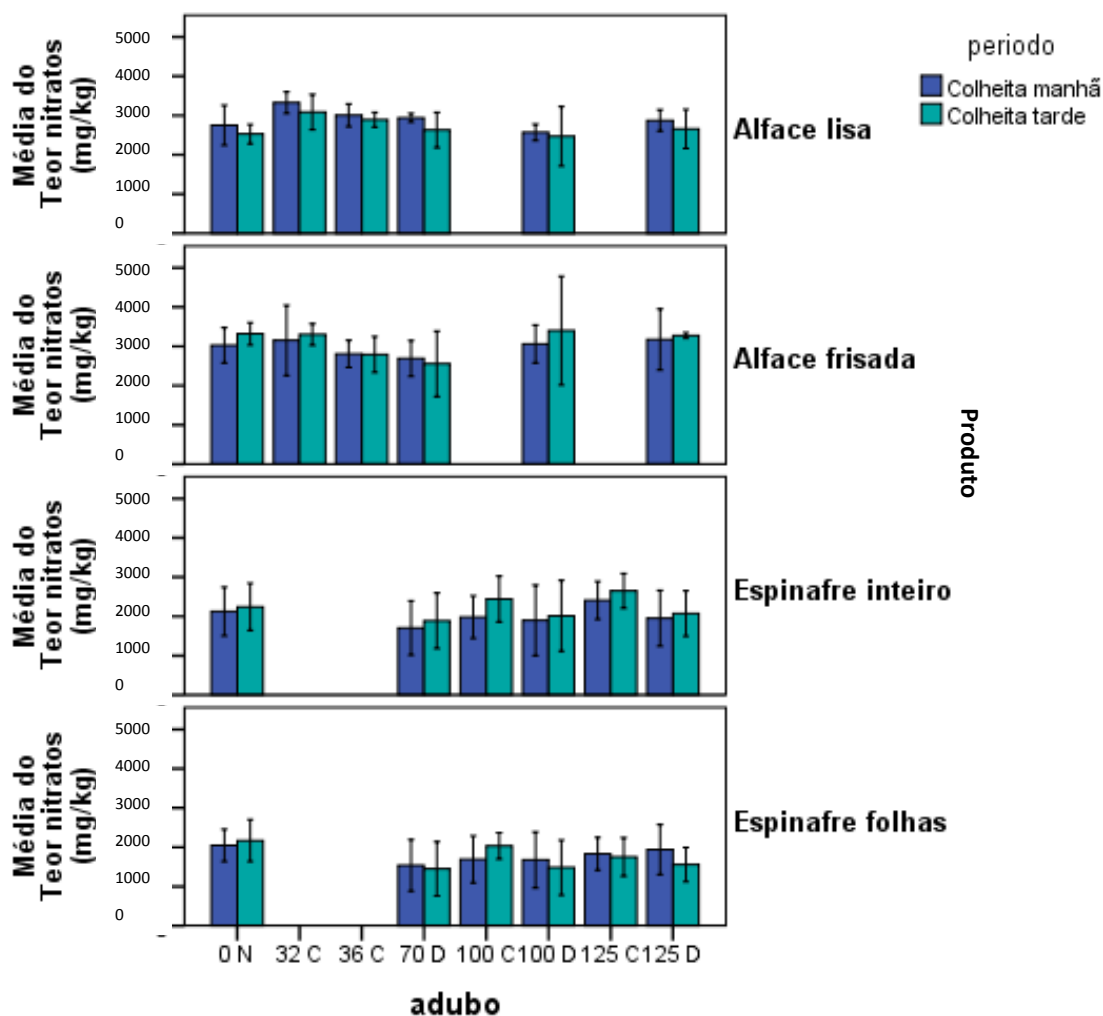


Figura 19 - Distribuição dos valores médios do teor de nitratos (mg/kg) e respectivos intervalos de confiança de 95% por tipo de adubo e período de colheita nos diferentes produtos

Ao observar a figura 19, pode-se constatar que as alfaces (tanto lisa como frisada) apresentam teores superiores aos espinafres. Estes resultados vêm no mesmo sentido dos estudos de Mor, Sahindokuyucu & Erdogan (2010), que referem que a alface tende a acumular teores de nitratos superiores, quando comparada ao espinafre.

No entanto, por seu lado, Muramoto (1999) refere que o espinafre é muitas vezes visto como o vegetal que tendencialmente mais acumula nitratos, devido à sua estrutura, mais concretamente devido à consistência dos pecíolos por onde o ião nitrato passa e se acumula e às folhas, onde este ião é reduzido e onde ocorre a assimilação. Certos vegetais devido a um excessivo sistema de assimilação, a um deficiente sistema de redução, ou à combinação destes sistemas, tendem a acumular mais nitratos que outros.

Relativamente à hora da colheita, também foram registadas diferenças, no que diz respeito ao tipo de alface. As alfaces lisas acumulam mais nitratos na colheita realizada de manhã, enquanto as alfaces frisadas apresentam um teor de nitratos superior na colheita da tarde. De acordo com Krohn *et al.* (2003), não existem diferenças consideráveis na variedade de alfaces lisa e frisada, o que importa é a diferença de resposta das variedades aos tratamentos a que foram submetidas, evidenciando a influência do factor genético sobre o acúmulo de nitrato. Os mesmos autores referem que apesar do factor genético ser importante na tendência de acumulação de nitratos, também se devem considerar outros factores, como o tipo de cultura, factores ambientais e a própria instalação da cultura.

Observando a figura 20, relativamente à alface lisa, verifica-se que no caso da adubação convencional, existe uma maior acumulação de nitratos nas plantas, quando comparada com o adubo Duratec. De facto, a modalidade de adubação 32 C (adubo convencional de fundo com 32 unidades de azoto) é a que regista o teor mais elevado de nitratos em alfaces lisas, apesar de apresentar menos unidades de azoto que qualquer outro adubo Duratec. Não se encontram explicações para o sucedido, mas o facto do próprio solo já ter disponíveis nitratos aquando da implementação do plano de adubação pode de alguma forma influenciar estes resultados. Esta suposição também poderá ser válida para tentar explicar o facto de a modalidade de adubação 0 N (adubo de fundo com 0 unidades de azoto), não ser o registo de menor concentração de nitratos em vegetais analisados neste estudo.

Observando os resultados dos espinafres, verifica-se que as folhas apresentam teores de nitratos inferiores quando comparados com os espinafres inteiros. A modalidade de adubação em que se registou o valor mais baixo de nitratos, foi a 70 D (adubo Duratec com 70 unidades de azoto), tanto nas folhas de espinafre como em espinafres inteiros. Estes dados podem sugerir que a partir de 70 unidades de azoto, as plantas possam adquirir azoto em excesso que tendem a acumular nos seus tecidos.

Os resultados expostos na figura 20, relativos aos dados de espinafres de estufa são referentes a dois produtores, apresentando-se os dados agrupados. Os dados representados no gráfico representam os valores médios de teores de nitratos em espinafres de ar livre e estufa.

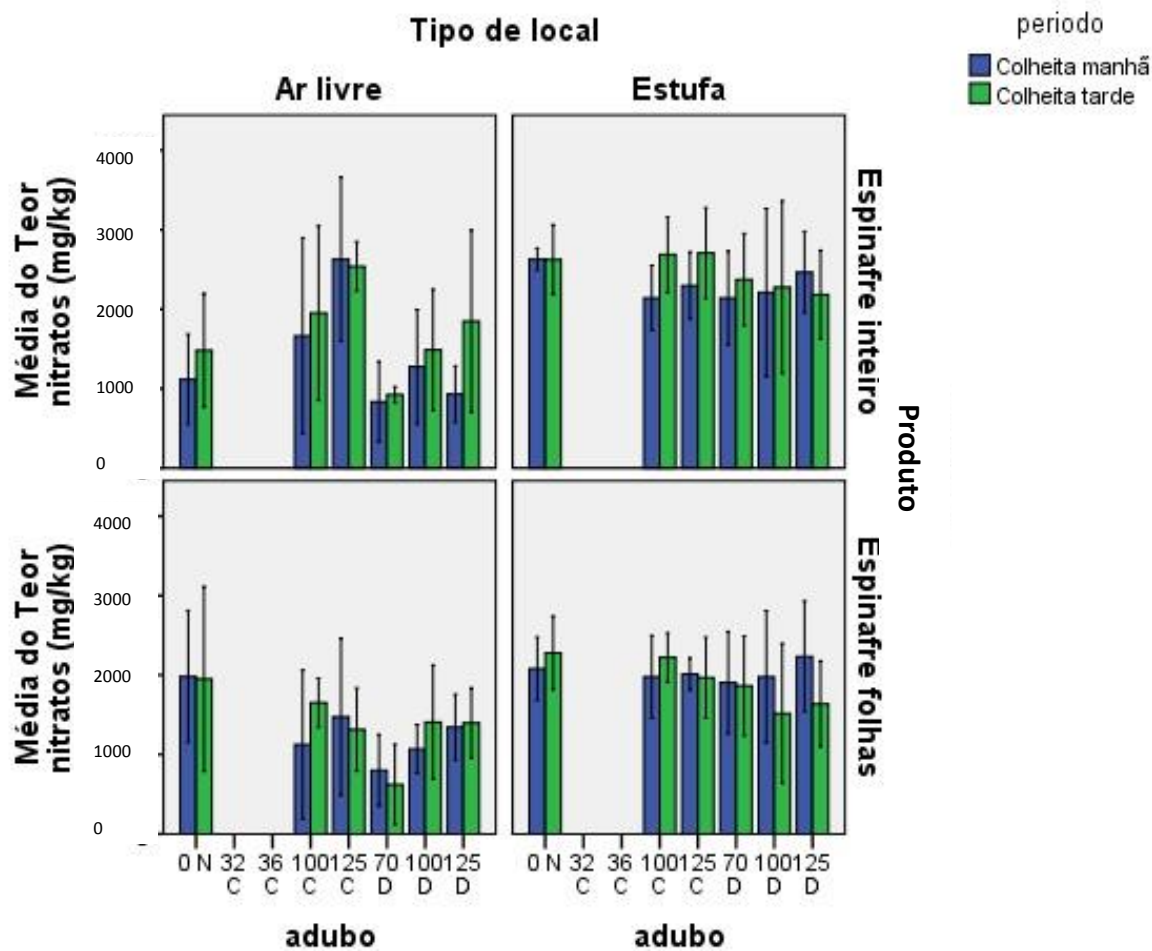


Figura 20 - Distribuição dos valores médios do teor de nitratos (mg/kg) e respectivas barras de erro por tipo de adubo e produto (espinafre inteiro/espinafre folhas)

Ao analisar os resultados da figura 20, observa-se que a cultura em estufa registou teores de nitratos geralmente superiores quando comparados com os teores registados da cultura em ar livre. Vieira, Vasconcelos & Monteiro (1998) verificaram que em estufa os vegetais tendem a acumular mais nitratos do que nas culturas realizadas em ar livre, tendo verificado que no ar livre a acumulação ocorre mais lentamente. De acordo com Muramoto (1999), existem diversos estudos que mostram a influência da luminosidade na acumulação de nitratos em plantas, ao afectar a actividade da *nitrato redutase*. Este efeito pode ser explicado, porque nas estufas existe menor intensidade luminosa, o período de luz diária é menor, com temperaturas mais elevadas que ao ar livre, podendo promover a mineralização e nitrificação do azoto nos solos das estufas durante os meses mais frios.

Quando se analisam os teores de nitratos em ar livre, não se consegue inferir qual o produto (folhas de espinafre ou espinafre inteiro) que registou um teor de nitratos superior. No entanto, importa referir que o valor mais baixo observado no ar livre foi na modalidade de 70 D (adubo duratec com 70 unidades de azoto), e que o valor mais elevado registado foi na

modalidade 125 C (adubo convencional com 125 unidades de azoto), tanto em amostras de folhas de espinafre como em amostras de espinafres inteiros. Isto pode sugerir que o adubo convencional é o menos indicado para adubações de vegetais susceptíveis de acumular nitratos, por libertar de uma forma não controlada o azoto, tornando-se assim o azoto mais facilmente disponível para as plantas assimilarem e acumularem nitratos nos seus tecidos. No entanto, serão necessários estudos mais aprofundados sobre este tema. De acordo com a bibliografia consultada, não existem conclusões definitivas, e muitas vezes aquilo que é relatado em teoria não está de acordo com os resultados obtidos.

Relativamente à hora da colheita, de um modo geral, a colheita de amostras de espinafre inteiro (tanto de estufa como de ar livre) da parte da manhã registou teores de nitratos mais baixos. Este facto vem reforçar os estudos de Turazi *et al.* (2006), que referem que em colheitas realizadas à tarde, os vegetais apresentam um teor de nitratos superior, devido à existência de menos luminosidade, o que se traduz numa reduzida actividade da *nitrato redutase*.

Quanto ao tipo de produto, as amostras de folhas de espinafre registaram teores inferiores de nitratos, em relação às amostras de espinafres inteiros, reforçando os estudos de Chan (2011), que sugere que se retirem ou cortem os caules, na medida em que se traduz numa redução do teor de nitratos em alfaces e espinafres. Também Carranca (2000) chegou às mesmas conclusões, sugerindo que o corte de caules pode ser um método de redução do teor de nitratos nas folhas de espinafre.

De um modo geral, as modalidades de adubação utilizadas neste ensaio contrariam os estudos relatados na bibliografia, não se encontrando justificação para o seguinte. De facto, Chen *et al.* (2004) realizaram ensaios para estudar o efeito do fornecimento de adubos azotados na acumulação de nitratos em espinafres, e concluíram que à medida que se aumentava a dosagem de adubo azotado no solo, maior a acumulação de nitratos nos vegetais. Também Mantovani, Ferreira & Cruz (2005) efectuaram ensaios de análise da produção de alfaces em função da adubação azotada e verificaram que à medida que a dose de adubo aumentava, maiores concentrações de nitratos nas alfaces, o que não é verificado neste ensaio.

Em projectos futuros deveria ter-se em consideração os valores de produção, os teores de azoto (peso seco), por forma a poder relacionar a quantidade de adubo colocada em solo aquando da adubação e o que realmente a planta adquire. Dever-se-ia igualmente considerar as dotações de água de rega, uma vez que, de acordo com alguns dos resultados de análise de água obtidas, a própria água já apresenta níveis de nitratos consideráveis, podendo desta forma influenciar os resultados. Outro dos aspectos importantes, em trabalhos futuros, poderá prender-se com a selecção de parcelas onde possa ocorrer uma lixiviação dos solos, de modo a garantir que nenhum elemento presente

do solo possa afectar os níveis de nitratos em vegetais, bem como efectuar o plano de adubação, somente após os resultados de análises de solo e água.

Apesar das limitações existentes neste ensaio, este trabalho revelou-se de extrema importância por ter um envolvimento de área académica, da área comercial e da área da produção, permitindo que num futuro próximo as três partes se aliem em novos ensaios e que consigam em comum eliminar ou prevenir algumas das dificuldades em não alcançar os limites máximos estabelecidos por Lei, a segurança alimentar dos consumidores e os interesses de todas as partes envolvidas. Este trabalho serviu de ponto de partida para realizar um protocolo de elaboração de novos ensaios, tendo ficado certo das dificuldades e possíveis entraves à sua elaboração. Os teores de nitratos em vegetais encontram-se dependentes de diversos factores, entre os quais alguns relacionados com a própria planta, com o solo e factores ambientais (temperatura e intensidade luminosa), pelo que, são essenciais umas boas práticas agrícolas (por ser um factor manipulável) de modo a garantir e manter os níveis de nitratos dentro dos limites estabelecidos por Lei (Correia, 2009; Andrade & Mendes, 2011).



#### 4 Considerações finais

Após a realização destes ensaios e apesar de todas as condicionantes mencionadas, concluiu-se que a maioria das amostras de vegetais recolhidas não atingiu os limites máximos estabelecidos na legislação.

Dos resultados dos ensaios realizados preliminarmente e em campo, pode concluir-se que as folhas de espinafre apresentam menor teor de nitratos que os espinafres inteiros. O corte de folhas de espinafre parece ser uma medida eficaz na redução do teor de nitratos veiculado por estes. No futuro seria de considerar alargar este tipo de estudos a outros vegetais que sejam susceptíveis de acumular nitratos nos seus tecidos, como é o caso da alface, principalmente por ter sido em alface que se registaram os teores de nitratos superiores.

O ensaio realizado em estufa e em ar livre permite concluir que a cultura de espinafre realizada em estufa apresenta teores de nitratos superiores relativamente à cultura de espinafre efectuada em ar livre. A causa desta diferença pode atribuir-se às condições específicas a que as culturas em estufa se encontram sujeitas, nomeadamente, a temperatura e intensidade luminosa, que de acordo com diversos autores, são factores que podem influenciar a acumulação de nitratos em vegetais.

Os resultados dos ensaios de campo, não permitem chegar a uma conclusão geral sobre o tipo de adubo. Contudo, de acordo com os resultados obtidos, poder-se-á sugerir que o adubo convencional possa ser o menos adequado para este tipo de culturas, pois foi o que de um modo geral, implicou uma maior acumulação de nitratos em vegetais. Deste modo, os ensaios deveriam ser repetidos, com maior número de replicados, por forma a melhor compreender qual o efeito que a adubação tem sobre a acumulação de nitratos nos vegetais, e tentar adequar o melhor possível o plano de adubação aos solos utilizados, por forma a se obter o melhor rendimento e garantir a segurança alimentar dos consumidores.

A hora a que se realiza a colheita não permitiu tirar ilações. Relativamente às alfaces frisadas verificou-se uma maior acumulação de nitratos da parte da tarde, no caso da alface lisa existe maior acumulação de nitratos da parte da manhã. Quanto aos espinafres também não existe grande consenso. No caso dos espinafres inteiros tendem a acumular mais nitratos na colheita realizada à tarde, e as folhas de espinafres acumulam mais nitratos da parte da manhã. De modo a tentar compreender qual a influência da hora a que se realiza a colheita no teor de nitratos acumulados em vegetais, dever-se-iam efectuar novos ensaios.

Apesar de certos vegetais serem susceptíveis de acumular nitratos nos seus tecidos, este facto não deve ser considerado um risco em termos de efeitos nefastos no Homem, se pensarmos que estes mesmos vegetais podem ser ricos em antioxidantes. Assim, revela-se prioritário que se aprofunde o conhecimento do metabolismo dos nitratos e dos seus

potenciais efeitos na saúde humana, por forma a garantir uma melhor compreensão dos riscos associados à ingestão de nitratos provenientes da dieta.

## 5 Bibliografia

Almeida, D. (2006). Manual de culturas hortícolas Volume I. *Editorial Presença*, 158-229.

Andrade, A. & Mendes, M. (2011). Avaliação do teor de nitratos em produtos hortícolas, no âmbito do plano nacional de colheita de amostras realizado pela ASAE. *Riscos e alimentos*, 2, 8-19.

Beninni, E., Takahashi, H., Neves, C. & Fonseca, I. (2002). Teor de nitrato em alface cultivada em sistemas hidropónico e convencional. *Horticultura Brasileira*, 20 (2), 183-186.

Bredemeier, C. & Mundstock, C. (2000). Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. *Ciência rural*, 30(2), 365-372.

Carranca, C. (2000). A eficiência do azoto no espinafre. Nutrição azotada do espinafre. Investigação agrária – INIA, 16.

Castro, E., Mañas, P. & Heras, J. (2009). Nitrate content in lettuce (*Lactuca sativa L.*) after fertilization with sewage sludge and treated wastewater irrigation. *Food Additives and Contaminants*, 26 (02), 172-179.

Chan, T. (2011). Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. *Toxicology letters*, 200, 107-108.

Chen, B., Wang, Z., Li, S., Wang, G., Song, H. & Wang, X. (2004). Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*, 167, 635-643.

Correia, M. (2009). Avaliação de nitratos e nitritos em vegetais. *Segurança e qualidade alimentar*, 7, 14-16.

Correia, M., Barroso, Â., Barroso, M., Soares, D. & Oliveira, M. (2010). Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. *Food Chemistry*, 120, 960-966.

Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto de 1998, *Diário da República n.º176 – I série A*. 3676-3722.

EN 12014-4 (2005) *European Standard*. European Committee for Standardization.

European Food Safety Authority. (2008). Nitrates in vegetables. Scientific opinion of the panel on contaminant in the food chain. *The EFSA Journal*, 689, 1-79.

Faquin, V. & Andrade, A. (2004). Nutrição mineral e diagnose do estado nutricional de hortaliças. *Lavras: UFLA/FAEPE*, 88.

Forde, B. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1465), 219-235.

Guadagnin, S., Rath, S. & Reyes, F. (2005). Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. *Food Additives and Contaminants*, 22 (12), 1203-1208.

Hord, N., Tang, Y. & Bryan, N. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 1-10.

Katan, M. (2009). Nitrate in foods: harmful or healthy? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 11.

Krohn, N., Missio, R., Ortolan, M., Burin, A., Steinmacher, D. & Lopes, C. (2003). Teores de nitrato em folhas de alface em função do horário de coleta e do tipo de folha amostrada. *Horticultura Brasileira*, 21(2), 216-219.

Lastra, O., Tapia, M., Razeto, B. & Rojas, M. (2009). Response of hydroponic lettuce cultivars to diferente treatments of nitrogen: growth and foliar nitrate content. *IDESIA*, 27 (1), 83-89.

L'Hirondel, J. & L'Hirondel, J.-L. (2002). *Nitrate and man: toxic, harmless or beneficial?* New York: CABI Publishing.

Lopes, C., Tsuruda, J., Ianckiewicz, A., Rodini, F., Basso, J. & Takahashi, H. (2011). Influence of the harvesting time in the level of nitrate in hydroponic lettuce. *Semina: Ciências Agrárias*, 32 (1), 63-68.

López, A., Jesus, H., Rocha, M., Fries, M., Urquiaga, S. & Alves, B. (1998). Diagnóstico do potencial de nitrificação e desnitrificação em solo sob pastagens de *Bracharia sp.* E solo de plantio directo e convencional. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 78.

Luciński, R., Polcyn, W. & Ratajczak, L. (2002). Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* – legumes. *Acta Biochimica Polonica*, 49 (2), 537-546.

Maldonado, J., Agüera, E. & Vicente, R. (2000). Asimilación del nitrógeno y del azufre. In J. Azcón-Bieto, & M. Talón (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal*, 235-246. Barcelona: Edicions Universitat de Barcelona.

Mantovani, J., Ferreira, M. & Cruz, M. (2005). Produção de alface e acúmulo de nitrato em função da adubação nitrogenada. *Horticultura brasileira*, 23 (3), 758-762.

Martínez-Espinosa, R., Cole, J., Richardson, D., Watmough, N. (2011). Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions*, 39, 175-178.

Mor, F., Sahindokuyucu, F. & Erdogan, N. (2010). Nitrate and nitrite contents of some vegetables consumed in South Providence of Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(15), 2013-2016.

Muramoto, J. (1999). Comparison of nitrate content in leafy vegetables from organic and conventional farms in California. Center of Agroecology and Sustainable Food Systems, University of California (acesso em 20/02/2012 <http://www.agroecology.org/documents/Joji/leafnitrate.pdf>).

Ott, K., Koenig, R. & Miles, C. (2008). Influence of plant part on nitrate concentration in lettuce and spinach. *International Journal of Vegetable Science*, 14 (4), 351-361.

Pardo-Marín, O., Yusà-Pelechà, V., Villalba-Martín, P. & Perez-Dasí, J. (2010). Monitoring programme on nitrates in vegetables and vegetable-based baby foods marketed in region of Valencia, Spain: levels and estimated daily intake. *Food Additives and Contaminants*, 27 (4), 478-486.

Pavlou, G., Ehalotis, C. & Kavvadias, V. (2007). Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Scientia Horticulturae*, 111, 319-325.

Powlson, D., Addiscott, T., Benjamin, N., Cassman, K., Kok, T., Grinsven, H., L'hirondel, J.; Avery, A. & Kessel, C. (2008). When does nitrate become a risk for humans? *Journal of Environmental Quality*, 37, 291-295.

Ramos, C. (2001). El albonado nitrogenado de los cultivos hortícolas. *Vida Rural*, 121, 46-48

Regulamento (CE) nº 1258/2011, de 2 de Dezembro de 2011, *Jornal Oficial da União Europeia* L. 320/15. Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia.

Rodrigues, M. & Coutinho, J. (1995). Eficiência de utilização do azoto pelas plantas. Série de estudos do Instituto Politécnico de Bragança, 5-48.

Rodrigues, M. (2006). Utilização de fertilizantes e qualidade dos produtos vegetais: O problema dos nitratos. Comunicação do Curso de Qualidade e Segurança Alimentar em produtos de Origem Vegetal, Escola Superior Agrária de Bragança, 17- 22.

Santamaria, P. (2006). Review nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the science of food and agriculture*, 86, 10-17.

Shao-ting, D., Yong-song, Z. & Xian-yong, L. (2007). Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. *Agricultural Sciences in China*, 6 (10), 1246-1255.

Shimada, Y. & Ko, S. (2004). Nitrate in vegetables. *Chugokugakuen Journal*, 3, 7-10.

Speijers, J., Brandt, P. (2003). Nitrite (and potencial endogenous formation of N-nitroso compounds. *WHO FOOD ADDITIVES SERIES*: 50. (Acesso em 17.05.2012 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je05.htm>)

Tamme, T., Reinik, M., Juhkam, K. & Tenno, T. (2006). Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by Estonian population. *Food additives and contaminants*, 23(04), 355-361.

Turazi, C., Junqueira, A., Oliveira, S. & Borgo, L. (2006). Acúmulo de nitrato em alface em função da adubação, horário de colheita e tempo de armazenamento. *Horticultura brasileira*, 24, 65-70.

Vieira, I., Vasconcelos, E. & Monteiro, A. (1998). Nitrate accumulation, yield and leaf quality of turnip greens in response to nitrogen fertilisation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51, 249-258.

Weightman, R., Dyer, C., Buxton, J. & Farrington, D. (2006). Effects of light level, time of harvest and position within field on the variability of tissue nitrate concentration in commercial crops of lettuce (*Lactuca sativa*) and endive (*Cichorium endiva*). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 23 (5), 462-469.

## ANEXO I



## Estatísticas descritivas relativas aos dados preliminares

### Teor nitratos (mg/kg)

Produtor	Variedade	Data	N	Média	Mediana	Mínimo	Maximo	Desvio padrão	Erro padrão da média (SE)	
A	Espinafre inteiro	28 Nov 2011	2	809.00	809.00	764	854	63.640	45.000	
		31 Jan 2012	2	2027.00	2027.00	2002	2052	35.355	25.000	
		Total	4	1418.00	1428.00	764	2052	704.468	352.234	
	Espinafre folhas	28 Nov 2011	2	436.50	436.50	420	453	23.335	16.500	
		31 Jan 2012	2	2205.50	2205.50	2061	2350	204.354	144.500	
		Total	4	1321.00	1257.00	420	2350	1028.213	514.107	
	Total	28 Nov 2011	4	622.75	608.50	420	854	218.595	109.297	
		31 Jan 2012	4	2116.25	2056.50	2002	2350	157.980	78.990	
		Total	8	1369.50	1428.00	420	2350	817.602	289.066	
	B	Espinafre inteiro	28 Nov 2011	2	7551.50	7551.50	7044	8059	717.713	507.500
			31 Jan 2012	2	2123.50	2123.50	1883	2364	340.118	240.500
			Total	4	4837.50	4704.00	1883	8059	3167.227	1583.613
Espinafre folhas		28 Nov 2011	2	4376.00	4376.00	4299	4453	108.894	77.000	
		31 Jan 2012	2	2181.00	2181.00	2180	2182	1.414	1.000	
		Total	4	3278.50	3240.50	2180	4453	1268.843	634.421	
Total		28 Nov 2011	4	5963.75	5748.50	4299	8059	1880.671	940.336	
		31 Jan 2012	4	2152.25	2181.00	1883	2364	199.156	99.578	
		Total	8	4058.00	3331.50	1883	8059	2384.019	842.878	
C		Espinafre inteiro	28 Nov 2011	2	3833.50	3833.50	3743	3924	127.986	90.500
			31 Jan 2012	2	2087.50	2087.50	1878	2297	296.278	209.500
			Total	4	2960.50	3020.00	1878	3924	1025.130	512.565
	Espinafre folhas	28 Nov 2011	2	3695.50	3695.50	3636	3755	84.146	59.500	
		31 Jan 2012	2	2421.50	2421.50	2138	2705	400.930	283.500	
		Total	4	3058.50	3170.50	2138	3755	772.636	386.318	
	Total	28 Nov 2011	4	3764.50	3749.00	3636	3924	119.031	59.515	
		31 Jan 2012	4	2254.50	2217.50	1878	2705	346.449	173.225	
		Total	8	3009.50	3170.50	1878	3924	842.003	297.693	
	Total	Espinafre inteiro	28 Nov 2011	6	4064.67	3833.50	764	8059	3038.327	1240.392
			31 Jan 2012	6	2079.33	2027.00	1878	2364	206.990	84.503
			Total	12	3072.00	2174.50	764	8059	2300.119	663.987
Espinafre folhas		28 Nov 2011	6	2836.00	3695.50	420	4453	1884.429	769.315	
		31 Jan 2012	6	2269.33	2181.00	2061	2705	233.483	95.319	
		Total	12	2552.67	2266.00	420	4453	1313.955	379.306	
Total		28 Nov 2011	12	3450.33	3749.00	420	8059	2494.383	720.066	
		31 Jan 2012	12	2174.33	2159.00	1878	2705	232.593	67.144	
		Total	24	2812.33	2239.50	420	8059	1851.034	377.841	

## Estatísticas descritivas relativas aos dados preliminares de 16 de Maio de 2012

### Teor nitratos (mg/kg)

Variedade	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Erro padrão da média (SE)
Espinafre inteiro	12	3072,00	2174,50	764	8059	2300,119	663,987
Espinafre folhas	12	2552,67	2266,00	420	4453	1313,955	379,306
Total	24	2812,33	2239,50	420	8059	1851,034	377,841

## ANEXO II

## Estatísticas descritivas relativas às amostras dos ensaios de campo

### Teor nitratos (mg/kg)

Variedade	Tipo de local	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Erro padrão da média (SE)
Alface lisa	Estufa	36	2811.56	2844.50	2157	3456	281.300	46.883
	Total	36	2811.56	2844.50	2157	3456	281.300	46.883
Alface frisada	Estufa	36	3045.39	3002.50	2234	3919	345.234	57.539
	Total	36	3045.39	3002.50	2234	3919	345.234	57.539
Espinafre inteiro	Ar livre	36	1558.06	1452.00	333	3606	813.695	135.616
	Estufa	72	2395.13	2502.00	555	3687	733.186	86.407
	Total	108	2116.10	2180.00	333	3687	854.657	82.239
Espinafre folhas	Ar livre	36	1345.22	1250.50	121	2637	633.255	105.542
	Estufa	72	1972.57	2073.00	465	3416	692.874	81.656
	Total	108	1763.45	1866.00	121	3416	733.487	70.580
Total	Ar livre	72	1451.64	1343.00	121	3606	731.815	86.245
	Estufa	144	2183.85	2244.00	465	3687	741.762	61.813
	Total	216	1939.78	1977.00	121	3687	813.944	55.382

## Alface lisa

### Tests of Between-Subjects Effects

Measure: teor\_nitratos

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Intercept	2,846E8	1	2,846E8	10472,797	,000	,999
Adubo	1756933,222	5	351386,644	12,932	0,000174	,843
Error	326072,667	12	27172,722			

### Tests of Within-Subjects Effects

Measure: Teor\_nitratos

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
factor1	Sphericity Assumed	361201.000	1	361201.000	15.600	.002	.565
	Greenhouse-Geisser	361201.000	1.000	361201.000	15.600	.002	.565
	Huynh-Feldt	361201.000	1.000	361201.000	15.600	.002	.565
	Lower-bound	361201.000	1.000	361201.000	15.600	.002	.565
factor1 * adubo	Sphericity Assumed	47484.000	5	9496.800	.410	.833	.146
	Greenhouse-Geisser	47484.000	5.000	9496.800	.410	.833	.146
	Huynh-Feldt	47484.000	5.000	9496.800	.410	.833	.146
	Lower-bound	47484.000	5.000	9496.800	.410	.833	.146
Error(factor1)	Sphericity Assumed	277852.000	12	23154.333			
	Greenhouse-Geisser	277852.000	12.000	23154.333			
	Huynh-Feldt	277852.000	12.000	23154.333			
	Lower-bound	277852.000	12.000	23154.333			

## Alface frisada

### Tests of Between-Subjects Effects

Measure: Teor\_nitratos

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	3,339E8	1	3,339E8	5092,731	,000
Adubo	2121428,556	5	424285,711	6,472	,004
Error	786717,000	12	65559,750		

## Espinafre folhas

### Tests of Between-Subjects Effects

Measure: Teor\_nitratos  
Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Intercept	2.642E8	1	2.642E8	421.193	.000	.900
adubo	4262149.380	5	852429.876	1.359	.257	.126
tipodelocal	9445548.894	1	9445548.894	15.059	.000324	.243
Error	29479924.99	47	627232.447			

## Espinafre inteiro

### Tests of Within-Subjects Effects

Measure: Teor\_nitratos

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
factor1	Sphericity Assumed	1256600.116	1	1256600.116	4.597	.037	.089
	Greenhouse-Geisser	1256600.116	1.000	1256600.116	4.597	.037	.089
	Huynh-Feldt	1256600.116	1.000	1256600.116	4.597	.037	.089
	Lower-bound	1256600.116	1.000	1256600.116	4.597	.037	.089
factor1 * adubo	Sphericity Assumed	401970.639	5	80394.128	.294	.914	.030
	Greenhouse-Geisser	401970.639	5.000	80394.128	.294	.914	.030
	Huynh-Feldt	401970.639	5.000	80394.128	.294	.914	.030
	Lower-bound	401970.639	5.000	80394.128	.294	.914	.030
factor1 * tipodelocal	Sphericity Assumed	110840.042	1	110840.042	.406	.527	.009
	Greenhouse-Geisser	110840.042	1.000	110840.042	.406	.527	.009
	Huynh-Feldt	110840.042	1.000	110840.042	.406	.527	.009
	Lower-bound	110840.042	1.000	110840.042	.406	.527	.009
Error(factor1)	Sphericity Assumed	12846878.07	47	273337.831			
	Greenhouse-Geisser	12846878.07	47.000	273337.831			
	Huynh-Feldt	12846878.07	47.000	273337.831			
	Lower-bound	12846878.07	47.000	273337.831			

### Tests of Between-Subjects Effects

Measure: Teor\_nitratos

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Intercept	375063276.1	1	375063276.1	429.740	.000	.901
adubo	5812944.491	5	1162588.898	1.332	.267	.124
tipodelocal	16816446.12	1	16816446.12	19.268	.000064	.291
Error	41020137.77	47	872768.889			