

TÍTULO DA OPERAÇÃO

**Produção de arroz com baixo teor de arsénio utilizando
tecnologias de Agricultura de Precisão**

(Projecto PRODER Nº 12416)

Relatório Final
(versão simplificada)

1 de Janeiro 2010 a 31 de Março de 2015

Maio de 2015



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

Equipa da Universidade de Évora que participou ou que colaborou neste projecto

Nome	Grau académico
José Rafael Silva (coord. na U. Évora)	Agregação
Carlos Alexandre	Doutoramento
Adélia Sousa	Doutoramento
Renato Coelho	Doutoramento
Luis Leopoldo	Agregação
Maria do Rosário Martins	Doutoramento
José Mirão	Doutoramento
Jorge Delgado Nunes (bolseiro)	Doutoramento



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

Índice

Equipa da Universidade de Évora que participou neste projecto	2
Índice de Figuras	5
Índice de Quadros	6
Resumo.....	8
1. Introdução.....	9
2. Materiais e Métodos	10
2.1. Breve caracterização climática dos finais de verão.....	10
2.2. Métodos analíticos para a determinação de As.....	11
2.2.1. ARROZ.....	11
2.2.2. SOLO	12
2.2.3. Análises realizadas	13
2.2.4. Comparação de métodos analíticos.....	14
2.3. Ensaio experimental.....	16
2.3.1. Ensaio em vasos (2014)	16
2.3.2. Incubações em laboratório	16
2.3.3. Enzimas do solo	17
2.3.4. Análise estatística.....	18
3. Caracterização à escala regional (2010 e 2011).....	19
3.1. Amostragem.....	19
3.2. ARROZ.....	20
4. Caracterização à escala da parcela (2012 a 2014)	22
4.1. Amostragem (amostras georreferenciadas)	22
4.2. ARROZ.....	24
4.3. SOLO.....	31
4.3.1. Caracterização geral do solo das parcelas.....	31
4.3.2. Levantamento geoelectrico.....	31
4.3.3. Teor de As nas amostras de solo georreferenciadas	34



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

4.4.	Água de rega e solução do solo.....	38
5.	Ensaio.....	39
5.1.	Ensaio em vasos (2014)	39
5.2.	Incubações em laboratório	42
5.3.	Enzimas do solo	45
5.4.	Outros ensaios.....	46
6.	Discussão adicional de resultados.....	47
6.1.	As no arroz (grão) vs. As no solo	47
6.2.	As no arroz e condutividade eléctrica aparente do solo.....	48
7.	Considerações finais.....	50
8.	Agradecimentos	51
9.	Referências bibliográficas	51



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

Índice de Figuras

Figura 1 - Valores médios de As em 9 amostras de arroz determinados por HG-AAS e GF-AAS em relação aos valores determinados por ICP-MS.....	15
Figura 2 - Localização e classes do teor de arsénio nas amostras de arroz recolhidas em 2010.	19
Figura 3 – Localização e classes do teor de arsénio nas amostras de arroz recolhidas em 2011.	20
Figura 4 – Representação da distribuição de todas as amostras de arroz recolhidas em 2010 e 2011 (A) e apenas das amostras correspondentes a parcelas comuns aos dois anos (B).21	
Figura 5 – Localização dos 4 canteiros seleccionados para a recolha de várias amostras de solo e de arroz georreferenciadas em cada canteiro.	23
Figura 6 – Representação da distribuição do As no arroz (ppb ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) medido em amostras compostas por 4 amostras simples colhidas num quadrado de 6x6 m (centro georreferenciado).	26
Figura 7 – Localização e valores de As nas amostras de arroz no canteiro 11 no ano 2012.	27
Figura 8 – Localização e valores de As nas amostras de arroz no canteiro 13 nos anos 2012, 2013 e 2014.	28
Figura 9 – Localização e valores de As nas amostras de arroz no canteiro 76 nos anos 2012, 2013 e 2014.	29
Figura 10 – Localização e valores de As nas amostras de arroz no canteiro 86, anos 2012, 2013 e 2014.	30
Figura 11 – Mapa da conductividade eléctrica aparente do talhão 11 e locais de amostragem de arroz e solo para análise do teor de As.....	32
Figura 12 – Mapa da conductividade eléctrica aparente do talhão 13 e locais de amostragem de arroz e solo para análise do teor de As.....	32
Figura 13 – Mapa da conductividade eléctrica aparente do talhão 76 e locais de amostragem de arroz e solo para análise do teor de As.....	33
Figura 14 – Mapa da conductividade eléctrica aparente do talhão 86 e locais de amostragem de arroz e solo para análise do teor de As.....	33
Figura 15 – Valores médios do As (ppm) do solo obtido em 5 extracções sequenciais.	36
Figura 16 – Valores médios do As (ppm) do solo obtido em 5 extracções sequenciais, expresso em valor relativo ao total extraído.	36
Figura 17 – Média do As (ppm) do solo, de todas as parcelas, obtido em 5 extracções sequênciais, para cada ano.	37



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

Figura 18 – Teor médio de As no grão de arroz apenas na modalidade com alagamento.....	39
Figura 19 – Teor médio de As nas folhas de arroz.	40
Figura 20 – Teor médio de As na raiz de arroz.....	41
Figura 21 – Evolução temporal do potencial redox (Eh em mv) na solução do solo dos canteiros 13 e 76.....	43
Figura 22 – Evolução temporal do pH medido na solução do solo dos canteiros 13 e 76.....	43
Figura 23 – Evolução temporal do teor de As (ppb) na solução do solo dos canteiros 13 e 76, em incubação aberta.	44
Figura 24 – Evolução temporal do teor de As (ppb) na solução do solo dos canteiros 13 e 76, em incubação fechada.	44
Figura 25 – Relações entre o teor de As no grão de arroz e o teor de As extraído do solo (fases extractivas 1 a 4). Valores de todas as amostragens comuns aos canteiros 11, 13, 76 e 86 realizadas em 201, 2013 e 2014.	47
Figura 26 - Condutividade eléctrica aparente do solo e sua relação com o teor de arsénio no grão de arroz nos canteiros 11, 13, 76 e 86 das amostras recolhidas em 2012 e 2013. ..	48
Figura 27 – Condutividade eléctrica aparente do solo e sua relação com o teor de arsénio no grão de arroz de todos os talhões analisada separadamente para os anos 2012 e 2013.	49

Índice de Quadros

QUADRO 1 – Dados de temperatura e precipitação no período de Agosto-Outubro de 2010 a 2014. Dados para a região da Lezíria do Tejo obtidos a partir dos Boletins Climatológicos Mensais do IPMA. Assinalados a negrito os maiores desvios relativamente às normais de 1971-2000.	10
QUADRO 2 –Etapas do método adoptado para a extracção sequencial de As do solo.....	13
QUADRO 3 – Número de análises ao arsénio realizadas em amostras de arroz e de solo.....	14
QUADRO 4 – Comparação dos resultados de análises ao As em 3 subamostras de amostras homogéneas de 3 parcelas, realizadas em 3 laboratórios diferentes. Valores em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ou ppb).....	15
QUADRO 5 – Parâmetros estatísticos de todas as amostras de arroz recolhidas em 2010 e 2011 e apenas das amostras correspondentes a parcelas comuns aos dois anos, em que se verifica uma diferença muito significativa ($P < 0,01$) entre a média de 2010 e de 2011. ..	21
QUADRO 6 – Canteiros (localizados na Figura 5) usados na amostragem georreferenciada de solo e de arroz nos anos 2012, 2013 e 2014 (canteiro 11 amostrado apenas em 2012).	23
QUADRO 7 – Valores de As no arroz (ppb ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) medido em amostras compostas por 4 amostras simples colhidas num quadrado de 6 x 6 m (centro georreferenciado). Médias	



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

com letras diferentes são significativamente diferentes entre si em cada ano (teste de Tukey, $p < 0,05$).....	24
QUADRO 8 – Estatísticas dos valores anuais para as 3 parcelas com amostragem nos 3 anos e para as 2 parcelas com variedades comparáveis nesses anos. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes entre si para cada conjunto de anos (teste de Tukey, $p < 0,05$).....	27
QUADRO 9 – Dados analíticos da camada superficial das parcelas 11, 13, 76 e 86.	31
QUADRO 10 – Dados estatísticos do As (ppm) do solo em 5 extracções (Fase) sequenciais.	35
QUADRO 11 – Dados estatísticos do As (ppm) do solo de todas as parcelas obtido em 5 extracções sequenciais (Fase) para cada ano.	37
QUADRO 12 – Teor de As (ppb) nas 4 subamostras que compõem a amostra composta de solo correspondente ao quadrado $6 \times 6 \text{ m}^2$ com a referência indicada na coluna ‘Amostra’... ..	38
QUADRO 13 – Média de 3 leituras de As (mg/l) medidos na água superficial (Sup.) e na solução do solo (Sol.) recolhida a cerca de 5 cm de profundidade nos canteiros 11 e 86, em áreas próximo do ponto de entrada de água e do ponto de drenagem.....	38
QUADRO 14 – Teor de As (ppb) no grão de arroz. A modalidade sem alagamento não obteve produção suficiente (grão) para analisar (s/ diferenças significativas).	39
QUADRO 15 – Teor de As (ppm) nas folhas de arroz. Verificam-se diferenças significativas nos níveis de As (aplicado e não aplicado), no nível de água à superfície, nas variedades e na interacção entre o nível de As aplicado e o nível de água.....	40
QUADRO 16 – Teor de As (ppm) nas raízes. Verificam-se diferenças significativas nos níveis de As (aplicado e não aplicado), no nível de água e na interacção entre o nível de As aplicado e o nível de água. As diferenças entre variedades não são significativas.	41



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

Resumo

O projecto 'Produção de arroz com baixo teor de arsénio utilizando tecnologias de Agricultura de Precisão' (AP) começou por visar a aplicação de tecnologias de AP com vista à selecção de áreas com maior potencial para a produção de arroz de elevada qualidade, avaliada pelo baixo teor de arsénio no grão. Para tal procedeu-se a dois anos (2010 e 2011) de recolha e medição do arsénio em amostras de arroz (grão) provenientes de cerca de uma centena de parcelas situadas, principalmente, nos concelhos de Vila Franca de Xira e Benavente. Dessas análises sobressaiu uma grande variabilidade dos teores de As entre parcelas mas, também, uma grande variabilidade interanual, susceptível de alterar substancialmente a posição de cada parcela na seriação para cada ano. Nos anos 2012, 2013 e 2014 aprofundou-se a análise da variação espacial e temporal com amostragens mais precisas em 3 canteiros (4 em 2012), sempre nos mesmos pontos, localizados por georreferenciação com recurso a GPS. Nestas parcelas efectuou-se a amostragem e determinação do As no arroz (grão) e no solo. Os resultados das análises do As ao arroz (grão) e ao solo confirmaram uma elevada variabilidade espacial dentro de cada canteiro (com coeficientes de variação que chegam a passar os 40%). Também a variabilidade anual se revelou suficientemente grande para ocorrerem diferenças significativas entre anos, no mesmo canteiro. A utilização de diferentes variedades de arroz permitiu determinar diferenças significativas entre variedades no que diz respeito à concentração de As no grão de arroz.

Em 2012 recolheram-se amostras da água de rega e da solução do solo nas mesmas parcelas referidas anteriormente. Das análises realizadas verificou-se que a concentração do As da água de rega foi inferior ao limite máximo legal para a água potável (<10 µg/l) mas que a concentração do As na solução do solo foi quase em todos os casos superior àquele limite, chegando a atingir, em alguns registos, um valor quase 10 vezes superior. Incubações anaeróbias realizadas em laboratório com os solos de dois dos canteiros referidos registaram concentrações de As na solução do solo superiores a 100 µg/l ao fim de 60 dias, confirmando as leituras de campo e o solo como principal reserva de As.

Realizaram-se ainda ensaios em vasos de duas variedades (Ariete e Gládio), com e sem aplicação de As e com altura normal e altura reduzida de água acima do solo. O As medido nas raízes, folhas e grão do arroz permitiu determinar concentrações decrescentes pela mesma ordem em ambas as variedades. O resultado mais relevante destes ensaios traduz-se na concentração de As nas raízes e folhas 3 a 4 vezes superior na modalidade com altura de água normal comparativamente à modalidade com água mantida ao nível da superfície do solo. No entanto a produção de grão nesta última modalidade foi insuficiente para se poder fazer a análise ao seu teor de As.



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



GOVERNO DE
PORTUGAL

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

1. Introdução

O arsénio (número atómico 33 e massa atómica relativa 74,92) situa-se no Grupo 15 da Tabela Periódica (o mesmo do N e do P), apresenta propriedades entre os metais e não-metais e é considerado um metalóide ou semimetal. Tem quatro estados de oxidação: -3, 0, +3 e +5. Os dois primeiros – arsenieto e o arsénio elementar – ocorrem apenas em condições fortemente redutoras. Os dois últimos – o arsenito As(III) e o As(V) – são mais comuns no meio ambiente, respectivamente, em ambientes redutores e oxigenados (WHO, 2001).

O arsénio está classificado pela International Agency for Research on Cancer (IARC) no Grupo I (Carcinogénico para humanos) e é associado a cancro da pele, dos pulmões e da bexiga. A exposição prolongada ao arsénio pode provocar também diversas doenças não cancerígenas, como doenças de pele, hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes (Ng et al., 2003). Do ponto de vista da sua biodisponibilidade e toxicidade existem três grupos principais de compostos de arsénio: 1) compostos inorgânicos, principalmente de As(III) (ex: arsénico ou trióxido de arsénio) e de As(V) (ex: anião arseniato, AsO_4^{3-}); 2) compostos orgânicos, com destaque para o ácido monometilarsónico (MMA) e o ácido dimetilarsínico (DMA) e 3) o gás arsina ou hidreto de arsénio (AsH_3) (WHO, 2001, IARC. 2012).

O arsénio é um elemento relativamente comum no meio ambiente. Na crosta terrestre é o 20º elemento mais abundante, 14º nos oceanos e 12º no corpo humano (Woolson, 1975, cit. in: Mandal & Suzuki, 2002). As rochas ígneas apresentam concentrações de As entre <1 e 15 mg kg^{-1} com um valor médio de 2 mg kg^{-1} , tal como os arenitos e calcários (<1 e 20 mg kg^{-1}). Em contrapartida registam-se valores muito mais altos em xistos e sedimentos argiláceos finos (até 900 mg kg^{-1}) e em fosforites (até 200 mg kg^{-1}) (WHO, 2001). Solos não contaminados apresentam normalmente concentrações de As entre 1 e 40 mg kg^{-1} , com os solos arenosos e derivados de granitos a apresentarem os valores mais baixos e os solos de formações aluvionares e os solos orgânicos a apresentarem os mais altos (IARC. 2012). Para os sedimentos fluviais de Portugal continental, Ferreira (2000) obteve uma concentração média de As total de 22 mg kg^{-1} (mediana de 9 mg kg^{-1}). Nesse estudo foram mapeadas concentrações de As nos sedimentos da área deste projecto entre <1 e 9 mg kg^{-1} .

Estudos alimentares na Europa e nos Estados Unidos mostram que o arroz é a fonte primária de As numa dieta sem alimentos de origem marinha (Robberecht et al, 2002). Dada a sua importância desta cultura, tem-se assistido a uma pressão crescente para reduzir a concentração de As admissível no arroz. A legislação europeia prepara-se para adoptar no início de 2016 valores limite de As inorgânico (soma de As(III) e As(V)) de 0,20 mg kg^{-1} para o arroz branqueado e de 0,10 mg kg^{-1} para o arroz destinado à alimentação infantil.

O presente projecto pode dividir-se em três partes: a) levantamento (2010 e 2011) do teor de arsénio em amostras de arroz (grão) provenientes de cerca de uma centena de parcelas nos concelhos de Vila Franca de Xira e Benavente; b) análise da variabilidade espacial e temporal (2012, 2013 e 2014) do arsénio no arroz (grão) e no solo com amostragens georreferenciadas em 3 canteiros (4 em 2012); c) outros estudos e ensaios laboratoriais e em vasos.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

2. Materiais e Métodos

2.1. Breve caracterização climática dos finais de verão

No Quadro 1 apresenta-se uma caracterização sumária das condições climáticas verificadas durante os períodos de formação do grão nos anos em que se procedeu à realização de análises ao teor de Arsénio no grão de arroz.

QUADRO 1 – Dados de temperatura e precipitação no período de Agosto-Outubro de 2010 a 2014. Dados para a região da Lezíria do Tejo obtidos a partir dos Boletins Climatológicos Mensais do IPMA. Assinalados a negrito os maiores desvios relativamente às normais de 1971-2000.

Ano	Mês	Datas de amostr.	Temp. do ar			T relativa/ 1971-2000			Precip. (mm)	P relativa/ 1971-2000 (%)
			mín	méd (°C)	máx	mín	méd (°C)	máx		
2010	Ago	-	16-18	24-26	32-34	+2	+3	+4	0-2	0-10
	Set	-	14-15,5	22-23	28-29,5	0	+0,5	0	0-10	0-20
	Out	-	10,5-12	16-17,5	21,5-23	-1	-1	-1	100-150 (~130)	100-175
2011	Ago	-	12-16	20-24	28-30	+0,5	0	0	1-10	50-100
	Set	-	12-14	-	-	0	+1	+1	25-50	100-150
	Out	-	10-12	18-20	26-30	+0,5	+3	+4	50-100 (~120)	75-100
2012	Ago	-	14-16	22-24	30-32	0	+1	+1	5-10	100-150
	Set	-	12-16	22-24	32-34	+1	+2	+2-3	25-50	100-125
	Out	10/10 *	10-14	18-20	22-24	0+1	0+1	0	50-100 (~120)	125-150
2013	Ago	-	-	24-26	-	0+1	+2	+2-3	0-1	0-25
	Set	-	-	22-24	-	+1	+2	+2	25-50	150-200
	Out	**	-	20-22	-	+2	+1-2	0+1	100-150 (~165)	150-200
2014	Ago	-	-	22-24	-	0- -1	0	0- -1	0-1	0-25
	Set	-	-	20-22	-	+2	0	-2	100-150	300->400
	Out	27/10	-	18-22	-	+2-3	+2-3	+2-3	50-100 (~200)	75-125

* O que implica um total de P acumulado de ~60.

** Amostragens em 15/10 (canteiro 13 → P acumulada ~110) e 4/11 (parcelas 76 e 86).

É de salientar o total de precipitação nos meses de Setembro e Outubro de 2013 e, especialmente, de 2014, com valores consideravelmente superiores ao normal para o período 1970-2000.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

2.2. Métodos analíticos para a determinação de As

2.2.1. ARROZ

A esmagadora maioria das determinações de As no arroz realizadas neste projecto (QUADRO 3) efectuaram-se ao grão. Os métodos adoptados seguiram procedimentos generalizados (Calle *et al.*, 2010) e podem dividir-se nas seguintes etapas:

- a) Preparação das amostras de arroz;
- b) Incineração em mufla ou digestão em microondas;
- c) Determinação analítica do As.

Preparação das amostras de arroz

As amostras de arroz colhidas no campo foram descascadas, lavadas com água destilada e secas na estufa a 60 °C durante 48h. De seguida foram moídas a 0.5 mm e o pó resultante foi guardado em contentores de polietileno até à altura da análise.

Incineração em mufla

Com base na metodologia proposta por Matos-Reyes, *et.al* (2010) cerca de 1g de amostra foi pesado com o máximo de precisão para um cadinho de porcelana, ao qual se adicionou 2,5 mL de uma solução auxiliar de inceneração contendo 20% (w/v) $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ mais 2% (w/v) MgO, e 5 mL de uma solução 50% (v/v) de HNO_3 . A mistura evaporou até secar num banho de areia e de seguida foi colocada na mufla a 450 °C com aumento gradual da temperatura. As cinzas esbranquiçadas foram humedecidas com 1 mL de H_2O destilada e dissolvidas em 9 mL de uma solução 10% (v/v) de HCl. Para a determinação de As transferiram-se 3 mL desta solução para um balão de 50 mL, a que se adicionaram 8,75 mL de HCl e 600 μ L de uma solução redutora de 50% (w/v) de KI mais 10% (w/v) de ácido ascórbico, perfazendo-se o resto do volume até aos 50 mL com água bi-distilada.

Digestão em microondas

Pesagem de 0.5 g de amostra, com o máximo de precisão, para um *liner* de teflon de vasos *EasyPrep Plus* do microondas Mars 6 da CEM, a que juntam 10 mL de HNO_3 . As amostras ficaram em pré-digestão durante 30 min. Após este tempo foram colocadas no microondas e submetidas ao seguinte programa de digestão: Potência 900-1050 W; rampa 15 min; patamar



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

15 min e temperatura 210 °C. Depois de arrefecerem os digestos foram transferidos para balões de 50 mL, filtrados com filtro Whatman nº1 e o volume foi completado com água bi-distilada

Determinação analítica do As

O teor de arsénio das amostras de arroz submetidas a incineração foi determinado por espectrometria de absorção atómica com gerador de hidretos (HG-AAS). O As das amostras digeridas em microondas foi determinado por espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite (GF-AAS).

Um lote das amostras digeridas em microondas foi também analisado num ICP-MS (*Inductive Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, Laboratório Hércules, Universidade de Évora) para comparação de resultados (Secção 2.2.4).

2.2.2. SOLO

As amostras de solo analisadas foram colhidas em 4 canteiros de arroz, identificados com os números 11, 13, 76 e 86. Com excepção do canteiro 11 onde só foram colhidas amostras em 2012, em todos os restantes foram colhidas em 2012, 2013 e 2014. Os métodos adoptados para a análise do arsénio no solo podem dividir-se nas seguintes etapas:

- a) Preparação das amostras de solo;
- b) Extracção sequencial de As;
- c) Determinação analítica do As.

Preparação das amostras

As amostras foram secas ao ar e crivadas por uma malha de 0.50 mm. Foram colhidas alíquotas para determinação do teor de humidade das amostras secas ao ar para posterior correcção das determinações realizadas

Extracção sequencial de As do solo

Foi adoptado o método de extracção sequencial de Wenzel et al. (2001) com as adaptações sugeridas por Smith et al. (2008). Pesou-se 1g de solo para tubos de centrifuga de 50 mL de capacidade e adicionou-se, sequencialmente, 25 mL da solução extractante. Após cada



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

extracção os tubos contendo o solo e o agente extractante, são centrifugados a 1700 x g durante 10 min. A solução eventualmente retida na amostra de solo foi recolhida por meio de um passo adicional de lavagem e adicionada ao respectivo extracto. O extracto foi filtrado através de filtros de nylon de 0.45 µm antes de proceder à determinação analítica em cada solução extraída. O resíduo de solo foi usado nas extracções subsequentes. As extracções foram realizadas em duplicado. Os extractos que não puderam ser analisados imediatamente, foram colocados no frigorífico (4 °C). No QUADRO 2 apresenta-se uma breve descrição de cada um dos passos que compõem o método de extracção adoptado.

QUADRO 2 –Etapas do método adoptado para a extracção sequencial de As do solo.

Extracção 1 –	1 g de solo + 25 mL (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.05 M); agitar durante 4 h a 20 °C.
Extracção 2 –	1 g de solo + 25 mL (NH ₄)H ₂ PO ₄ (0.05 M); agitar durante 16 h a 20 °C.
Extracção 3 –	1 g de solo + 25 mL NH ₄ -oxalate buffer (0.2 M); pH 3.25; agitar durante 4 h às escuras a 20 °C.
	Lavagem 1 – 1 g de solo + 12.5 mL NH ₄ -oxalate buffer (0.2 M); pH 3.25; agitar durante 10 min. às escuras a 20 °C.
Extracção 4 –	1 g de solo + 25 mL [NH ₄ -oxalate buffer (0.2 M) + ácido ascórbico (0.1 M)]; pH 3.25; 30 min em banho-maria a 96±3 °C, à luz.
	Lavagem 2 – 1 g de solo + 12.5 mL NH ₄ -oxalate buffer (0.2 M); pH 3.25; agitar durante 10 min. às escuras a 20 °C.
Extracção 5 –	1 g de solo + 50 mL HNO ₃ /H ₂ O ₂ , digestão por microondas.

Determinação analítica do As

O teor de arsénio das amostras de solo, extraído sequencialmente por cada uma das soluções, foi determinado por espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite (GF-AAS).

2.2.3. Análises realizadas

Conforme se indica no QUADRO 3, o presente projecto envolveu a realização de um total de quase 2300 análises ao teor de arsénio, maioritariamente ao arroz (1196), mas também ao



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

solo (971). Do conjunto das análises ao arroz a esmagadora maioria foram análises ao grão. Realizaram-se também algumas às folhas e às raízes, respectivamente 41 e 28 (ver secção 5.1).

QUADRO 3 – Número de análises ao arsénio realizadas em amostras de arroz e de solo.

Métodos analíticos	Arroz	Solo
GF-AAS	705	971
HG-AAS	481	-
ICP-MS	10	-
Total de análises	1196	971

2.2.4. Comparação de métodos analíticos

A análise do teor de arsénio em material vegetal, em especial com teores baixos, como se verificou na maioria das amostras de arroz (grão) analisadas, está sujeita a grande variabilidade de resultados (Calle *et al.*, 2010). Podem contribuir para essa elevada variabilidade a utilização de diferentes métodos de digestão e de determinação analítica, bem como todo o tipo de pequenas variações nos métodos e ocorrências fortuitas em qualquer das etapas de todo o processo analítico.

Para minimizar este problema as análises ao arroz (grão) foram repetidas, chegando em muitos casos a 6 e 7 repetições. Por outro lado, todas as análises foram comparadas e corrigidas pelos resultados obtidos para uma amostra de referência de farinha de arroz (ref. SRM 1568a) com um teor de As de $290 \pm 30 \mu\text{g kg}^{-1}$ (NIST, 1995). Uma amostra de referência foi incluída com frequência nos lotes de amostras a analisar sendo submetida exactamente ao mesmo procedimento analítico que as restantes amostras desse lote. Nas determinações analíticas por espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite (GF-AAS) registou-se um limite de determinação de $\sim 60 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Realizaram-se também testes comparativos nas mesmas amostras de arroz, envolvendo laboratórios diferentes.

No QUADRO 4 apresentam-se os resultados das análises a 3 subamostras, extraídas de amostras homogéneas de arroz colhidas em 2010 nas parcelas 10, 11 e 86, realizadas em 3 laboratórios diferentes.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

Verifica-se que os resultados diferem bastante entre laboratórios. No entanto, verifica-se um padrão semelhante entre os resultados obtidos neste projecto e no laboratório Neutron (Itália) embora o desvio pareça acentuar-se com os valores mais altos. De qualquer modo, com apenas 3 amostras, esta comparação não permite conclusões definitivas.

QUADRO 4 – Comparação dos resultados de análises ao As em 3 subamostras de amostras homogéneas de 3 parcelas, realizadas em 3 laboratórios diferentes. Valores em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ou ppb).

Parcelas (2010)	Univ. Évora	Neutron (Itália)	CLF (Alemanha)
11	110	140	< 200
10	393	340	< 200
86	657	430	< 200

Posteriormente procedeu-se a um estudo comparativo mais detalhado, envolvendo um conjunto de 9 amostras de grão de arroz, analisadas por espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite (GF-AAS) e por ICP-MS (*Inductive Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, Laboratório Hércules, Universidade de Évora) – Figura 1.

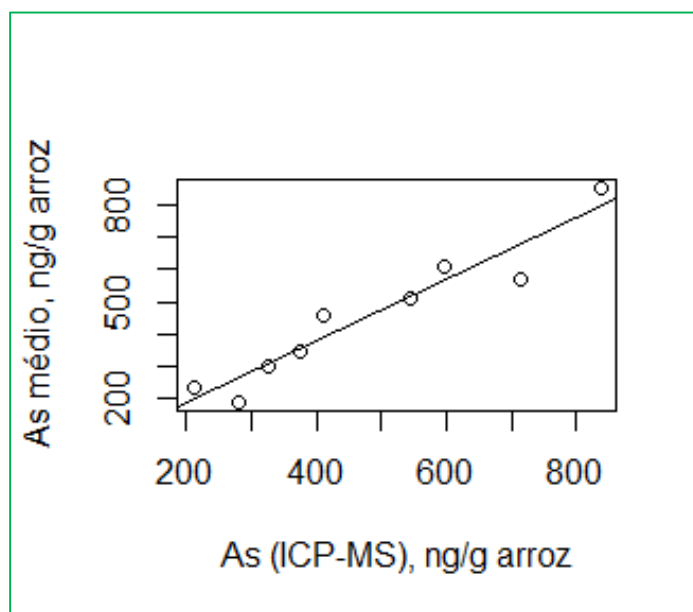


Figura 1 - Valores médios de As em 9 amostras de arroz determinados por HG-AAS e GF-AAS em relação aos valores determinados por ICP-MS.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

A recta de regressão obtida tem um $r^2 = 0,92$ uma intersecção de -6.8 e um coeficiente de regressão (declive) de 0.96, o que sugere uma ligeira tendência de subestimação dos valores médios obtidos, relativamente aos do ICP-MS. Este desvio terá maior expressão, em valor absoluto, para os valores mais altos.

2.3. Ensaio experimentais

2.3.1. Ensaio em vasos (2014)

Realizaram-se ensaios em vasos nas instalações do COTArroz em que se testaram os seguintes 3 factores:

Variedades: 2 variedades, "Ariete" e "Gládio" (as mais usadas nas parcelas monitorizadas).

Nível de As: 2 níveis de arsénio na solução do solo.

1) Nível base ou controlo (aplicação de água nas condições naturais)

2) Adição de água com uma concentração de As(III) de 1 000 µg/l.

Nível de água: 2 níveis de alagamento, normal e nulo (~ 0 cm de altura de água acima do solo).

A conjugação dos factores indicados corresponde a 8 modalidades. Foram utilizadas 3 réplicas, o que dá um total de 24 casos/vasos:

2 variedades x 2 níveis de As x 2 níveis de água x 3 réplicas = 24 vasos.

Em cada modalidade foram quantificados os valores de biomassa e foram realizadas análises ao teor de As no grão, folhas e raízes das plantas de arroz, desde que a biomassa obtida o permitisse.

2.3.2. Incubações em laboratório

Incubação aberta

Segundo a metodologia proposta por Stroud et al (2011) montou-se um ensaio para colher a solução de solo em condições de inundação e determinar o respectivo teor de As em dois solos de arrozais (canteiros 13 e 76). Triplicados de 750g de solo, equivalente a solo seco a 105º C, foram colocados em frascos de vidro e inundados com água bi-distilada de forma a manter-se



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

em permanência uma altura de 2 cm de água acima da superfície do solo. O ensaio foi mantido à temperatura do laboratório de 20 ± 5 °C. Um sistema de colheita de solução do solo foi inserido em cada um dos frascos para recolha da respectiva solução aos 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 91 e 119 dias após a inundação. O teor de As e o valor do pH foi determinado em cada uma das réplicas.

Para determina o do valor de pH e de Eh dos solos (Chien-Hui Syu et al 2013) fez-se um duplicado deste ensaio com 500 g de solo em vez dos 750 g, e as medi es foram realizadas nos mesmos dias das colheitas da soluço, bem como no dia 0.

Incuba o fechada

De acordo com a metodologia descrita por Chien-Hui Syu et al (2013) montou-se um segundo ensaio de incuba o para simular a concentra o de As na soluço do solo em condi es de inunda o. Pesaram-se 20 g de solo corrigido   humidade, dos canteiros 13 e 76, para tubos de centrífuga de 50 mL (3 réplicas) aos quais se adicionou 20 mL de água bi-destilada. Depois de agitados durante 30 min foram colocados a incubar a 25 °C durante 0, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 91 e 119 dias. Em cada uma das datas indicadas os tubos com as solu es foram centrifugados durante 10 min a 3354 x g e as solu es recolhidas e filtradas usando filtros de 0,45  m. O teor de As na soluço foi medido por espectrometria de absor o at mica com câmara de grafite (GF-AAS).

2.3.3. Enzimas do solo

Foram recolhidas amostras de solo da camada superficial (0-15 cm de profundidade) em pelo menos 12 pontos diferentes do terreno, escolhidos aleatoriamente, com os quais foi preparada uma amostra composta, representativa do local em análise.

A determina o do teor proteico nas amostras de solo foi efectuada pelo método de Bradford, utilizando o Azul Coomassie G, o qual forma um complexo azul de intensidade proporcional   concentra o de proteína presente (Bradford, 1976). A quantifica o das actividades enzimáticas foi efectuada pelos seguintes métodos:

- fosfatase - método de Tabatabai e Bremner modificado - baseado na hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), com liberta o de *p*-nitrofenol (*p*-NP) (Weaver *et al.*, 1994);
- arilsulfatase - método de Tabatabai e Klose - baseado na conversão do *p*-nitrofenilsulfato (*p*-NPS) em *p*-NP (Elgaard. *et al.*, 2003);



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

- β -glucosidase - método de Eivazi e Tabatabai modificado – no qual o p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (p-NPG) é hidrolisado, com formação de p-NP (Turner *et al.*, 2002).
- desidrogenase - método de Von Mersi e Schinner - utilizando o cloreto de 2-p-iodofenil-3-pnitrofenil-5-feniltetrazolio (INT), como substrato, o qual na presença de desidrogenases forma o sal tetrazolico, iodonitrotetrazólio-formazão (INTF) (Martins *et al.*, 2010);
- urease - método de Berthelot - que se baseia na reação do salicilato de sódio com NH_3 na presença de ácido dicloroisocianúrico, a qual forma um complexo esverdeado (Martins *et al.*, 2010)

O efeito do arsénio foi estudado no solo 11. Foram adicionados quantidades crescentes de solução As_2O_3 1000 mg/L de modo a determinar a concentração de As (III) que causa inibição de 50% de actividade enzimática (IC50).

2.3.4. Análise estatística

As médias dos resultados obtidos foram comparados com recurso à análise de variância (ANOVA), geralmente para um factor. Aplicou-se também o teste de Tukey (para um nível de confiança de 95%) sempre que a ANOVA registou diferenças significativas entre mais de duas médias. Análises estatísticas e gráficos foram realizados em R.



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

3. Caracterização à escala regional (2010 e 2011)

3.1. Amostragem

A recolha de amostras de arroz, para determinação do As no grão, foi realizada pela Orivárzea em 2010 e 2011. A localização dos pontos de amostragem e as suas coordenadas geográficas foram obtidas recorrendo ao Google Earth. Os locais de amostragem concentraram-se nos concelhos de Benavente e Vila Franca de Xira, com um adicional no concelho de Coruche.

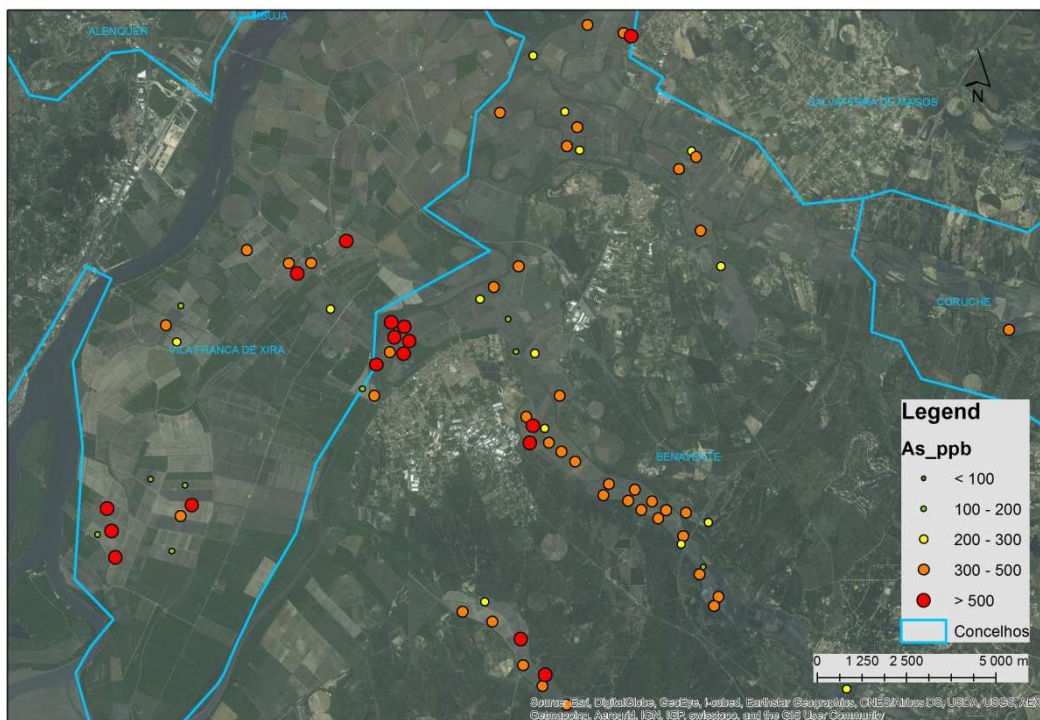


Figura 2 - Localização e classes do teor de arsénio nas amostras de arroz recolhidas em 2010.

A Figura 2 e a Figura 3 revelam uma grande variabilidade espacial no teor de As do arroz (grão) podendo encontrar-se facilmente parcelas vizinhas com valores de As muito distintos. À escala da área de estudo também não se verifica uma tendência espacial evidente.

A comparação das duas figuras permite constar também uma significativa variação nos resultados interanuais.

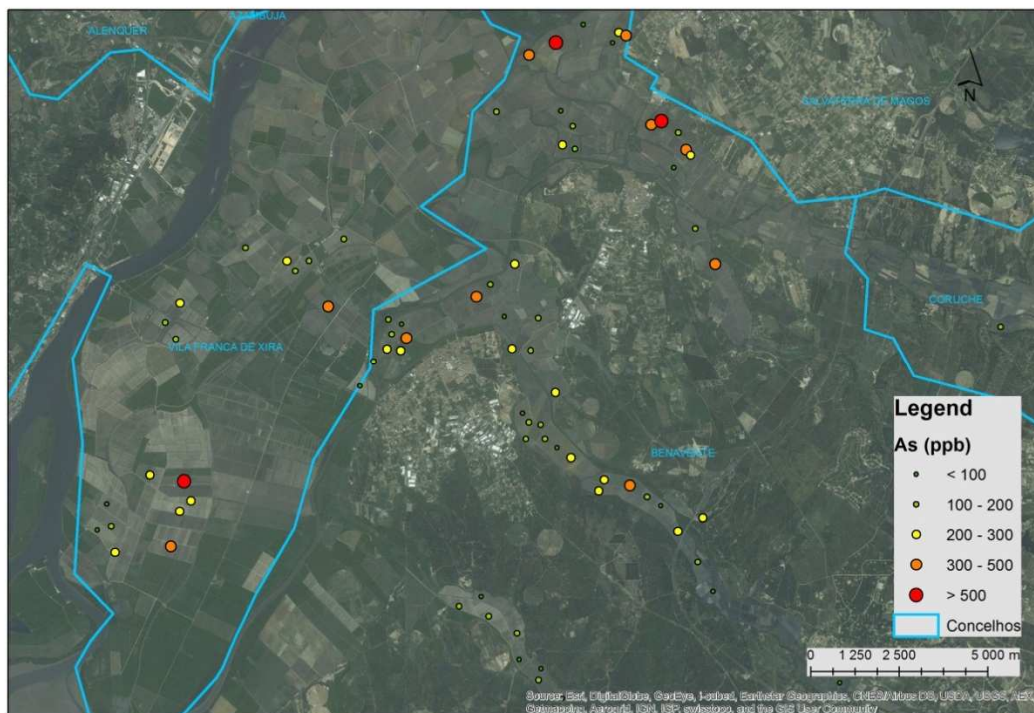


Figura 3 – Localização e classes do teor de arsénio nas amostras de arroz recolhidas em 2011.

3.2. ARROZ

Os resultados analíticos obtidos para cada parcela em 2010 e 2011 podem ser consultados na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** em Anexo.

No QUADRO 5 (e na Figura 4) apresenta-se uma síntese estatística dos resultados da referida tabela. Na parte superior do quadro incluem-se todos os resultados analisados e na parte inferior apenas as parcelas em que foram recolhidas amostras nos dois anos consecutivos, 2010 e 2011, de modo a permitir uma maior comparabilidade entre os dois anos.

Contudo, mesmo no caso das amostras de parcelas comuns (parte inferior do QUADRO 5) os resultados são de comparabilidade incerta, dado que podem não ter sido usadas as mesmas variedades de arroz em 2010 e em 2011 em algumas dessas parcelas.

Em todo o caso, para as parcelas comuns aos dois anos, o teor médio de As no grão de arroz apresenta uma grande diferença, estatisticamente muito significativa. A média de 2011 traduz



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

um decréscimo para menos de metade da média de 2010. Este resultado é, por si só, revelador de um grande potencial de variação interanual que interessa confirmar e explicar.

QUADRO 5 – Parâmetros estatísticos de todas as amostras de arroz recolhidas em 2010 e 2011 e apenas das amostras correspondentes a parcelas comuns aos dois anos, em que se verifica uma diferença muito significativa ($P < 0,01$) entre a média de 2010 e de 2011.

Ano	N	\bar{x}	s	cv (%)	min	mediana	máx
Com todas as amostras de 2010 e 2011							
2010	97	373	133	35,6	105	384	852
2011	86	191	134	70,4	40	148	827
Apenas com amostras em locais comuns a 2010 e 2011							
2010	81	378 ^{***}	141	37,3	105	386	852
2011	81	180 ^{***}	108	59,8	40	143	584

Legenda: N, número de amostras; \bar{x} , média; s, desvio padrão; cv, coeficiente de variação; min, valor mínimo; máx., valor máximo.

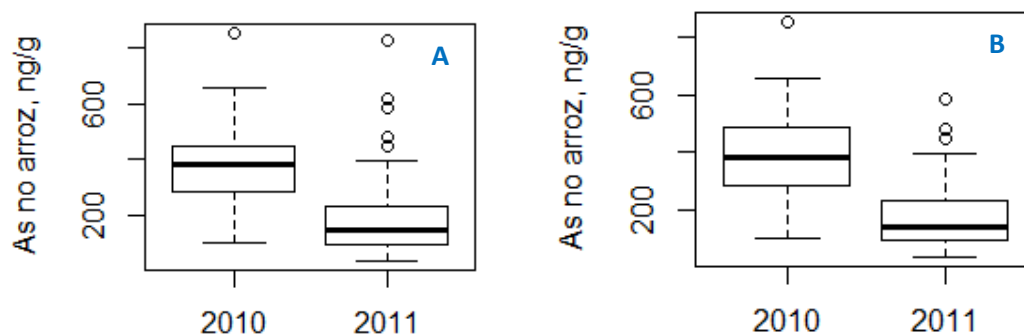


Figura 4 – Representação da distribuição de todas as amostras de arroz recolhidas em 2010 e 2011 (A) e apenas das amostras correspondentes a parcelas comuns aos dois anos (B).



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

4. Caracterização à escala da parcela (2012 a 2014)

4.1. Amostragem (amostras georreferenciadas)

Esta amostragem decorreu nos últimos 3 anos do projecto em canteiros seleccionados: 11, 13, 76 e 86 (2012) e 13, 76 e 86 (2013 e 2014). Para sua identificação manteve-se a numeração atribuída às amostras de arroz de 2010 provenientes destas áreas.

A selecção destas parcelas baseou-se também nos resultados do teor de arsénio no arroz (grão) obtido em 2010, cobrindo uma gama alargada de valores, desde 158 ppb (canteiro 76) até 657 ppb (canteiro 86), com os canteiros 11 e 13 a apresentarem valores intermédios, respectivamente 191 e 513 ppb As (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**). Noutra interpretação podemos admitir duas áreas com teores de As baixos (< 200 ppb) e outras duas com teores altos (> 500 ppb).

Na Figura 5 Figura 5 – Localização dos 4 canteiros seleccionados para a recolha de várias amostras de solo e de arroz georreferenciadas em cada canteiro. estão localizados os 4 canteiros seleccionados e no QUADRO 6 apresentam-se alguns dados adicionais para a sua identificação.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

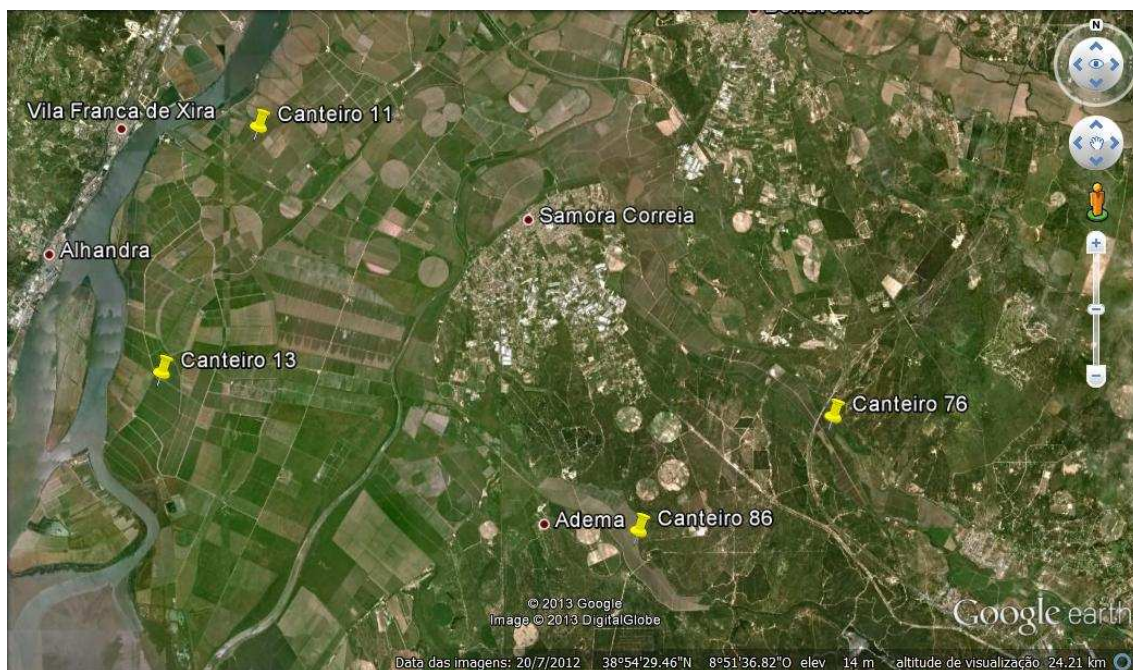


Figura 5 – Localização dos 4 canteiros seleccionados para a recolha de várias amostras de solo e de arroz georreferenciadas em cada canteiro.

QUADRO 6 – Canteiros (localizados na Figura 5) usados na amostragem georreferenciada de solo e de arroz nos anos 2012, 2013 e 2014 (canteiro 11 amostrado apenas em 2012/9).

ID *	Agricultores	Parcelas	Coordenadas
11	Pedro Lapa	Murraceira de Sua A.	38,94971, -8,95583
13	André Travassos	Rabicha	38,89831, -8,97902
76	Orivárzea	Paul de Belmonte 6A	38,88482, -8,78637
86	Companhia das Lezírias	Paul das Lavouras 8	38,86639, -8,84506

* Adoptado o número de identificação das amostras de arroz colhidas em 2010.

Para a amostragem, cada canteiro foi dividido numa malha, cobrindo toda a área, até um máximo de 16 quadrículas ou sectores. Em cada sector foi marcado um ponto aleatório num total entre 12 a 16 pontos por canteiro. Posteriormente, estes pontos foram georreferenciados constituindo, cada um deles, o centro de uma unidade para amostragem do arroz e do solo nos anos de 2012, 2013 e 2014.

Os pontos georreferenciados (coordenadas na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** em Anexo) representaram o centro de um quadrado de 6 x 6 m² no qual se recolheu uma amostra composta por 4 subamostras, ou amostras simples, colhidas a 2 m do centro, segundo duas direcções perpendiculares entre si e alinhadas aproximadamente com os eixos cardeais.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

No caso do arroz colheram-se 4 subamostras de panículas, aproximadamente com igual volume, de modo a obter cerca de 1 kg de amostra composta para cada quadrado de 6 x 6 m².

No caso do solo recolheram-se 4 subamostras da camada superficial dos 0-15 cm de profundidade com recurso a pás de valar. Depois de misturadas em sacos de plástico, em proporções aproximadamente iguais, formaram-se amostras compostas de 1,5 a 2 kg de solo para cada unidade de amostragem de 6 x 6 m².

4.2. ARROZ

No QUADRO 7 apresenta-se uma síntese estatística de todas as análises ao As do arroz (grão) realizadas entre 2012 e 2014 nos canteiros 11 (2012), 13, 76 e 86. A Figura 6 permite uma mais fácil comparação da dispersão de resultados entre parcelas e entre anos.

QUADRO 7 – Valores de As no arroz (ppb ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) medido em amostras compostas por 4 amostras simples colhidas num quadrado de 6 x 6 m (centro georreferenciado). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes entre si em cada ano (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Ano	ID	Variedade	N	\bar{x}	s	cv (%)	min.	mediana	máx.
2012	11	Albatros	12	232 ^b	101	43.4	56	248	401
	13	Ariete	16	339 ^c	92	27.0	150	336	491
	76	Gládio (ag.)	16	128 ^a	61	48.0	41	118	240
	86	Ariete	13	289 ^{bc}	80	27.6	203	264	444
2013	13	Ariete	16	187 ^b	73	39.3	82	200	330
	76	Gládio (ag.)	16	139 ^{ab}	57	41.3	78	118	275
	86	Ronaldo	13	115 ^a	43	37.7	63	112	228
2014	13	Ariete	16	184 ^a	58	31.3	105	176	321
	76	Sírio (ag.)	16	125 ^a	55	44.3	19	132	210
	86	Dardo	13	394 ^b	135	34.2	243	382	692

Legenda: N, número de amostras; \bar{x} , média; s, desvio padrão; cv, coeficiente de variação; min, valor mínimo; máx., valor máximo.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

Um dos traços mais fortes que sobressai destes resultados é a grande variação entre canteiros (em cada ano), entre anos (perspectiva a desenvolver mais adiante) e, acima de tudo, a alteração de posições relativas entre canteiros.

Para compreender melhor este comportamento é necessário atender às alterações nas variedades de arroz cultivadas em cada canteiro e em cada ano (QUADRO 7). Verifica-se que apenas os canteiros 13 e 76 mantêm as mesmas variedades (ou afins) durante os 3 anos. Olhando apenas para esses dois canteiros, constata-se que apesar das variações entre anos conservam sempre as suas posições relativas, isto é, apesar das subidas ou descidas de ano para ano, o canteiro 13 apresenta sempre valores médios mais altos do que no canteiro 76, embora as diferenças entre ambos deixem de ser significativas nos anos em que os valores descem em ambos (2013 e 2014).

A parcela 86 é a que apresenta maior variabilidade interanual, passando de valores altos em 2012 para mínimos em 2013 e para máximos em 2014. No entanto, para além da variabilidade entre anos, estes resultados incorporam uma componente devida às variedades de arroz, que foram diferentes em todos os anos. Assim, admitindo que o canteiro 86 terá sofrido o mesmo efeito de variação anual que os restantes, o facto de passar de valores mínimos em 2013 para máximos em 2014, faz crer que a variedade Ronaldo (2013) foi muito eficaz a reduzir a concentração de As no arroz (grão) enquanto a variedade Dardo (2014), pelo contrário, será das menos eficazes quanto a esta característica. Para uma análise mais detalhada seria muito importante dispor também dos dados de produção/produktividade em cada caso.



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

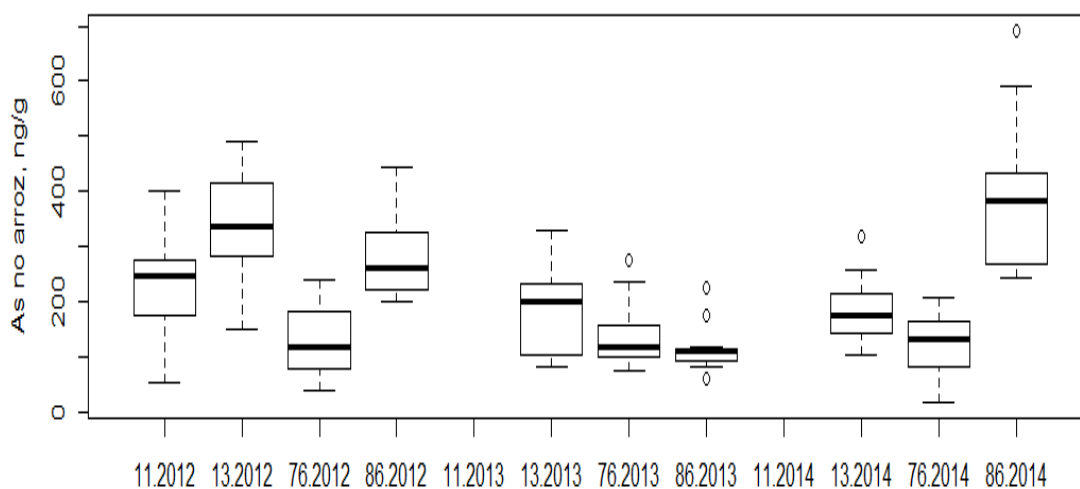


Figura 6 – Representação da distribuição do As no arroz (ppb ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) medido em amostras compostas por 4 amostras simples colhidas num quadrado de 6x6 m (centro georreferenciado).

No QUADRO 8 apresentam-se os resultados que permitem uma melhor comparação entre os 3 anos. A comparação mais correcta é a do conjunto que envolve apenas os canteiros 13 e 76, dado que são os únicos que mantêm variedades comparáveis nesse período.

Verifica-se um decréscimo significativo nos valores de As de 2012 para 2013 e 2014, não havendo diferença significativa entre estes últimos. As diferenças entre anos obtidas nestes dois canteiros e mantendo as mesmas variedades de arroz parecem confirmar o que já se tinha observado na comparação entre 2010 e 2011 com um maior conjunto de amostras, mas sem confirmação das variedades usadas.

Da Figura 7 à Figura 10 apresentam-se os resultados do QUADRO 7, localizados nos respectivos canteiros. Contrariamente ao que se poderia pensar, embora se verifiquem diferenças significativas entre os canteiros estudados (assinaladas no mesmo quadro), a variabilidade dentro de cada canteiro também é elevada, verificando-se até alguns casos de grandes diferenças a muito poucos metros de distância.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

QUADRO 8 – Estatísticas dos valores anuais para as 3 parcelas com amostragem nos 3 anos e para as 2 parcelas com variedades comparáveis nesses anos. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes entre si para cada conjunto de anos (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Parcelas	Ano	Variedades	N	\bar{x}	s	CV (%)	Min.	Mediana	Máx.
13, 76, 86	2012	todas	45	250 ^b	121	48.5	41	244	491
	2013	todas	45	149 ^a	66	44.3	63	115	330
	2014	todas	45	224 ^b	141	63.0	19	181	692
13, 76	2012	Ariete e Gládio	32	234 ^a	132	56.4	41	209	491
	2013	Ariete e Gládio	32	163 ^b	69	42.5	78	142	330
	2014	Ariete e Sírio	32	154 ^b	63	40.9	19	158	321

Legenda: N, número de amostras; \bar{x} , média; s, desvio padrão; cv, coeficiente de variação; min, valor mínimo; máx., valor máximo.



Figura 7 – Localização e valores de As nas amostras de arroz no canteiro 11 no ano 2012.



Programa de Desenvolvimento Rural



União Europeia
FEDER

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO MAR, DO AMBIENTE
E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO



Figura 8 – Localização e valores de As nas amostras de arroz no canteiro 13 nos anos 2012, 2013 e 2014.



Figura 9 – Localização e valores de As nas amostras de arroz no canteiro 76 nos anos 2012, 2013 e 2014.



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
 FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
 DO MAR, DO AMBIENTE
 E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

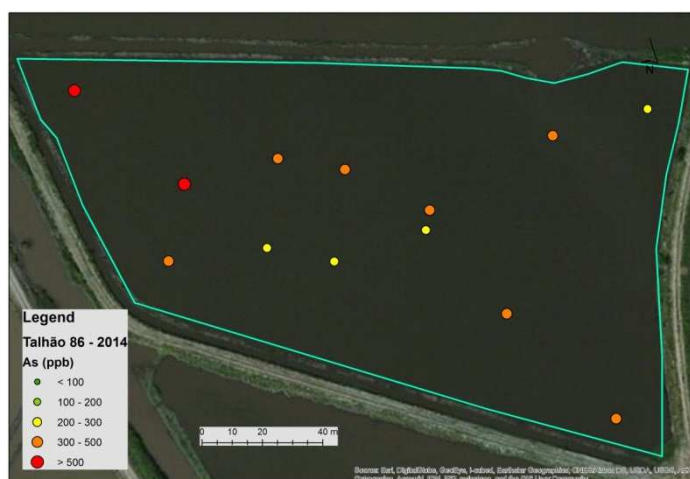
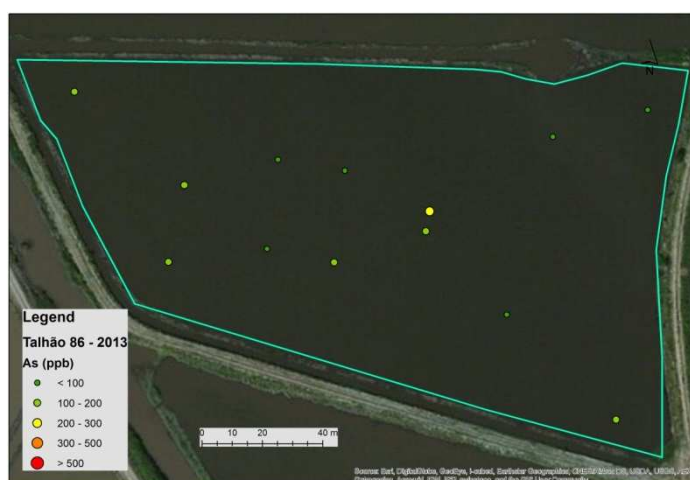
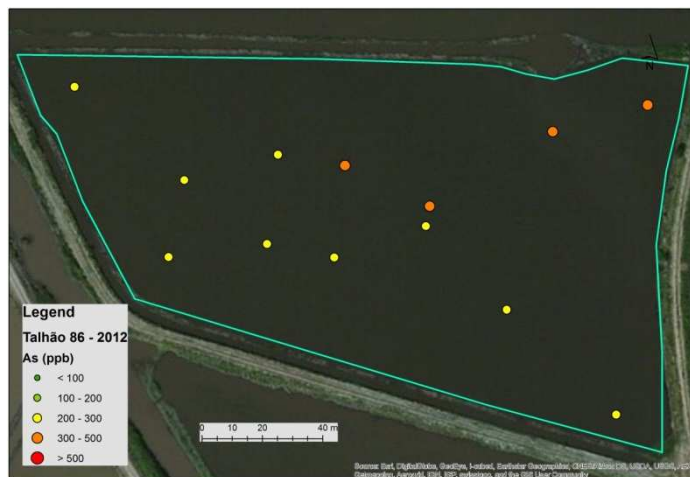


Figura 10 – Localização e valores de As nas amostras de arroz no canteiro 86, anos 2012, 2013 e 2014.



Programa de Desenvolvimento Rural



**União Europeia
 FEDER**

Investimos no seu futuro



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
 DO MAR, DO AMBIENTE
 E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

4.3. SOLO

4.3.1. Caracterização geral do solo das parcelas

No QUADRO 9 apresenta-se uma caracterização analítica da camada superficial (0-15 cm) dos solos dos canteiros 11, 13, 76 e 86.

QUADRO 9 – Dados analíticos da camada superficial das parcelas 11, 13, 76 e 86.

Solos	Text	pH	CE	P ₂ O ₅	K ₂ O	CTC	Ca	Mg	Na	K	S	CaCO ₃	% N
		(H ₂ O)	dS m ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	-----	cmol(+) kg ⁻¹	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	Fina	7,67	0,519	98	380	20,60	18,38	3,33	1,74	0,65	24,10	Sim	1,36
11	Fina	7,50	0,642	121	312	20,04	21,25	4,90	1,09	0,64	27,88	Não	0,28
13	Fina	7,69	0,787	107	480	19,92	18,75	7,71	5,87	1,18	33,51	Não	0,16
76	Fina	6,10	0,572	30	166	19,32	11,25	7,29	2,72	0,45	21,71	Não	0,14
86	fina	6,34	0,532	54	400	25,04	8,75	3,44	1,91	0,79	14.89	Não	1,35
86	Fina	5,98	0,544	45	312	24,56	13,44	8,54	2,00	0,86	24,84	Não	0,20

Entre as características observadas salienta-se o contraste entre os solos das parcelas 11 e 13, por um lado e 76 e 86, por outro. O primeiro grupo apresenta pH, Ca de troca e P extraível mais elevados do que o segundo grupo. O solo 13 também tem um elevado nível de Na de troca, correspondente ao de um solo sódico.

4.3.2. Levantamento geoelectrico

Em 2012 foi efectuada a medição da condutividade eléctrica aparente (CEa) do solo nos canteiros 11, 13, 76 e 86 com um sensor geoelectrico Veris 3100. Os mapas da CEa do solo (da Figura 11 à Figura 14) apresentam valores de CEa elevados para os quais poderão contribuir níveis relativamente elevados de salinidade, especialmente nos talhões 13 e 86.

O padrão de distribuição espacial da CEa, em especial nas parcelas 11, 76 e 86, pode estar associada à entrada e saída de água do canteiro, apresentando valores relativamente menores de CEa próximo das zonas de entrada de água.

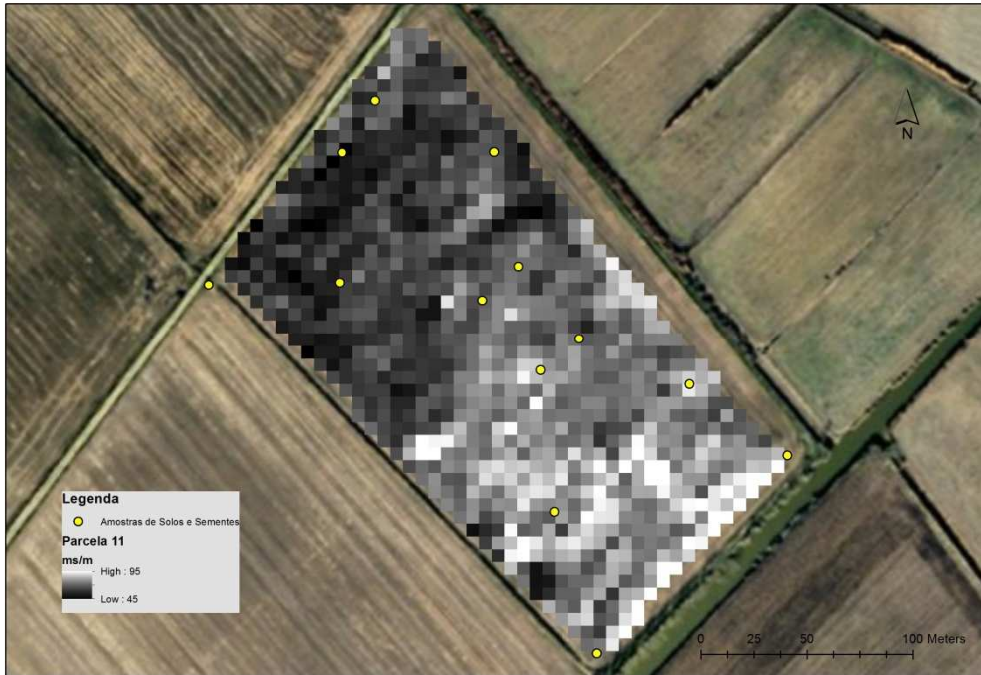


Figura 11 – Mapa da condutividade eléctrica aparente do talhão 11 e locais de amostragem de arroz e solo para análise do teor de As.



Figura 12 – Mapa da condutividade eléctrica aparente do talhão 13 e locais de amostragem de arroz e solo para análise do teor de As.

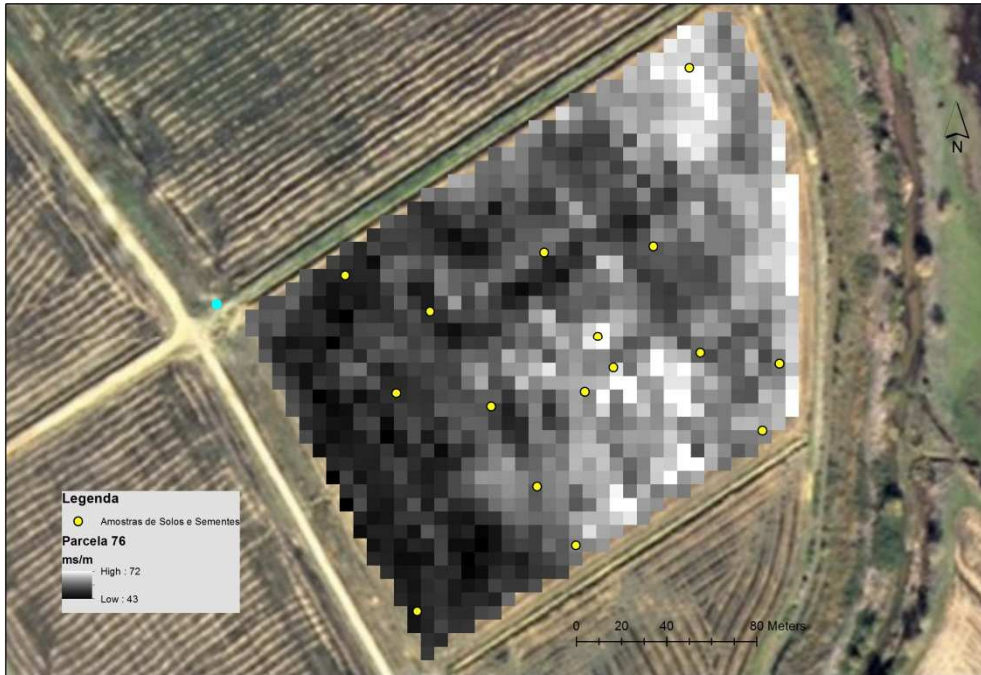


Figura 13 – Mapa da condutividade eléctrica aparente do talhão 76 e locais de amostragem de arroz e solo para análise do teor de As.

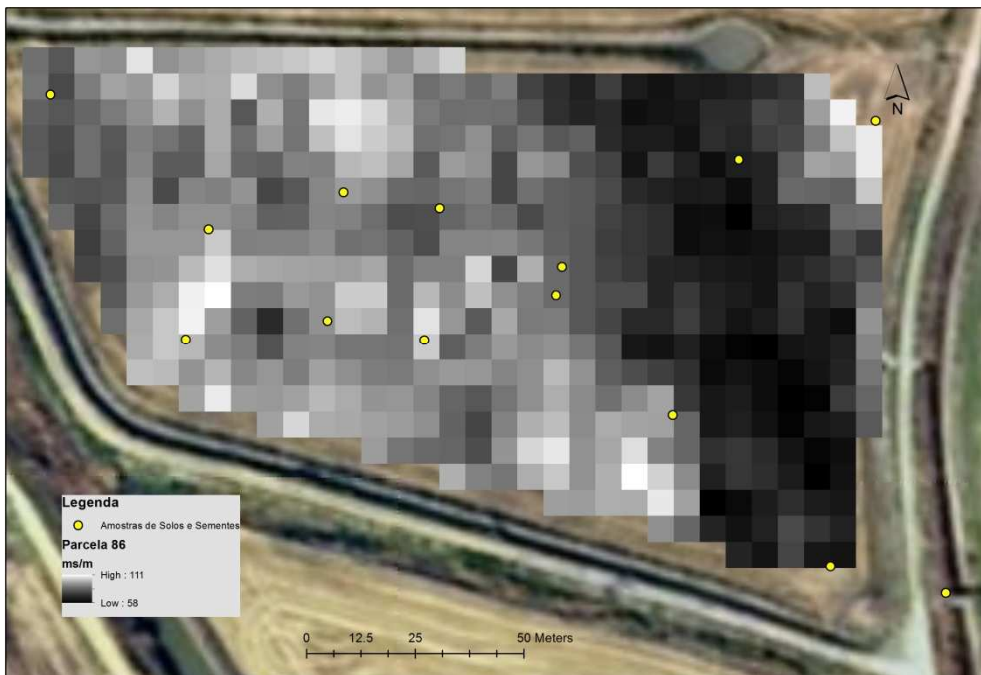


Figura 14 – Mapa da condutividade eléctrica aparente do talhão 86 e locais de amostragem de arroz e solo para análise do teor de As.

4.3.3. Teor de As nas amostras de solo georreferenciadas

No QUADRO 10 apresentam-se os resultados das 5 extracções sequenciais de As do solo, apresentados para cada ano e para cada parcela de estudo. As médias com letras diferentes são significativamente diferentes entre si para cada fase ou etapa extractiva (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A Figura 15 e a Figura 16 evidenciam que a fracção de As correspondente à etapa 5 é a dominante no solo, com mais de 30 a quase 50% do total. No entanto esta é considerada a fracção residual de As, praticamente inerte e, portanto, não biodisponível (Smith et al., 2008; Wenzel et al., 2001). As restantes fracções podem contribuir de forma variável, dependente das condições do solo, para a forma mais lábil de As – a extraída na etapa 1 e que corresponde a formas de As envolvidas em ligações não específicas. Esta fracção de As é a mais reduzida e é quase imperceptível na Figura 15 e na Figura 16. As reservas mais importantes de arsénio biodisponível, ou susceptíveis de passar a formas biodisponíveis, são as fracções obtidas nas etapas 2, 3 e 4. Enquanto a etapa 2 extrai As envolvido em ligações específicas, as etapas 3 e 4 extraem As ligado a óxidos e hidróxidos, no primeiro caso principalmente no estado amorfo e no segundo no estado cristalino (Smith et al., 2008; Wenzel et al., 2001).

A tendência mais consistente que se observa nos resultados do QUADRO 10 é dada pela ordenação dos canteiros quanto ao teor de As extraído nas etapas 4 e 3: $86 < 76 < 13$. Esta ordenação mantém-se nos 3 anos e traduz-se em várias diferenças significativas entre parcelas, o que revela um potencial interesse como indicador do As biodisponível no solo. Pode contribuir para tal também o facto de serem as etapas 3 e 4 as que revelam menor dispersão de valores no conjunto das 5 fases extractivas.

Adicionando o valor do As extraído na etapa 2 ao das etapas 3 e 4, verifica-se facilmente pela Figura 15 e pela Figura 16 que o solo do canteiro 13 é o que apresenta níveis mais altos, quer em valor absoluto quer em percentagem.

No QUADRO 11 apresentam-se os mesmos dados expressos de forma a permitir comparar os 3 anos em todas as etapas extractivas. Só se verifica uma diferença significativa entre o ano de 2013 e 2014 para o caso do As extraído na etapa 3. Neste momento não é possível dar uma explicação plausível para o decréscimo do As extraído na etapa 3 em 2014, relativamente a 2013, mas esta diferença poderá ser relevante para explicar também os menores valores verificados no teor de As do arroz neste ano (QUADRO 8). No entanto, enquanto no solo o decréscimo de As extraído na etapa 3 só se verificou em 2014, no arroz esse decréscimo verificou-se já em 2013, mantendo-se em 2014. Paralelamente, parece verificar-se uma ligeira tendência de subida no As extraído na etapa 2, de 2013 para 2014, mas a diferença não é estatisticamente significativa.

QUADRO 10 – Dados estatísticos do As (ppm) do solo em 5 extracções (Fase) sequenciais.

Ano	Fase	ID	N	\bar{x}	s	cv (%)	min.	mediana	máx.	
2012	1	11	8	0.12	0.10	82.9	0.03	0.08	0.27	
		13	8	0.15	0.06	41.3	0.07	0.14	0.27	
		76	8	0.10	0.04	35.8	0.06	0.09	0.16	
		86	8	0.10	0.04	40.7	0.06	0.09	0.18	
	2	11	8	2.48	1.04	41.8	1.03	2.24	3.98	
		13	8	2.88	1.73	60.2	0.92	2.90	4.78	
		76	8	1.17	0.78	66.8	0.40	1.06	2.08	
		86	8	1.97	1.53	77.9	0.40	1.62	4.31	
	3	11	8	3.46 ^b	0.22	6.3	3.06	3.56	3.67	
		13	8	4.07 ^b	0.27	6.7	3.68	4.03	4.47	
		76	8	2.72 ^a	0.51	18.7	2.00	2.76	3.42	
		86	8	2.79 ^{ab}	0.77	27.6	1.91	2.63	4.28	
	4	11	8	4.44 ^b	0.54	12.1	3.63	4.51	5.08	
		13	8	4.02 ^b	0.90	22.3	2.90	3.84	5.24	
		76	8	1.35 ^a	0.16	11.7	0.98	1.39	1.50	
		86	8	1.00 ^a	0.33	32.9	0.71	0.93	1.76	
	5	11	2	10.61	2.39	22.5	8.92	10.61	12.30	
		13	1	6.33	NA	NA	6.33	6.33	6.33	
		76	1	3.93	NA	NA	3.93	3.93	3.93	
		86	1	6.33	NA	NA	6.33	6.33	6.33	
2013	1	13	8	0.12	0.06	49.4	0.06	0.11	0.21	
		76	8	0.07	0.03	38.9	0.03	0.08	0.10	
		86	8	0.09	0.04	39.2	0.04	0.08	0.15	
	2	13	8	2.91 ^b	1.10	37.9	1.78	2.71	4.83	
		76	8	0.98 ^a	0.45	46.4	0.50	0.85	1.54	
		86	8	2.39 ^b	1.28	53.5	1.00	2.34	4.05	
	3	13	8	4.81 ^b	1.47	30.6	3.33	4.36	7.48	
		76	8	3.09 ^b	0.24	7.8	2.71	3.14	3.47	
		86	8	2.47 ^a	0.41	16.5	2.04	2.38	3.15	
	4	13	8	3.74 ^b	0.97	25.9	2.63	3.69	5.09	
		76	8	1.70 ^a	0.52	30.8	0.91	1.84	2.29	
		86	8	0.92 ^a	0.13	13.7	0.79	0.89	1.19	
	5	13	1	8.15	NA	NA	8.15	8.15	8.15	
		76	1	3.40	NA	NA	3.40	3.40	3.40	
		86	1	5.16	NA	NA	5.16	5.16	5.16	
	2014	1	13	8	0.13 ^b	0.03	23.9	0.09	0.12	0.18
			76	8	0.08 ^a	0.02	28.6	0.04	0.08	0.12
			86	8	0.09 ^a	0.02	25.6	0.06	0.09	0.13
		2	13	8	4.11 ^b	2.31	56.2	1.84	3.96	7.15
			76	8	1.32 ^a	0.78	59.5	0.57	1.23	2.32
86			8	2.57 ^b	1.64	63.8	0.88	2.45	5.36	
3		13	8	2.97 ^b	0.38	12.7	2.46	2.94	3.63	
		76	8	2.54 ^a	0.28	11.1	2.03	2.62	2.81	
		86	8	2.20 ^a	0.20	8.9	1.97	2.18	2.55	
4		13	8	3.09 ^c	0.55	17.8	2.32	3.32	3.72	
		76	8	1.68 ^b	0.86	51.5	1.24	1.38	3.79	
		86	8	0.77 ^a	0.17	22.0	0.51	0.86	0.92	
5		13	1	4.33	NA	NA	4.33	4.33	4.33	
		76	1	3.74	NA	NA	3.74	3.74	3.74	
		86	1	4.88	NA	NA	4.88	4.88	4.88	

(NOTA: ver legenda no Quadro seguinte)

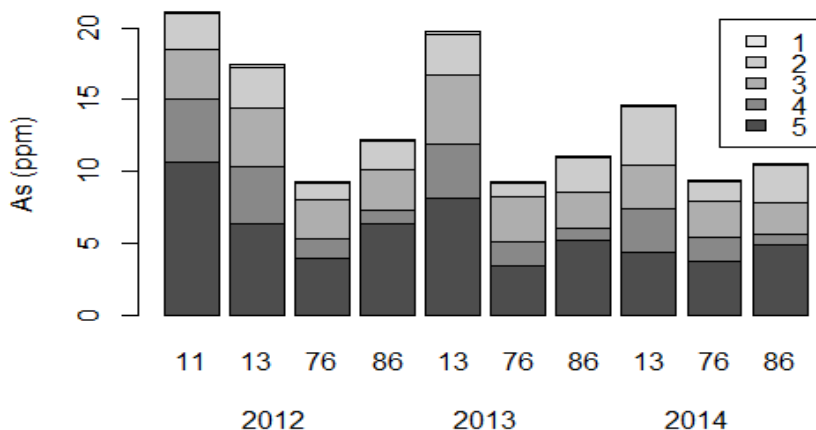


Figura 15 – Valores médios do As (ppm) do solo obtido em 5 extracções sequenciais.

No QUADRO 12 apresentam-se os resultados do teor de As (em ppb) nas 4 subamostras que compõem algumas amostras compostas de solo correspondentes à unidade de amostragem de 6x6 m². Desta forma procurou avaliar-se a variabilidade do teor de As do solo a muito pequena distância. Neste caso a análise incidiu apenas no As obtido pelas primeiras 4 soluções extractivas.

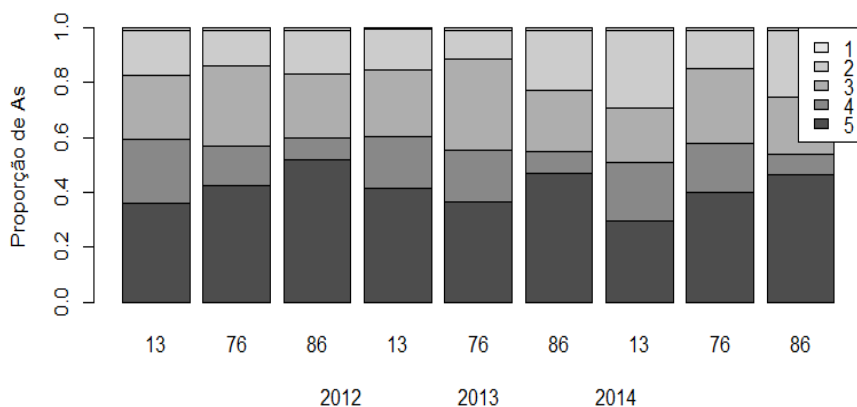


Figura 16 – Valores médios do As (ppm) do solo obtido em 5 extracções sequenciais, expresso em valor relativo ao total extraído.

Verifica-se que, embora a variabilidade seja um pouco menor do que a registada em cada canteiro, pode atingir valores do coeficiente variação de quase 50%. Utilizando as amostras compostas para cada área de 6 x 6 m², o coeficiente de variação dos resultados obtidos para cada canteiro superaram várias vezes o valor de 50% chegando a atingiram os 80%, em

especial para as fases extractivas 1 e 2. Mesmo o As obtido nas fases 3 e 4 apresenta uma elevada variabilidade a muito curta distância ($CV > 30\%$) o que sugere a necessidade de recorrer a um número muito elevado de amostras para se conseguir uma adequada caracterização do solo de uma determinada parcela.

QUADRO 11 – Dados estatísticos do As (ppm) do solo de todas as parcelas obtido em 5 extracções sequenciais (Fase) para cada ano.

Fase	Ano	N	\bar{x}	s	cv (%)	min.	mediana	máx.
1	2012	24	0.12	0.05	44.3	0.06	0.11	0.27
	2013	24	0.09	0.05	47.9	0.03	0.09	0.21
	2014	24	0.10	0.03	32.5	0.04	0.10	0.18
2	2012	24	2.01	1.52	75.9	0.40	1.58	4.78
	2013	24	2.09	1.27	60.9	0.50	1.66	4.83
	2014	24	2.66	2.00	75.0	0.57	1.95	7.15
3	2012	24	3.19 ^{ab}	0.83	25.9	1.91	3.10	4.47
	2013	24	3.45 ^b	1.32	38.2	2.04	3.15	7.48
	2014	24	2.57 ^a	0.43	16.7	1.97	2.55	3.63
4	2012	24	2.12	1.48	69.6	0.71	1.41	5.24
	2013	24	2.12	1.36	64.0	0.79	1.84	5.09
	2014	24	1.85	1.13	61.2	0.51	1.38	3.79
5	2012	3	5.53	1.38	25.0	3.93	6.33	6.33
	2013	3	5.57	2.40	43.1	3.40	5.16	8.15
	2014	3	4.32	0.57	13.2	3.74	4.33	4.88

Legenda: N, número de amostras; \bar{x} , média; s, desvio padrão; cv, coeficiente de variação; min, valor mínimo; máx., valor máximo.

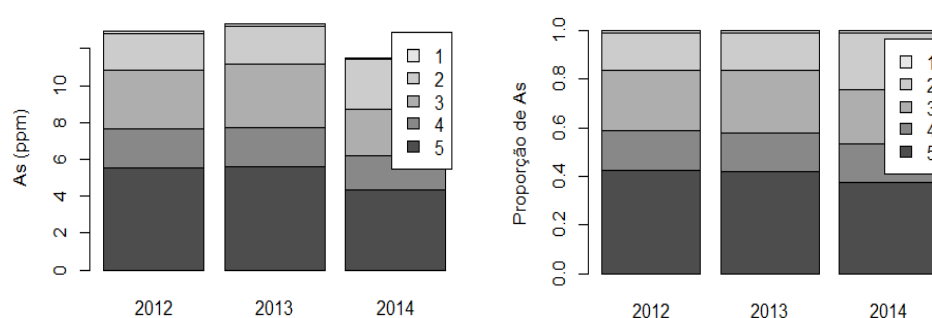


Figura 17 – Média do As (ppm) do solo, de todas as parcelas, obtido em 5 extracções sequências, para cada ano.

QUADRO 12 – Teor de As (ppb) nas 4 subamostras que compõem a amostra composta de solo correspondente ao quadrado 6x6 m² com a referência indicada na coluna ‘Amostra’.

Ano	Amostra	Fase	N	\bar{x}	s	cv (%)	min.	mediana	máx.
2013	13.5	1	4	100	41	41.0	41	114	134
		2	4	3679	305	8.3	3327	3669	4050
		3	4	5994	1046	17.5	4797	5920	7338
		4	4	4884	672	13.8	4017	4994	5533
	13.9	1	4	155	38	24.6	120	148	206
		2	4	4627	2292	49.5	3207	3634	8034
		3	4	7296	2371	32.5	4733	6988	10475
		4	4	4403	235	5.3	4075	4471	4594
	86.1	1	4	87	28	32.2	50	90	118
		2	4	3138	666	21.2	2408	3061	4023
		3	4	3121	196	6.3	2827	3214	3228
		4	4	1002	314	31.4	708	945	1408

Legenda: N, número de amostras; \bar{x} , média; s, desvio padrão; cv, coeficiente de variação; min, valor mínimo; máx., valor máximo.

4.4. Água de rega e solução do solo

No Ano de 2012 procedeu-se à determinação do teor de As em algumas amostras da água de rega, da toalha de água sobre o solo e da solução do solo nos canteiros 11 e 86. A água de rega revelou valores inferiores ao limite legal de As para a água potável (<10 ppb ou µg/l). Os teores de As obtidos para a água superficial e a solução do solo estão indicados no QUADRO 13.

QUADRO 13 – Média de 3 leituras de As (mg/l) medidos na água superficial (Sup.) e na solução do solo (Sol.) recolhida a cerca de 5 cm de profundidade nos canteiros 11 e 86, em áreas próximo do ponto de entrada de água e do ponto de drenagem.

Água	Data	Canteiro 11				Canteiro 86			
		Entrada		Saída		Entrada		Saída	
		média	s	média	s	média	s	média	s
Sup.	20/09/2012	0.008	-	0.014	-	0.042		0.080	-
Sol.	20/09/2012	0.013	0.005	0.018	0.004	0.020	0.000	0.018	0.019
Sol.	25/09/2012	0.009	0.010	0.011	0.012	0.022	0.017	0.094	0.013
Sol.	02/10/2012	0.051	0.047	0.039	0.038	0.003	0.001	0.020	0.015
Sol.	Todas	0.024	0.031	0.023	0.023	0.013	0.012	0.041	0.041

Os valores obtidos para a solução do solo (~0, 02 mg L⁻¹ ou 20 µg L⁻¹) embora baixos, ultrapassam o limite máximo admitido para a água potável. Admitindo uma absorção passiva do As desta solução poderia levar a uma concentração potencial na planta até cerca de 20 mg/kg (20 ppm).

5. Ensaio

5.1. Ensaio em vasos (2014)

Os resultados dos ensaios em vasos, realizados no COTArroz, testaram modalidades alternativas em 3 factores: aplicação de As, nível de água sobre o solo e variedades.

Os resultados do teor de As no grão de arroz, folhas e raízes apresentam-se, respectivamente, no QUADRO 14 e na Figura 18, no QUADRO 15 e na Figura 19 e no QUADRO 16 e na Figura 20.

QUADRO 14 – Teor de As (ppb) no grão de arroz. A modalidade sem alagamento não obteve produção suficiente (grão) para analisar (s/ diferenças significativas).

As	Alagamento	Variedade	N	\bar{x}	s	cv (%)
Não	Sim	Ariete	3	137	51	37.4
Sim	Sim	Ariete	3	144	80	55.6
Não	Sim	Gládio	3	108	58	53.4
Sim	Sim	Gládio	2	92	6	7.0

Legenda: N, número de amostras; \bar{x} , média; s, desvio padrão; cv, coeficiente de variação.

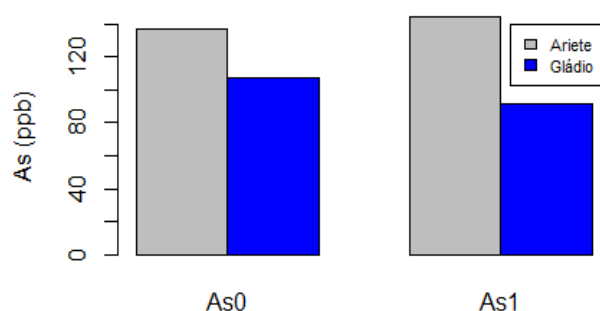


Figura 18 – Teor médio de As no grão de arroz apenas na modalidade com alagamento.

O teor de As no grão refere-se apenas á modalidade com alagamento normal, dado que na modalidade alternativa em que se manteve a água ao nível da superfície do solo, a produção de grão obtida não foi suficiente para permitir a análise nas condições padrão.

O efeito dos restantes factores testados não originou diferenças significativas do teor de As no grão. Este facto é revelador da grande capacidade tampão de ambas as variedades de arroz em impedir que o nível excessivo de As aplicados à solução do solo numa das modalidades, se reflectisse no teor de As do grão.

Pelo contrário, verificaram-se diferenças significativas no teor de As das folhas em todas as modalidades testadas. A principal diferença ocorreu entre a modalidade com alagamento e sem alagamento, mais que duplicando o teor de As nas folhas da primeira relativamente à segunda.

QUADRO 15 – Teor de As (ppm) nas folhas de arroz. Verificam-se diferenças significativas nos níveis de As (aplicado e não aplicado), no nível de água à superfície, nas variedades e na interacção entre o nível de As aplicado e o nível de água.

As	Alagamento	Variedade	N	\bar{x}	s	cv (%)
Não	Não	Ariete	3	0.43	0.48	112.3
Sim	Não	Ariete	3	0.84	0.36	43.3
Não	Sim	Ariete	3	1.10	0.16	1.24
Sim	Sim	Ariete	3	2.39	0.12	4.9
Não	Não	Gládio	3	0.13	0.03	23.9
Sim	Não	Gládio	3	0.52	0.14	27.1
Não	Sim	Gládio	3	1.02	0.01	1.3
Sim	Sim	Gládio	3	1.67	0.37	23.1

Legenda: N, número de amostras; \bar{x} , média; s, desvio padrão; cv, coeficiente de variação.

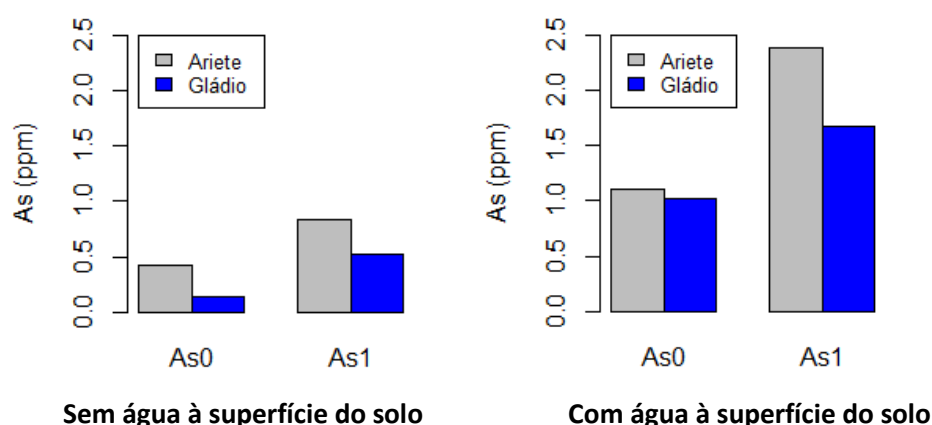


Figura 19 – Teor médio de As nas folhas de arroz.

No caso das raízes verificaram-se diferenças no teor de As com significado estatístico entre as duas modalidades dos factores aplicação de As vs. não aplicação e entre alagamento vs. não alagamento. As diferenças entre variedades não são significativas.

QUADRO 16 – Teor de As (ppm) nas raízes. Verificam-se diferenças significativas nos níveis de As (aplicado e não aplicado), no nível de água e na interacção entre o nível de As aplicado e o nível de água. As diferenças entre variedades não são significativas.

As	Alagamento	Variedade	N	\bar{x}	s	cv (%)
Não	Não	Ariete	3	1.79	0.70	39.0
Sim	Não	Ariete	3	6.85	4.00	58.3
Não	Sim	Ariete	3	10.19	8.67	85.1
Sim	Sim	Ariete	3	33.07	4.27	12.9
Não	Não	Gládio	2	1.06	0.52	48.7
Sim	Não	Gládio	3	4.33	2.86	66.1
Não	Sim	Gládio	3	15.50	5.21	33.6
Sim	Sim	Gládio	3	35.46	6.95	19.6

Legenda: N, número de amostras; \bar{x} , média; s, desvio padrão; cv, coeficiente de variação.

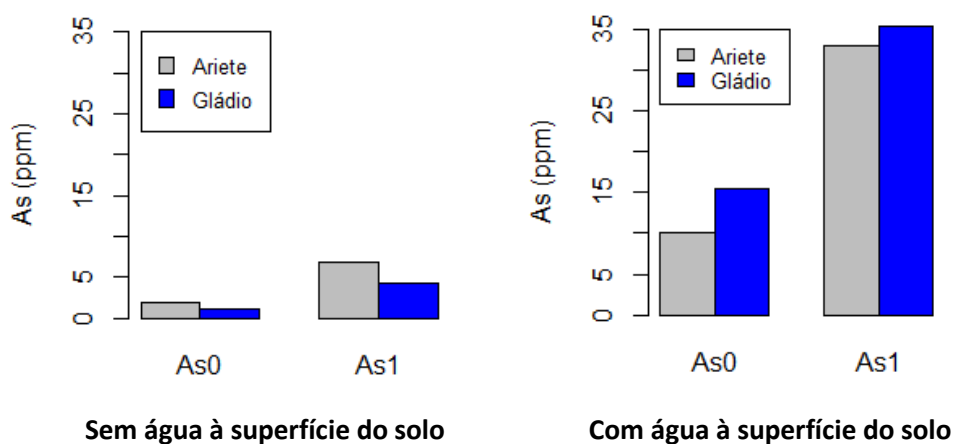


Figura 20 – Teor médio de As na raiz de arroz.

Parece existir uma tendência de inversão nas posições entre a variedade Ariete e Gládio, sendo esta última tão ou mais acumuladora de As na raiz do que a primeira, mas conseguindo transferir menos As para a parte aérea das plantas.

Sobressai destes ensaios que aumentando o As disponível na solução do solo aumenta a sua absorção por parte das plantas. Este aumento foi especialmente notório nas raízes, um pouco menos nas folhas e imperceptível no grão. Isto revela que pelo menos com a concentração de As aplicada, ambas as variedades testadas revelaram muito boa e quase igual eficácia a impedir a transferência de As para o grão.

Verificou-se ainda que a redução da toalha de água sobre o solo pode contribuir para uma diminuição drástica no As absorvido pelas raízes e pelas folhas. Em contrapartida, sem a cobertura de água, a produção de grão pode reduzir-se substancialmente, o que nos impediu de avaliar o efeito deste factor na acumulação de As no grão.

5.2. Incubações em laboratório

Sabendo que a disponibilidade do arsénio é maior quando este elemento se encontra na sua forma reduzida As(III), que tende a aumentar na solução com o encharcamento do solo, realizaram-se incubações anaeróbias com solos colhidos em 2 canteiros de arroz: um na lezíria junto ao rio Tejo (13) e o outro na região de Benavente (76).

As incubações envolveram simultaneamente duas componentes, ambas sujeitas a iguais condições de saturação e alagamento com água: frascos abertos com um sistema de recolha de solução do solo com vista à determinação do pH, Eh e As; contentores fechados para determinação do As da solução e do solo.

Como seria de esperar o valor do Eh em ambos os solos reduziu-se substancialmente ao longo do tempo, desde cerca de +156 mv no dia “0” até cerca de -259 mv no final da incubação, reflectindo a formação de condições fortemente redutoras (Figura 21).

O pH do solo saturado variou entre 7.91 e 7.16 no solo 13 e à volta de 6.50 no solo 76 (Figura 22). O pH da solução do solo começou por corresponder aos valores característicos de cada solo (QUADRO 9) e apresentou um padrão em linha com a tendência típica de evolução do pH em solo saturado, reduzindo-se para valores ligeiramente acima de 7 no solo do canteiro 13 e subindo para cerca de 7 no solo do canteiro 76.

A evolução do teor de As na solução do solo reflecte as condições de redução traduzidas pelo Eh. Aumentou regularmente ao longo do período de incubação, passando de $\sim 2 \mu\text{g L}^{-1}$ no início do ensaio para $\sim 171 \mu\text{g L}^{-1}$ no final (Figura 23). Esta tendência evidencia um aumento substancial do potencial de absorção de As pelas plantas de arroz com o aumento do tempo de encharcamento, em especial a partir do final da 2ª semana em que a concentração de As supera os $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

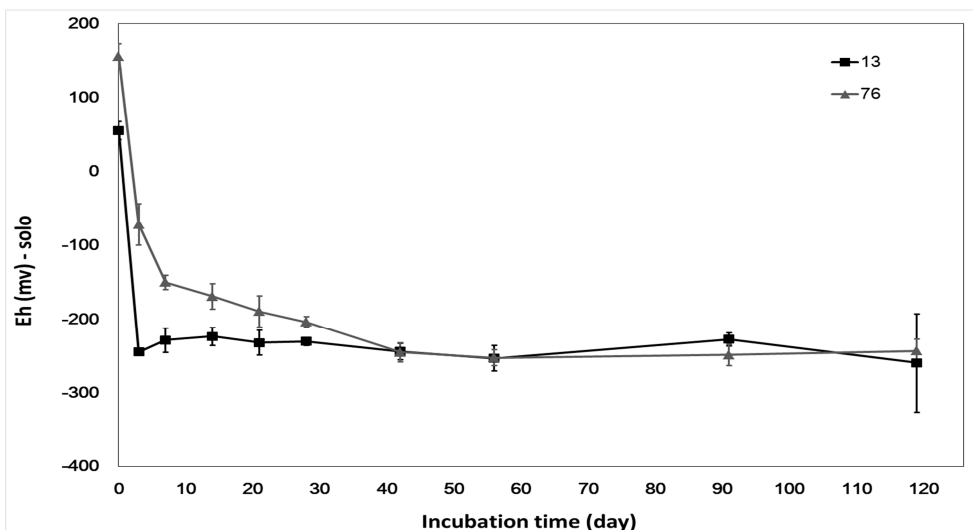


Figura 21 – Evolução temporal do potencial redox (Eh em mv) na solução do solo dos canteiros 13 e 76.

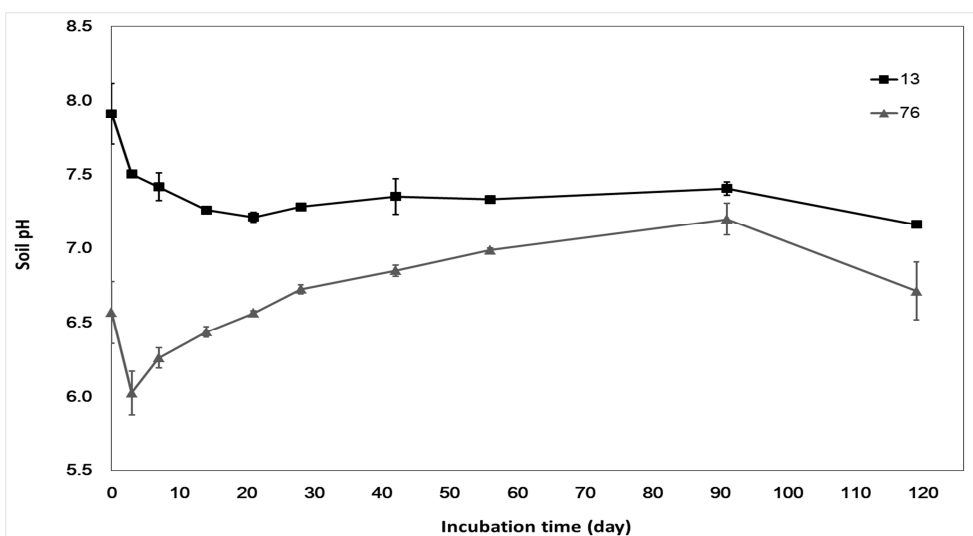


Figura 22 – Evolução temporal do pH medido na solução do solo dos canteiros 13 e 76.

A Figura 24 ilustra a evolução do teor de As da solução dos mesmos solos nas incubações em contentores fechados. Verifica-se uma clara diferenciação no comportamento dos dois solos. No solo do canteiro 76 o teor de As da solução tem uma evolução equivalente à verificada nas incubações abertas, atingindo no entanto concentrações um pouco mais elevadas. No solo do canteiro 13 o teor de As na solução começa com o mesmo tipo de evolução que nas restantes incubações mas, por volta do final da 4ª semana, dá-se uma inversão dessa tendência, reduzindo-se para valores pouco mais elevados do que no início da incubação e mantendo-se

assim até ao final do período de incubação. Os dados disponíveis não permitem uma explicação definitiva para o comportamento deste solo (13) sugerindo, a partir de certa altura, a ocorrência de um ou mais mecanismos que levaram à remoção do As dissolvido na solução. Pela importância que podem ter para o controlo do As na solução do solo justifica-se um aprofundamento deste estudo.

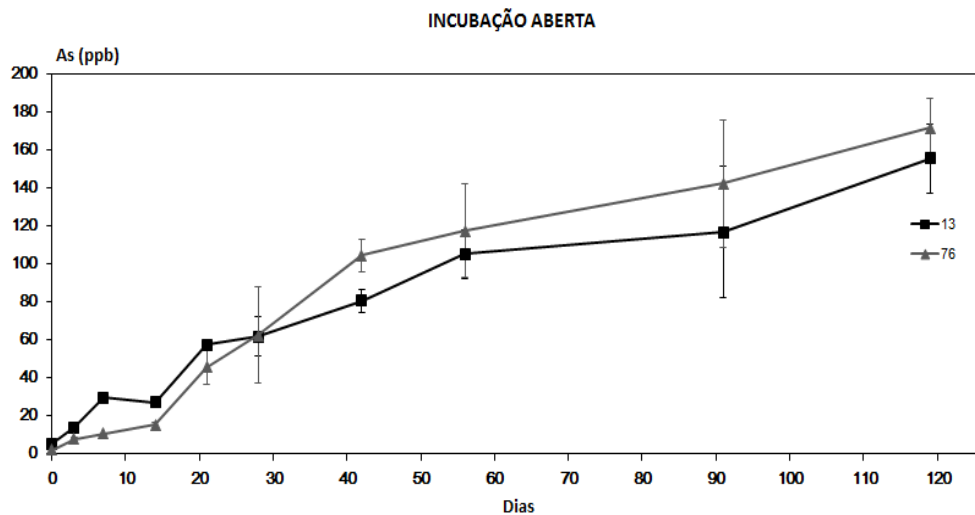


Figura 23 – Evolução temporal do teor de As (ppb) na solução do solo dos canteiros 13 e 76, em incubação aberta.

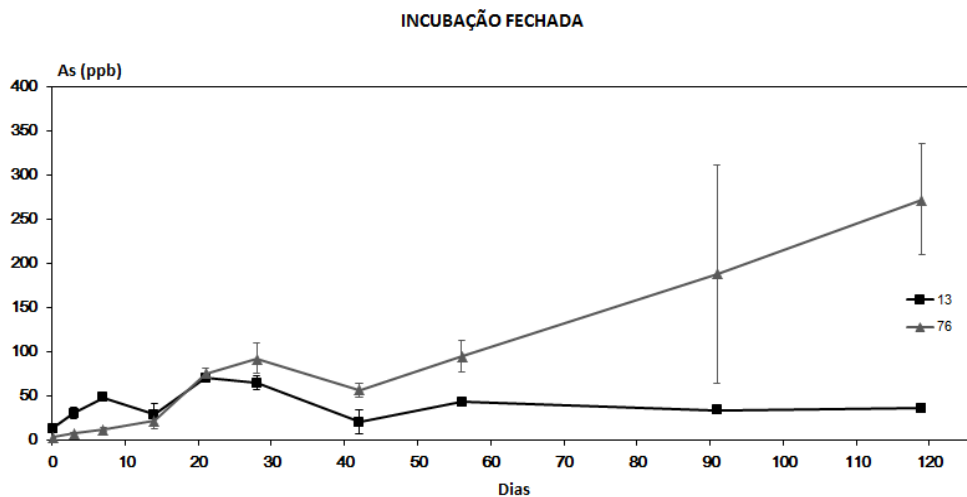


Figura 24 – Evolução temporal do teor de As (ppb) na solução do solo dos canteiros 13 e 76, em incubação fechada.

5.3. Enzimas do solo

A actividade enzimática de fosfatases foi mais elevada nos solos dos canteiros 86 e 76, o que poderá estar relacionado com o menor teor em fósforo presente nestes solos, bem como com o pH mais ácido (QUADRO 9). Os resultados obtidos parecem estar de acordo com os resultados tabelados (Burns e Dick, 2002), uma vez que a actividade da enzima fosfatase aumenta quando a quantidade de fósforo é baixa ou quando a planta não consegue utilizar o fósforo inorgânico disponível (Tran et al., 2010).

Os valores de actividade enzimática arilsulfatase diferiram significativamente entre as quatro amostras de solo estudada, tendo sido máximo para a parcela 11, com um valor de 3,65 $\mu\text{mol/h/g}$. Segundo a bibliografia, estes valores encontram-se de acordo com os valores tabelados o que confere aos solos quantidade de enxofre suficiente para o seu metabolismo (Burns e Dick, 2002).

A actividade enzimática β -glucosidase apresentou valores entre 2.6 e 4.7 $\mu\text{mol/h/g}$, tendo sido máxima e significativamente diferente para o canteiro 76. Este facto poderá estar relacionado com os níveis de carbono orgânico presente neste solo, uma vez que esta enzima está envolvido no ciclo do carbono e degradação de compostos glucídicos presentes no solo.

A actividade desidrogenase, enzima presente apenas em células vivas, foi de 21,1-65,5 $\mu\text{mol/h/g}$, tendo sido significativamente superior nos canteiros 13 e 11. Este facto poderá indicar a existência de uma elevada actividade microbiana, uma vez que esta é uma enzima intracelular relacionada com os processos de fosforilação oxidativa (Burns e Dick, 2002).

Os valores da actividade enzimática urease foram de 3,9 - 36,0 $\mu\text{mol/h/g}$, tendo sido mínima no solo B. Todas as outras parcelas apresentaram valores de actividade enzimática superior a 15 $\mu\text{mol/h/g}$. Este facto poderá estar relacionado com os teores de N mais elevados nos solos 86, 13 e 11 (Burns e Dick, 2002, Martins et al, 2010).

No estudo de modelação pelo As (III) observou-se que todos os enzimas testados foram sensíveis à presença deste composto no solo, tendo-se obtido uma curva dose resposta, em que a actividade foi diminuindo à medida que aumentou a quantidade de As(III). Os valores de As (III) correspondentes a uma inibição de 50% da actividade enzimática (IC 50) oscilaram entre 138 e 1216 ppm para os diferentes enzimas estudados no solo 11. A actividade enzimática de fosfatases foi a que se mostrou mais sensível à presença de As(III), com um valor de IC 50 de 138 ppm. Contrariamente, a actividade de desidrogenases, foi a que se mostrou mais resistente à presença de As (III), com um valor de IC 50 de 1216 ppm para este solo, o que poderá ser devido à adaptação dos microrganismos presentes no solo 11 a este xenobiótico. A elevada sensibilidade para o As (III) das atividades enzimáticas de fosfatases e ureases poderá estar relacionada, respectivamente, com uma diminuição das concentrações de P e de N disponíveis para as plantas, na presença de elevados teores de As (III) e, assim, poder também ter implicações ao nível da produtividade do arroz.

5.4. Outros ensaios

Sumariam-se neste ponto alguns ensaios realizados ao longo do projecto:

- 2010/a - Teste de tolerância ao arsénio de 4 variedades de arroz (Agulha, Aromático, Albatroz e Ariete) em hidroponia com concentrações de 0, 30 ou 90 micromolar de As. Verificou-se que Albatroz e Ariete eram as mais tolerantes ao As. Não foram medidos teores em As.
- 2010/b - Teste do efeito de fósforo e ferro sobre a toxicidade do As para o arroz (Aromático). Não se verificaram alterações na fisiologia ou crescimento das plantas. Não foram medidos teores em As.
- 2012/a - Teste do efeito do nível da água acima do solo sobre a toxicidade do As para o arroz (Ronaldo e Ariete). Não se verificaram alterações na fisiologia ou crescimento das plantas. Não foram medidos teores em As.
- 2012/b - Teste do efeito da aplicação de silício ao solo sobre a toxicidade do As para o arroz (Creso, Giano, Ronaldo e Ariete). Não se verificaram alterações na fisiologia ou crescimento das plantas. Não foram medidos teores em As.

6. Discussão adicional de resultados

6.1. As no arroz (grão) vs. As no solo

Procurou-se relacionar teor de As no grão de arroz com o teor de As extraído do solo (em todas as fases extractivas) utilizando para o efeito todas as amostragens comuns realizadas nos canteiros 11, 13, 76 e 86, nos anos 201, 2013 e 2014.

Os gráficos da Figura 25 mostram que as relações encontradas não são muito prometedoras para estabelecer uma correlação fiável entre o As extraído do solo, por qualquer das soluções aplicadas, e o As determinado no arroz (grão).

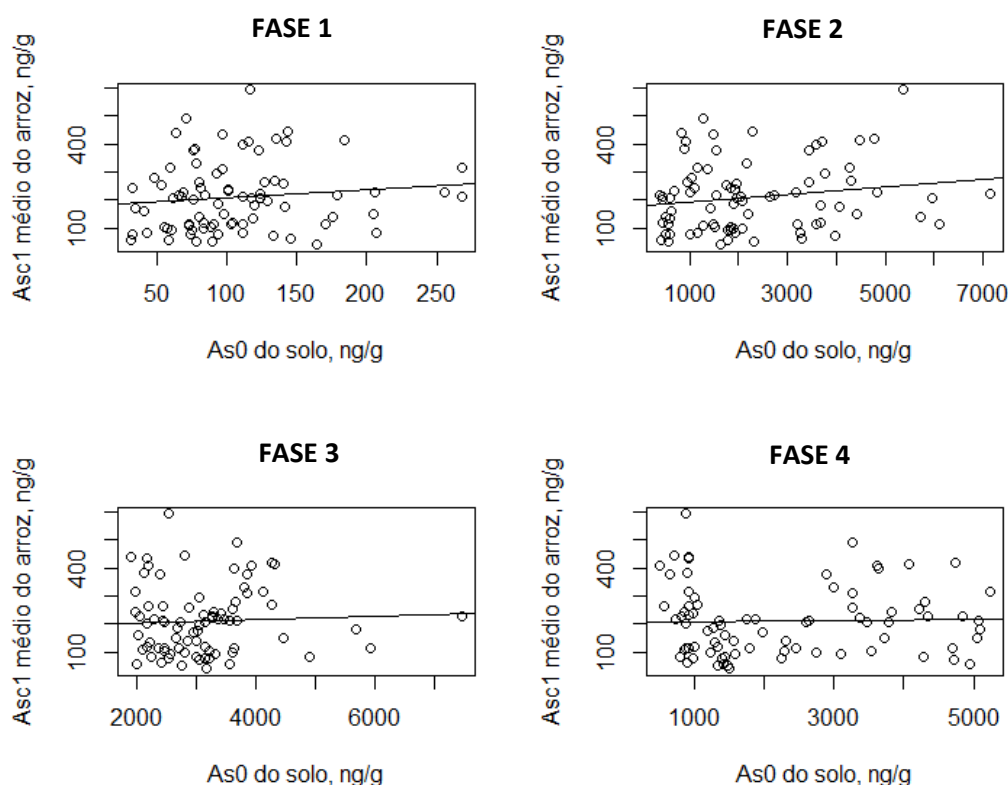


Figura 25 – Relações entre o teor de As no grão de arroz e o teor de As extraído do solo (fases extractivas 1 a 4). Valores de todas as amostragens comuns aos canteiros 11, 13, 76 e 86 realizadas em 201, 2013 e 2014.

6.2. As no arroz e condutividade eléctrica aparente do solo

Na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** e na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** (Anexo) podemos observar os valores de condutividade eléctrica aparente (CEa) médios associados à posição geográfica onde foram recolhidos as amostras de arroz e as amostras de solo nos canteiros 11, 13, 76 e 86.

Os gráficos da Figura 25 relacionam o valor de As no arroz com a CEa do solo. Procurou-se avaliar se a CEa poderia reflectir alguma variável edáfica que pudesse estar relacionada com o teor de As no arroz, nomeadamente a salinidade, uma das variáveis que mais influencia a CEa.

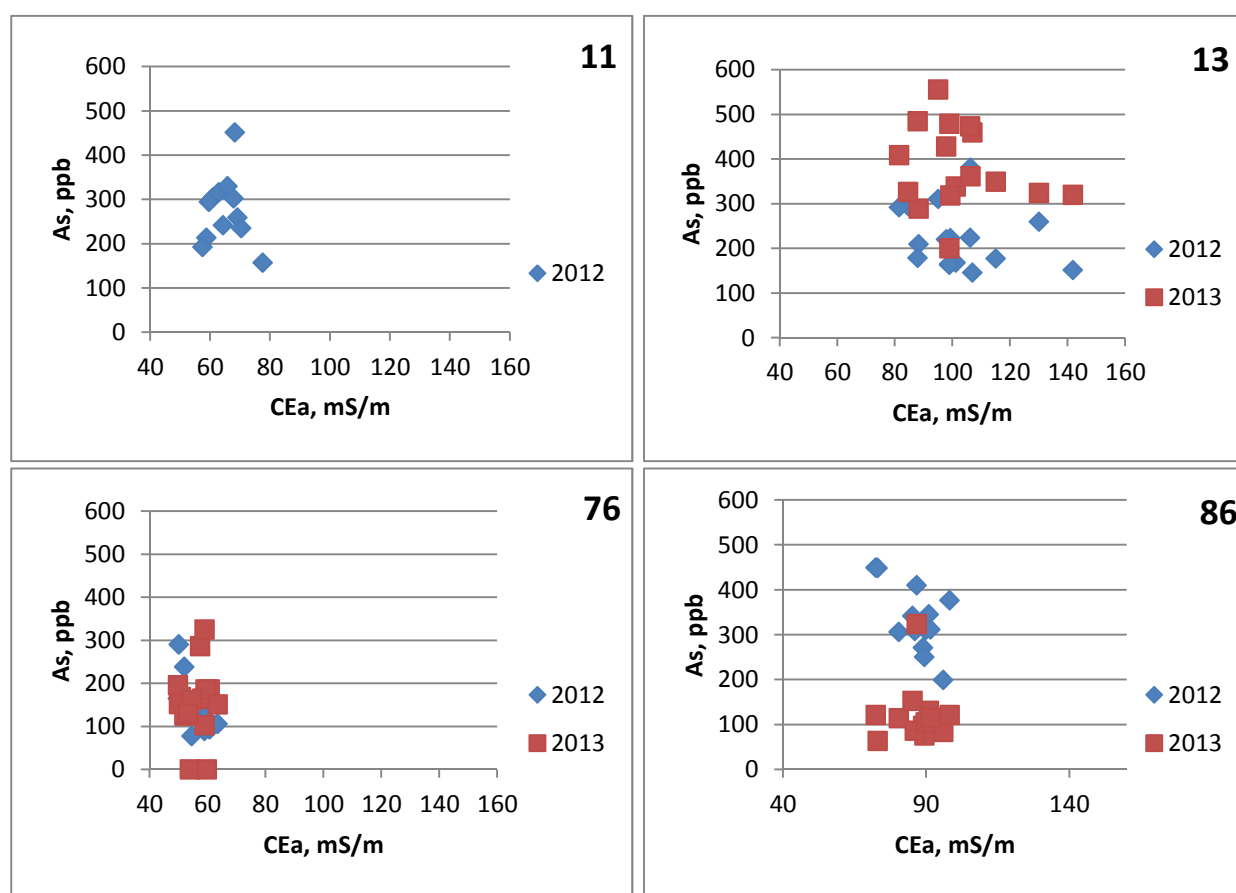


Figura 26 - Condutividade eléctrica aparente do solo e sua relação com o teor de arsénio no grão de arroz nos canteiros 11, 13, 76 e 86 das amostras recolhidas em 2012 e 2013.

No talhão 11 os teores de As em 2012 são relativamente homogéneos centrando-se entre os 200 e 300 ppb e apresentando valores de CEa sensivelmente entre 70 e 80 mS/m.

No canteiro 13, com valores de CEa superiores, entre 80 e 140 mS/m, apercebemo-nos que o teor de As no ano 2012 foi na sua maioria bem mais baixos que em 2013 para as mesmas

posições geográficas. Em 2013 a média da concentração de As no arroz rondou os 400 ppb enquanto em 2012 rondou os 220 ppb. No talhão 13 parece não existir nenhum tipo de relação entre a CEa do solo e a concentração de As no arroz (grão).

No talhão 76, a concentração de As no arroz foi muito semelhante. Com excepção de 3 a 4 amostras, os valores situaram-se entre 100 e 200 ppb não existindo muita variação entre 2012 e 2013. Os valores de CEa são igualmente muito homogéneos, entre 50 e 60 mS/m, não se verificando nenhum tipo de relação entre a CEa do solo e a concentração de As no arroz.

No canteiro 86 os valores de concentração de As no arroz foram muito diferentes, situando-se em 2012 ao redor de 300 ppb e em 2013 ao redor de 100 ppb existindo por isso uma variação relativamente grande entre estes dois anos analisados e com um comportamento oposto ao do talhão 13, uma vez que este apresenta valores de 2013 mais altos que os valores de 2012. No talhão 86 parece também não existir nenhum tipo de relação entre a CEa do solo e a concentração de As no arroz, rondando os valores de CEa do solo entre 70 e 100 mS/m.

Analisando os talhões de forma isolada temos a sensação que a CEa do solo não parece ter nenhuma relação com a concentração de As no arroz. Contudo, se observarmos o ano de 2012 em conjunto (Figura 27) parece existir uma tendência de variação positiva entre o nível de As no arroz e a CEa do solo. Tal relação não se confirmou em 2013. Para os teores de CEa do solo superiores a 80 mS/m todos os valores de As baixaram drasticamente de 2012 para 2013.

A bibliografia refere que a CEa do solo é normalmente estável em termos multianuais, mas a maioria desses estudos não são efectuados em arrozais. A CEa do solo também pode ter sofrido uma variação significativa entre 2012 e 2013, nomeadamente por redução do nível de sais devido a maior lavagem durante o inverno de 2012/2013 por comparação com 2011/2012. O IPMA refere no seu estudo climatológico anual que o inverno de 2011/2012 foi dos mais secos desde 1931, o que pode ter levado a uma acumulação de sais nesse inverno e a uma diminuição mais acentuada de 2012 para 2013. Por outro lado, falta ainda perceber se e como pode a variação da salinidade do solo afectar a absorção e acumulação de As no arroz.

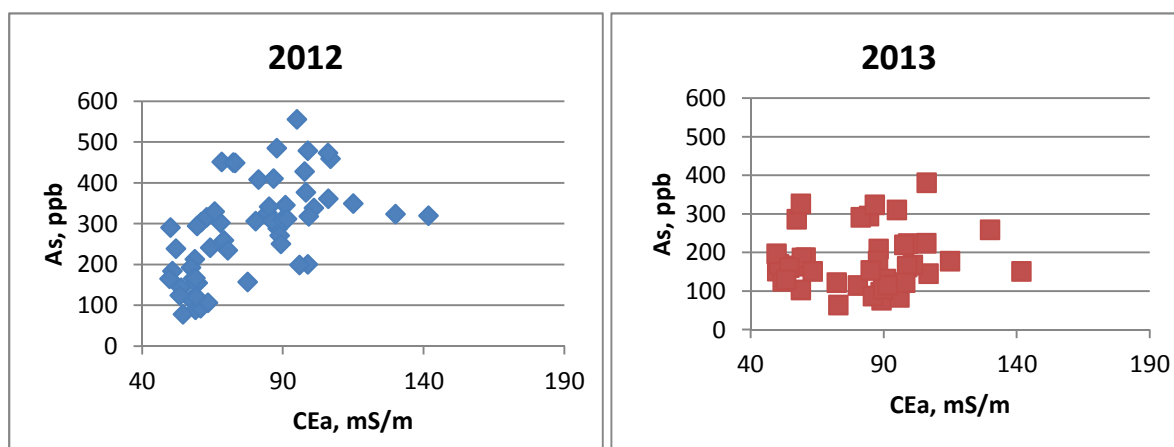


Figura 27 – Condutividade eléctrica aparente do solo e sua relação com o teor de arsénio no grão de arroz de todos os talhões analisada separadamente para os anos 2012 e 2013.

7. Considerações finais

Com base nos resultados obtidos neste projecto destacam-se as seguintes considerações finais:

- Verifica-se uma grande variabilidade interanual no teor de arsénio no arroz (grão). Esta variabilidade foi confirmada quer com os resultados das análises à escala regional (anos 2010 e 2011) que com medições nos mesmos pontos georreferenciados (anos 2012, 2013 e 2014).
- A dispersão de valores do teor de As no arroz (grão) em cada canteiro foi quase da mesma ordem da dispersão em todos os canteiros analisados em cada ano.
- A variedade de arroz teve grande influência nos valores de As observados no grão, originando variações superiores às explicadas pela variação interanual.
- Os solos das parcelas estudadas apresentam até cerca de 50% do As total em formas consideradas não biodisponíveis.
- O nível mais alto das fracções de As potencialmente biodisponíveis foi ~12 ppm. Este valor corresponde a quase 10% do valor de As(III) com que se atingiu a inibição de 50% da actividade das fosfatases (138 ppm) – as enzimas do solo que se revelaram mais sensíveis ao As(III).
- As fracções potencialmente biodisponíveis apresentam elevada variabilidade espacial a muito curta distância obrigando a uma amostragem cuidadosa e um número elevado de amostras para obter uma adequada caracterização do solo de uma parcela.
- Os valores das extracções sequenciais de As no solo apresentaram muito baixas correlações com o teor de As no grão de arroz.
- A condutividade eléctrica aparente (CEa) do solo permitiu detectar padrões que podem estar relacionados com a lavagem de sais nas parcelas estudadas, no entanto a CEa apresentou muito baixa correlação com o teor de As no grão de arroz.
- A aplicação de 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ As(III) à solução do solo (mais de 10 vezes os valores mais altos observados) originou aumentos significativos no teor de As nas raízes e folhas das variedades Ariete e Gládio, mas não originou variações significativas no teor de As no grão de arroz em ambas as variedades.
- A eliminação da toalha de água sobre o solo reduziu substancialmente a acumulação de As nas raízes e folhas das plantas. Não foi possível determinar o seu efeito no teor de As no grão de arroz pela redução de produção que também se verificou.
- Em incubação anaeróbia o teor de As na solução do solo subiu regularmente ao longo do tempo a par da descida do potencial redox, enquanto o pH do solo se manteve em valores próximos da neutralidade. O maior aumento da concentração de As na solução do solo e, portanto, do risco de absorção pelas plantas, ocorreu a partir do final da 2ª semana quando a concentração de As superou os 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

8. Agradecimentos

A equipa do projecto PRODER N^o 12416 agradece às seguintes entidades e colegas que, em diferentes momentos e de diferentes formas, deram um contributo relevante para a sua concretização:

- À Prof^a Manuela Morais e à Dr^a Anabela Rosado do Laboratório da Água da Universidade de Évora, pelo apoio nas análises ao As no arroz em HG-AAS.
- À Prof^a Maria do Rosário Martins do Departamento de Química da Universidade de Évora, à Dr^a Claudia Nunes e à Dr^a Lucília Mouquinho pela realização do trabalho com as enzimas do solo.
- À Eng.^a Ana Sofia, à Eng.^a Paula Marques e restantes funcionários do COTArroz por todo o apoio logístico aos ensaios com arroz em vasos realizados em 2014.
- Ao Prof. José Mirão e ao Dr. Pedro Barrulas, do Laboratório Hércules da Universidade de Évora pelas análises ao As no arroz em ICP-MS.

9. Referências bibliográficas

Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Burns RG, Dick Richard P. 2002. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*, CRC Press.

Calle, M.B. , Linsinger, T., Emteborg, H., Charoud-Got, J. & Verbist, I. 2010. Report of the seventh interlaboratory comparison organized by the European Union – Reference Laboratory for Heavy Metals in Feed and Food. JRC Scientific and Technical Reports, EUR24314 EN. Institute for Reference Materials and Measurements, JRC, European Commission.

Elgaard L, Andersen GH, Eriksen J. 2002. Measurement of arylsulphatase activity in agricultural soils using a simplified assay. *Soil Biology and Biochemistry* 34:79-82.

Ferreira, António. 2000. Dados Geoquímicos de Base de Sedimentos Fluviais de Amostragem de Baixa Densidade de Portugal Continental: Estudo de Factores de Variação Regional. Tese de Doutoramento, Departamento de Geociências, Universidade de Aveiro.

IARC. 2012. *Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 100C. International Agency for Research on

Cancer. Disponível na internet em 12/05/2015:

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-6.pdf>

- IM, 2010, 2011. Boletins Climatológicos Mensais. Portugal Continental. Instituto de Meteorologia, I.P.
- IPMA, 2012, 2013, 2014. Boletins Climatológicos Mensais do IPMA. Portugal Continental. Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.
- Mandal, BK & Suzuki, KT. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58, 201– 235.
- Martins MR, Santos F, Candeias P, Cruz-Morais J. 2010. Efeito da temperatura, pH e vestígios de Hg²⁺ e Pb²⁺ na actividade de desidrogenases e urease num solo da região de Évora. *Rev. de Ciências Agrárias* 33(1): 314-322. ISSN 0871-018X
- Matos-Reyes, M.N.; Cervera, M.L.; Campos, R.C.; Guardia, M. de la. 2010. Total content of As, Sb, Se, Te and Bi in Spanish vegetables, cereals and pulses and estimation of the contribution of these foods to the Mediterranean daily intake of trace elements. *Food Chemistry* 122, 188–194.
- Ng, J.C., Wang, J. & Shraim, A. 2003. A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere* 52 (2003) 1353–1359
- NIST, 1995. *Standard Reference Material*, ref. SRM 1568a (rice flour), National Institute of Standards & Technology.
- Pascual JA, Hernandez T, Garcia C, Ayuso M. 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experimente. *Bioresource Technology*. 64:131-138.
- Robberecht H, Van Cauwenbergh R, Bosscher D, Cornelis R, Deelstra H. 2002. Daily dietary total arsenic intake in Belgium using duplicate portion sampling and elemental content of various foodstuffs. *European Food Research and Technology* 214:27-32.
- Smith, E, Naidu, R, Weber, J & Juhasz, A L. 2008. The impact of sequestration on the bioaccessibility of arsenic in long-term contaminated soils. *Chemosphere*, 71, 773-780.
- Stroud, Jacqueline L. et al. 2011. Assessing the Labile Arsenic Pool in Contaminated Paddy Soils by Isotopic Dilution Techniques and Simple Extractions. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 4262-4269.
- Su YH, McGrath SP, Zhao FJ. 2010. Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley. *Plant Soil* 328:27-34.
- Syu, Chien-Hui et al. 2013. Arsenic sequestration in iron plaque and its effect on As uptake by rice plants grown in paddy soils with high contents of As, iron oxides, and organic matter. *Soil Science and Plant Nutrition*, 59, 463-471.

- Tran HT, Hurley BA, Plaxton WC. 2010. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition, *Plant Science* 179:14-27.
- Turner BL, Hopkins DW, Haygarth PM, Ostle N. 2002. β -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology* 20:157-162.
- Weaver RW, Mickelson SH. 1994. *Methods of soil analysis. Part 2 - Microbial and Biochemical properties.* Soil Science Society of America, Wisconsin, USA.
- Wenzel, W W, Kirchbaumer, N, Prohaska, T, Stingeder, G, Lombi, E & Adriano, D C. 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta* 436: 309–323.
- WHO, 2001. *Arsenic and Arsenic Compounds. Environmental Health Criteria 224* (2nd ed.) World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Geneva. Disponível na internet em 12/05/2015:
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm#4.1.4>
- Williams PN, Villada A, Raab A, Figuerola J, Green AJ, Feldmann J, Meharg AA. 2007. Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environ. Sci. Technol.* 41:6854-6859.