

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ARSÉNIO EM ARROZ E PRODUTOS DERIVADOS DE ARROZ

Ana Catarina Pereira Simões

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins

Coorientador: Mestre Inês Neto Moreira

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram e contribuíram para a realização desta dissertação e a todos aqueles que de uma maneira ou de outra fazem parte da minha vida e contribuem para minha formação académica e pessoal.

À Professora Doutora Luísa Louro Martins por me ter recebido de braços abertos neste projeto, pelas palavras de incentivo e principalmente pela simpatia e carinho que sempre me demonstrou.

Ao Professor Doutor Miguel Pedro Mourato por toda a ajuda, disponibilidade e amizade.

À Inês Neto Moreira pela ajuda no laboratório e na revisão da dissertação, pelos conselhos de incentivo, pelas conversas interessantes, sorrisos e boa disposição.

Ao Instituto Superior de Agronomia por me ter dado os meios e as condições para a realização deste trabalho e por ser um local onde passei muitos bons momentos e do qual vou ter muitas saudades.

A todas as pessoas do laboratório 17A que me receberam tão bem e sempre arranjam um espacinho para as minhas amostras.

Às minhas amigas de sempre que contribuem todos os dias para que eu seja uma pessoa mais feliz. Um agradecimento à Mariana Madrinha, porque sem o apoio dela nos últimos tempos esta dissertação não teria sido mesmo possível. Às minhas amigas do mestrado que contribuíram para que a vida no ISA fosse uma animação. Um agradecimento muito especial à Marta Egídio por ter sido tão importante durante este processo e porque sei que posso sempre contar com ela para tudo.

Aos meus pais, um obrigada do tamanho do mundo por sempre me terem apoiado em todos os meus projetos e terem permitido que chegasse até esta etapa da minha vida académica.

Aos meus queridos avós, Ana e Orlando, que construíram tanto da pessoa que sou hoje. À minha avó Pilar, que me ensina tanta coisa e de quem tenho tanto orgulho. E ao meu avô Fernando, que sei o quanto gostaria de estar presente para me ver chegar a esta etapa da minha vida.

Ao Rui, que tem o dom de me fazer esquecer todas as preocupações e consegue sempre arrancar-me um sorriso mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço-lhe por muitas vezes ser a melhor parte do meu dia.

Um muito obrigada a todos!

RESUMO

Neste estudo analisou-se a presença de arsênio (As) em arroz e produtos de arroz em 21 amostras. A concentração média de As variou entre 12,0 – 400,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($>10 \mu\text{g kg}^{-1}$). No arroz detetou-se As em todas as amostras (12,0 – 300,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$), sendo que as concentrações mais elevadas foram encontradas em arroz português e os teores mais reduzidos nas variedades asiáticas. Os valores sugerem que o teor de As em arroz e produtos de arroz depende de múltiplos fatores. No arroz parece estar relacionado com a variedade e a sua origem geográfica e, nos produtos derivados depende do teor de arroz existente na composição, origem geográfica, variedade de arroz utilizado, tipo de produção e seu processamento. Procedeu-se à cozedura de 3 amostras de arroz e, as variações que ocorreram no teor de As não foram conclusivas. Usando os valores de concentração de As detetados em amostras de arroz português, estimou-se a ingestão diária de As para a população (0,17 – 0,23 $\mu\text{g kg}^{-1}$), não evidenciando valores preocupantes do ponto de vista toxicológico. Compararam-se metodologias de digestão ácida em bloco de aquecimento e microondas. Os resultados não foram significativamente diferentes entre os métodos e as taxas de recuperação para o material de referência foram boas (88,33%; 95,55%), mostrando que ambos os métodos poderão ser usados para futuros ensaios similares.

Palavras-chave: arroz, produtos de arroz, arsênio, ingestão de arsênio, toxicidade

ABSTRACT

This study assessed the presence of arsenic (As) in rice and rice-based products in 21 samples. Values ranged between 12,0 – 400,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($>10 \mu\text{g kg}^{-1}$). As was detected in all the rice samples (12,0 – 300,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The highest values belonged to Portuguese rice and the lowest were found in the Asian types. Results suggest that the presence of As in rice and rice based-products it is dependent of multiple factors. In rice, the As content seems related to geographical origin and rice type. Regarding the rice-based products, the data suggests that the presence of As depends of the rice percentage in their composition, geographical origin, rice type, rice processing and production method. Three samples of rice were cooked and some inconclusive variations occurred, suggesting that cooking methods have some influence in As content in cooked rice. Using the data of As content found in Portuguese rice samples, it was estimated the dietary intake of As for the Portuguese population (0,17 – 0,23 $\mu\text{g kg}^{-1}$), the results did not reveal worrying values. Two different acid digestion methodologies were compared, by heating block and microwave assisted. The results showed no significant different between the methods and good recovery percentages (88,33%; 95,55%), suggesting that the methods used are adequate for future similar studies.

Keywords: rice, rice-based products, arsenic, arsenic intake, toxicity

EXTENDED ABSTRACT

Arsenic is a naturally occurring metalloid element that is widely distributed in the Earth's crust. When present in high content, arsenic is toxic for plants and animals because of its ability to accumulate in living beings. The International Agency for Research on Cancer (IARC) places inorganic arsenic in drinking water as a group 1 carcinogen, the highest health hazard category, and there is substantial evidence that it increases risk of cancer of the bladder, skin and lungs. Along with contaminated drinking water, arsenic contamination in rice (*Oryza sativa*) has become a global concern as a potential dietary risk to human health. Rice is known for its ability to accumulate arsenic in the rice grain, mostly because of the high plant availability of arsenic under reduced soil conditions. Rice is one of the major staple food crops in the world, consequently, rice is a potentially major source of dietary arsenic intake for much of the world's population, including Portugal which is the highest rice consumer in Europe per capita.

A sample collection was conducted in Portugal to assess the presence of total arsenic content in 21 samples of rice and rice based-products, such as baby rice, cereals, rice milk, biscuits and others. The samples were analysed using electrothermal atomic absorption spectrophotometry (ETAAS). The samples were collected in national supermarkets chains.

Many studies have focused in the assessment of the arsenic content in the raw rice grain. In this study we analysed ten polished (white) grain samples, originating from European and Asian countries. Five different varieties of rice were studied, *japonica* (n=4), *indica* (n=1), *arborio* (n=2), *thai jasmine* (n=2) and *basmati* (n=1). The mean level of total arsenic content in rice ranged between $12,0 \pm 5,5$ and $300,8 \pm 31,8 \mu\text{g kg}^{-1}$. The samples with the highest content in arsenic were Portuguese from the *japonica* and *indica* rice type and the samples with the lowest content in arsenic were *thai jasmine* and *basmati*. These results suggest that geographical origin and rice type have an important influence on the arsenic content of the rice grain.

We investigated the influence of cooking methods on arsenic retention in Portuguese cooked rice. The rice was cooked according to the traditional methods employed by the Portuguese population so it was cooked with limited water (therefore gruel was absorbed completely by the rice). Total arsenic content in cooked rice ranged between $215,4 \pm 9,5$ and $393,2 \pm 35,4 \mu\text{g kg}^{-1}$. Water used for cooking rice was not contaminated with arsenic. The rice cooking had an influence in the concentrations of arsenic content. The results showed no significantly difference between raw and cooked rice samples, except one. More studies will be needed to assess conclusions regarding the influence of cooking methods in the arsenic content in rice.

Using the results of arsenic content in Portuguese rice samples, we estimated the As dietary intake for a Portuguese individual (0,17 – 0,23 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Results were in the existent toxicological parameters, concluding that As in Portuguese rice do not pose a health risk.

We were able to identify the presence of arsenic in almost every rice-based product, which states the importance of the dietary exposure to arsenic through rice and rice-based products. We analysed 3 samples of biscuits (2 gluten-free samples), 3 samples of infant rice (gluten-free) and 1 sample of rice flour for cooking, 1 sample of rice/corn snack (gluten-free), 1 sample of rice crape, 1 sample of infant cereals and 1 sample of rice milk. The highest arsenic content was in the rice flour ($400,5 \pm 27,9 \mu\text{g kg}^{-1}$).

This study investigated the positive correlation between rice content and arsenic level in foods. This relation is very important for infants, because their diet is very limited and in some cases highly dependent on rice-based products, and especially relevant for infants with celiac disease because rice and corn are the only gluten-free options available. The obtained results showed a poor positive correlation suggesting that the presence of arsenic in rice based-products depends of other factors than only the rice percentage, such as geographical origin, rice type and rice processing, rice cultivar and production method (organic or conventional).

Regarding the comparison between gluten and gluten free rice based-products, arsenic contents were higher ($p < 0,005$) in rice-based products with gluten. These results contradict some previous studies, however more research is needed in this case, because the samples used were very distinct in formulation, rice percentage, and production method and belonged to different commercial brands.

We also analysed two different acid digestion methods. The first method used a heating block digester and a combination of two acids (HCl; HNO_3). The second method was a microwave assisted acid digestion in the presence of one acid type (HNO_3). Results showed no significant difference ($p < 0,005$) between the two methods, which means that both methods were adequate for this analysis. Reliability of arsenic analytical methodologies was assured by the use of a reference material (WEPAL IPE-556 Wheat (grain)/*Triticum aestivum*). The experimental results agreed with the certified reference values with good recovery percentages for the reference material (88,33%, 95,55%). Also, samples were spiked with arsenic retrieving good recovery percentages as well.

It was concluded that the presence of arsenic in rice is influenced by many factors, such as geographical origin and rice type. The content in arsenic of rice-based products is dependent of the percentage of rice in their formulation, but also rice type, geographical origin,

production method and rice processing. Regarding the methods used, since no significant differences were determined for the two methods and good recovery percentages were obtained, both methods are adequate for similar studies of assessment of the arsenic content in rice samples.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
EXTENDED ABSTRACT	V
ÍNDICE GERAL.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUÇÃO	2
2.1 O Arsénio.....	2
2.1.1 Distribuição e origem do arsénio	4
2.1.2 Formas e teores de arsénio no ambiente	6
2.2 O Arroz	9
2.2.1 O arsénio no arroz.....	12
2.2.2 - Efeito da cozedura no teor de arsénio	16
2.2.3 O arsénio em alimentos derivados de arroz.....	17
2.3 Toxicidade do arsénio	19
2.3.1 Caso do Bangladesh	22
2.4 Determinação analítica do teor de arsénio em amostras vegetais	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Produtos Alimentares.....	26
3.1.1 Recolha de amostras.....	26
3.1.2 Efeito da cozedura no teor de arsénio	29
3.2 Determinação do conteúdo mineral.....	30
3.2.1 Preparação das amostras.....	30
3.2.2 Digestão ácida em bloco de aquecimento	30
3.2.2.1 Ensaio em branco	31
3.2.2.2 Ensaio em meio fortificado.....	31

3.2.2.3 Ensaio com material de referência certificado	31
3.2.3 Digestão ácida em microondas.....	32
3.2.3.1 Ensaio em branco	32
3.2.3.2 Ensaio em meio fortificado.....	33
3.2.3.3 Ensaio com material de referência certificado	33
3.3 Espectrofotometria de absorção atômica (EAA)	33
3.3.1 Curva padrão de Arsênio.....	33
3.4 Tratamento Estatístico	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Avaliação do teor mineral de As no arroz.....	36
4.1.1 Comparação do teor de As em arroz cru <i>versus</i> arroz cozido	39
4.1.2 Estimativa da Ingestão Diária de Arsênio	41
4.2 Avaliação do teor mineral de As nas amostras derivadas de arroz	42
4.2.1 Concentrações médias de As em bolachas.....	42
4.2.2 Concentrações médias de As em farinhas	44
4.2.3 Concentrações médias de As em amostras de outros produtos derivados de arroz	46
4.2.4 Comparação do teor de As em produtos com e sem glúten	48
4.2.5 Avaliação da correlação entre [As] e composição de arroz nos produtos derivados	50
4.4 Comparação de dois métodos de digestão ácida.....	52
4.4.1 Validação dos métodos de digestão	53
5. CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas de algumas espécies mais comuns de As na Natureza.....	3
Figura 2 – Distribuição mundial de arsénio.....	4
Figura 3 – Ciclo Geoquímico do arsénio.....	5
Figura 4 - Diagrama Eh/pH de espécies aquosas de As no sistema As-O ₂ -H ₂ O. Os produtos de dissociação do AsV estão a azul e os da espécie AsIII estão a cinzento.....	7
Figura 5 – Produção mundial de arroz.....	9
Figura 6 – Morfologia da planta de arroz.	10
Figura 7 – Variedades de arroz consoante o tipo de moenda.....	11
Figura 8 – Mecanismo de transporte de As nas plantas.	13
Figura 9 – Estrutura do grão de arroz.....	15
Figura 10 – <i>Blackfoot disease</i>	20
Figura 11 – Bloco de aquecimento DigiPrep MS (SCP Science)	31
Figura 12 – Microondas (CEM MDS 2000).....	32
Figura 13 – Concentração média de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras comerciais de arroz.	36
Figura 14 – Comparação do teor de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de arroz cru e cozido.....	39
Figura 15 - Concentração média de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras comerciais de bolachas	42
Figura 16 - Concentração média de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras comerciais de farinhas.....	44
Figura 17 - Concentração média de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras comerciais de outros produtos derivados de arroz.....	46
Figura 18 – Relação entre o conteúdo em As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e a percentagem de arroz nos produtos derivados de arroz.	50
Figura 19 – Teor de As em $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras submetidas a dois métodos diferentes de digestão ácida.	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Teores máximos de As de acordo com a legislação em vigor.....	8
Tabela 2 – Composição nutricional de arroz branco cru por 100 g de parte edível.....	11
Tabela 3 – MRL para espécies inorgânicas de As.....	21
Tabela 4 – Variação da toxicidade do As com a especiação (em ratos).....	21
Tabela 5 – Dados referentes ao consumo diário de As pela população do Bangladesh.	23
Tabela 6 – Identificação das amostras de arroz e informações contidas no rótulo dos produtos.....	27
Tabela 7 – Identificação das amostras de bolachas e informações contidas no rótulo dos produtos.....	28
Tabela 8 - Identificação das amostras de farinhas e informações contidas no rótulo dos produtos.....	28
Tabela 9 - Identificação das amostras de outros produtos derivados de arroz e informações contidas no rótulo dos produtos.....	29
Tabela 10 - Concentrações finais dos padrões de As.....	34
Tabela 11 – Dados estimados referentes ao consumo diário de As para a população portuguesa.	41
Tabela 12 – Concentrações de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras com e sem glúten.	48
Tabela 13 – Validação dos métodos de digestão pela comparação da taxa de recuperação do MRC para cada método de digestão ácida.....	53
Tabela 14 – Taxas de recuperação das amostras fortificadas para cada método de digestão ácida.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – Arsenato redutase

DL₅₀ – Dose Letal 50 %

DMA – Ácido Dimetilarsínico

EAA – Espectrofotometria de absorção atômica

FAO – *Food and Agriculture Organization*

GSH – Glutathione

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

LM – Limite Máximo

MMA – Ácido Monometilarsínico

MRC – Material de Referência Certificado

MRL – *Minimum Risk Levels*, Níveis de Risco Mínimos

MTDI - *Maximum Tolerable Daily Intake*, Dose Diária Máxima Tolerada)

NIPs - *nodulin26-like intrinsic proteins*

PCs – Fitoquelatinas

PMTDI - *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*, Dose Diária Admissível Máxima Provisória

SAM – S-adenosil metionina

TMAO – Óxido Trimetilarsina

VMA – Valor Máximo Admissível

WHO – *World Health Organization*, Organização Mundial de Saúde

OBJETIVOS E INTRODUÇÃO

1. OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado insere-se na área de Química e Bioquímica dos Alimentos e propõe avaliar e determinar a presença de arsénio (As) em arroz e produtos derivados de arroz tais como, farinhas alimentares para bebés, bolachas, cereais, bebida de arroz e outros. O interesse em estudar a contaminação de arroz por As prende-se com a importância deste produto alimentar na alimentação da população mundial, e particularmente na alimentação dos portugueses.

O trabalho consistiu na realização de determinações analíticas ao conteúdo mineral das amostras por espectrofotometria de absorção atómica (EAA) em câmara de grafite, através da preparação das amostras por dois métodos diferentes de digestão ácida, por forma a quantificar a presença de As em variedades de arroz agulha, carolino, *thai jasmine*, *basmati* e *risotto (arborio)*; em produtos destinados à alimentação infantil e adequados a doentes celíacos (sem glúten), como farinhas láteas de arroz e, também em bolachas e bebida de arroz.

A avaliação da presença de As no arroz e em produtos derivados de arroz é importante para se verificar a existência de fatores que possam contribuir para a presença deste metalóide nos alimentos. O As é um elemento tóxico em quantidades elevadas e tem a capacidade de se acumular nos seres vivos ao longo do tempo. No entanto, como é incolor e inodoro, a sua presença não é detetada a não ser por determinações analíticas, o que pode constituir um potencial problema de segurança alimentar.

Um dos objetivos deste trabalho é perceber até que ponto o arroz é um bom acumulador de As e, de que modo influencia a entrada deste elemento químico na cadeia alimentar humana. Foram consideradas populações mais sensíveis, como o caso dos bebés, uma vez que os seus primeiros alimentos são produtos derivados de arroz, e os doentes celíacos, cujo fornecimento de glúcidos na dieta está praticamente limitado ao arroz e seus derivados.

2. INTRODUÇÃO

2.1 O Arsénio

Os metais pesados são elementos químicos com densidade pelo menos 5 vezes superior à da água e número atómico superior a 20 (Alloway, 2013). São geralmente tóxicos em concentrações elevadas e tendem a acumular-se nos organismos vivos ao longo do tempo constituindo um potencial risco ambiental e para a saúde humana. O cádmio (Cd), o chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg) são exemplos de metais pesados, que surgem naturalmente como constituintes de rochas, no solo, água e seres vivos (Pinto, 2011).

O As não é considerado um metal pesado, mas também exhibe características de toxicidade para o ambiente e seres vivos (Rahman & Hasegawa, 2011). Estes elementos químicos são considerados não essenciais e poluentes quando se encontram em quantidade superior ao normal ou fora do seu local habitual, trazendo consequências negativas para os organismos mesmo em baixas concentrações (Varenes, 2003).

O As é o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre e encontra-se naturalmente distribuído na Natureza. É um elemento que revela propriedades metálicas e não metálicas, pelo que é descrito quimicamente como um metalóide. A forma estável mais vulgar tem uma densidade de $5,93 \text{ g cm}^{-3}$, o seu número atómico é 33 e a sua massa molar é de $74,922 \text{ g mol}^{-1}$ (ATSDR, 2007; Bundschuh, *et al.*, 2008). Pertence ao grupo 15 da Tabela Periódica - Azoto (N), Fósforo (P), Arsénio (As), Antimónio (Sb) e Bismuto (Bi), apresentando algumas semelhanças com o N e P; nomeadamente na formação de ligações químicas com outros elementos como o carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O) (Sarkar, 2002).

O As elementar é raro, na Natureza encontra-se combinado com O, cloro (Cl) e enxofre (S) - forma inorgânica (AsI); ou ligado ao C e H - forma orgânica (ATSDR, 2007). Tanto as formas orgânicas como inorgânicas existem naturalmente. As espécies inorgânicas mais importantes são o arsenato (AsV) e o arsenito (AsIII). O ácido monometilarsónico (MMA) e o ácido dimetilarsínico (DMA) são as espécies orgânicas mais comuns (Heikens, 2006). Na **Figura 1** encontram-se as espécies químicas de As mais abundantes na Natureza e suas formas químicas.

Espécies Inorgânicas	Espécies Orgânicas	
Arsenito AsIII	Ácido Monometilarsônico MMA	Ácido Dimetilarsínico DMA
$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{As}-\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Arsenato AsV	Óxido Trimetilarsina TMAO	Arsenobeteína AsB
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{As}-\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Figura 1 – Estruturas químicas de algumas espécies mais comuns de As na natureza.

Fonte: adaptado de Abonga, 2012

O As pode existir em quatro estados de oxidação: -3, 0, +3 e +5. Sob condições redutoras a forma trivalente AsIII é a forma dominante; o AsV é a forma mais estável no ambiente (WHO, 2000, 2001).

A especiação do As é uma característica que influencia a sua mobilidade no ambiente, a sua solubilidade e a sua toxicidade para os seres vivos. A especiação é a distribuição de determinado elemento num sistema considerando as suas diferentes espécies químicas (Abonga, 2012). Já foram identificadas cerca de 50 espécies de As, a maior parte em ambiente aquático principalmente na forma orgânica, como a AsB (Fancesconi & Kuehnelt, 2004).

A toxicidade do As depende do seu estado de oxidação, das condições de oxidação-redução e pH do meio, e especiação (Mandal & Suzuki, 2002). No caso de metais pesados, como o Hg e Pb, as espécies orgânicas são conhecidas por serem mais tóxicas que as inorgânicas. No entanto, os compostos de As são uma exceção e, geralmente, as espécies inorgânicas de As têm uma toxicidade superior às orgânicas (Sarkar, 2002). O AsIII é mais tóxico que o AsV e a espécie com maior toxicidade é a arsina (AsH₃), embora, por ser volátil, não está associada a níveis de concentração elevados de contaminações ambientais (ATSDR, 2007).

2.1.1 Distribuição e origem de arsênio

O As é um elemento ubíquo e a sua abundância na crosta terrestre é de 1,5 - 3 mg kg⁻¹ (Mandal & Suzuki, 2002; Finnegan & Chen, 2012)

O As encontra-se distribuído em solos e águas subterrâneas por todo o mundo. As ocorrências mais importantes são observadas na Argentina, Bangladesh, Chile, China, Hungria, Índia (Bengala Ocidental), México, Roménia, Tailândia, Vietname e algumas regiões dos Estados Unidos da América, tal como se pode observar na **Figura 2** (Semedley & Kinniburgh, 2002)



Figura 2 – Distribuição mundial de arsênio

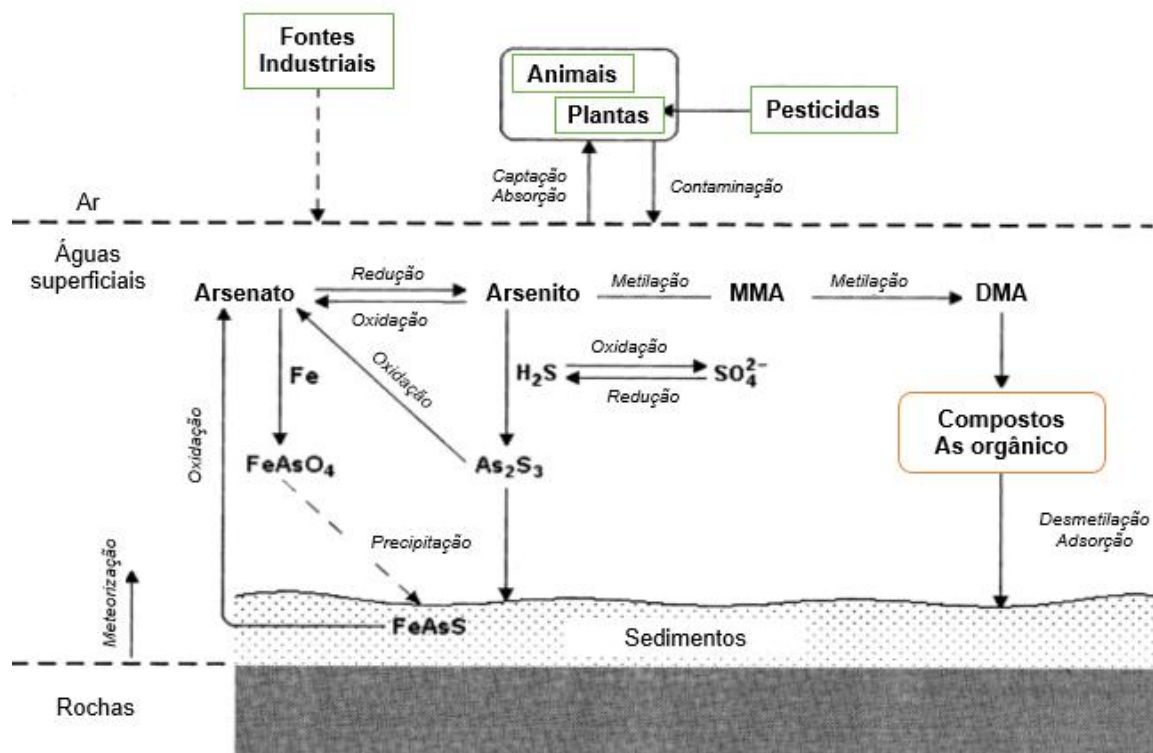
Fonte: adaptado de Abonga, 2012

O As provém de fontes naturais e antropogénicas. Embora se encontre naturalmente distribuído na crosta terrestre, nos solos, sedimentos, água, ar e seres vivos, as fontes antropogénicas excedem as naturais numa proporção de 3:1 (Mandal & Suzuki, 2002). Após contaminação ambiental por As, este não é destruído pela Natureza, apenas poderá modificar a sua forma química e os elementos de ligação através de reações com o O₂ ou outras moléculas presentes no solo, água ou ar, ou mediante a ação de microrganismos (ATSDR, 2007).

As principais fontes antropogénicas de As são a atividade mineira (Bundschuh, *et al.*, 2012) e a indústria metalúrgica, através da fundição de metais não-ferrosos. No entanto, a queima de combustíveis fósseis é também uma importante fonte de contaminação atmosférica. O As

é ainda usado em conservantes de madeira e pesticidas. Os pesticidas à base de compostos de As foram os primeiros a ser usados na agricultura, sendo responsáveis pela contaminação continuada de muitos solos agrícolas (Sarkar, 2002; Mandal & Suzuki, 2002; Esteves, 2009)

Naturalmente o As existe como constituinte de mais de 200 minerais, sendo a forma mais abundante a arsenopirite (FeAsS) (Mandal & Suzuki, 2002). A principal fonte natural de As é a meteorização de rochas que contêm este elemento, processo que desencadeia o ciclo geoquímico do As, representado na **Figura 3** (WHO, 2001; Sarkar, 2002).



Legenda:

MMA – Ácido monometilarsônico
 DMA – Ácido dimetilarsínico
 Fe – Ferro
 FeAsO₄ - Arsenopirite

H₂S – Ácido sulfídrico
 SO₄²⁻ - Ião sulfato
 As₂S₃ – Trióxido de arsênio

Figura 3 – Ciclo Geoquímico do arsênio.

Fonte: adaptado de Roy & Saha, 2002

Os fatores que controlam a reação de meteorização são: a presença de água e a sua composição, o pH, a temperatura, a reatividade das espécies com o dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O), a solubilidade e características redox das espécies. A reação de libertação do As da arsenopirite envolve reações de hidrólise e oxidação:



A arsenopirite na presença de O_2 e H_2O provoca a oxidação de S^{2-} para SO_4^{2-} e AsIII para AsV, com redução de O_2 . Após a libertação do mineral, o As torna-se biodisponível e pode ser mobilizado por diferentes processos físicos e/ou químicos (Sarkar, 2002).

A toxicidade do As para os seres vivos vai depender da sua biodisponibilidade, ou seja, da presença de formas químicas suscetíveis de serem utilizadas pelas plantas ou por outros organismos do solo. A fração de uma substância química que pode ser absorvida por um organismo vivo chama-se fração biodisponível (Reichman, 2002). Apesar dos metais se poderem encontrar em diferentes formas químicas, tais como, formas precipitadas, adsorvidas, formas existentes na matriz dos minerais do solo, a fração que as plantas conseguem absorver diretamente é a forma solúvel na solução do solo (Sarkar, 2002).

Além deste processo, alguns investigadores sugerem que a libertação do As no ambiente é mediada por microrganismos que reduzem o ferro (Fe) presente nos sedimentos. Minerais que contêm As e Fe na sua composição, atuam como dadores de eletrões que favorecem o crescimento microbiano. Como resultado da sua ação, o As dissolve-se, tornando-se biodisponível (Berg, 2012).

O comportamento químico do As no ambiente é bastante complexo, envolvendo reações de oxidação, redução, adsorção, precipitação, metilação e volatilização (Roy & Saha, 2002).

2.1.2 Formas e teores de arsénio no ambiente

O As no ambiente pode existir tanto na forma orgânica, como inorgânica, conforme referido anteriormente. A especiação do As é um processo complexo: as formas inorgânicas de As, AsIII e AsV em solução, são biodisponíveis para as plantas, mas podem ser convertidas em formas orgânicas por microrganismos com capacidade de metilação e desmetilação responsáveis pela interconversão entre as espécies de As (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

Os fatores abióticos mais importantes que controlam a especiação do As e, consequentemente a sua mobilidade, são o pH e o potencial redox (Smedley & Kinniburgh, 2002; Bundschuh *et al.*, 2008).

Na **Figura 4** apresenta-se um diagrama que relaciona o pH com o potencial redox do As em solução. Em águas naturais o As encontra-se em solução sob a forma iónica. Os estados de oxidação predominantes são AsIII e AsV e, em menor frequência As(0) e As(-III). O AsV aparece na forma de ácido arsénico (H_3AsO_4) e os seus produtos de dissociação

correspondentes: H_2AsO_4^- (ião di-hidrogénio arsenato), HAsO_4^{2-} (ião hidrogénio arsenato) e AsO_4^{3-} (ião arsenato). O AsIII surge como ácido arsenoso (H_3AsO_3) e, dá origem às espécies químicas H_2AsO_3^- (ião di-hidrogénio arsenito), HAsO_3^{2-} (ião hidrogénio arsenito) e AsO_3^{3-} (ião arsenito).

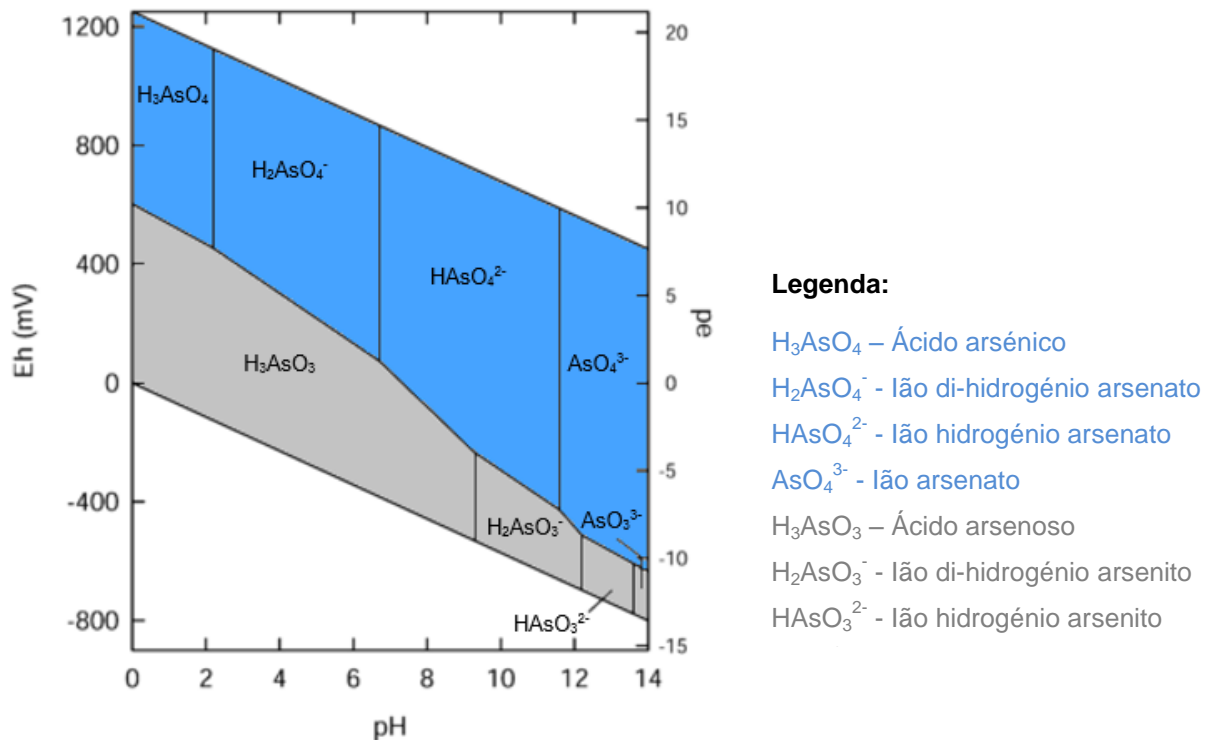


Figura 4 - Diagrama Eh/pH de espécies aquosas de As no sistema As-O₂-H₂O. Os produtos de dissociação do AsV estão a azul e os da espécie AsIII estão a cinzento.

Fonte: adaptado de Smedley & Kinniburgh, 2002

O As é um elemento particular pela sua capacidade de mobilidade em valores de pH característicos de águas subterrâneas (pH 6,5 – 8,5). Tanto o AsV como o AsIII são móveis no meio, no entanto o AsIII é a forma de maior mobilidade e de maior toxicidade (Smedley & Kinniburgh, 2002; Bundschuh *et al.*, 2008).

Verifica-se que sob condições oxidantes (aeróbias), a espécie AsV predomina, enquanto o AsIII é mais frequente em condições redutoras (anaeróbias) (Heikens, 2006). A especiação do As determina a sua reatividade com outros elementos, o transporte no ambiente e a sua bioatividade (Zhang *et al.*, 2002; Abonga, 2012).

O As dissolvido na água pode sofrer bioacumulação nas algas, peixe e marisco, principalmente, sob a forma orgânica. A biota aquática está associada às espécies orgânicas de As, arsenobetaina (AsB), MMA e DMA, pois o As na forma inorgânica entra na cadeia alimentar de espécies aquáticas e é transformado em espécies orgânicas menos

tóxicas, através de processos de biometilação. Por esta razão as espécies marinhas são as principais fontes de As orgânico (Roy & Saha, 2002; Bundshuh *et al.*, 2012).

Como já foi referido, o As é um elemento não essencial e tóxico, mesmo em pequenas quantidades, para os animais e plantas, pelo que é necessário regular o valor de contaminação ambiental deste metalóide. A legislação portuguesa prevê limites para o teor de As em águas para consumo humano e águas de rega (**Tabela 1**). No entanto, ainda não estão definidos limites para os solos e produtos alimentares.

Devido à falta de legislação portuguesa sobre os limites de alguns elementos contaminantes no solo, entre eles o As, são utilizados em Portugal os níveis adotados por países como a Holanda e o Canadá – neste último o valor máximo admissível (VMA) de As no solo é de 17 mg kg⁻¹ (Esteves, 2009).

Tabela 1 – Teores máximos de As de acordo com a legislação em vigor.

	Teor de Arsénio	Limites	Fonte
Água para consumo humano	10 µg L ⁻¹	VMA	OMS, 1993 Council Directive 98/83/EC Decreto-Lei nº 306/2007
Águas de rega	10 mg L ^{-1*}	VMA	Decreto-Lei nº 236/98
Solos	17 mg kg ⁻¹	LM	Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999
Arroz Cru	0,3 mg kg ⁻¹	LM	CX/CF 12/6/8

Legenda:

VMA - Valor Máximo Admissível

LM - Limite Máximo

*Toxicidade variável consoante as culturas: 0,05 mg L⁻¹ para o arroz.

No âmbito da Diretiva 93/5/CEE foi realizada a tarefa SCOOP 3.2.11 “Avaliação da exposição alimentar ao As, Cd, Pb e Hg da população dos Estados-Membros da UE” onde não foi definido Limite Máximo (LM) de As nos produtos alimentares na União Europeia (SCOOP, 2004). Recentemente foi proposto pela FAO/WHO que o LM de Asi ou total fosse estabelecido em 0,3 mg kg⁻¹ para o arroz cru (FAO/WHO, 2012, 2012b). No entanto, ainda não existe LM definido para o As no arroz na Europa ou nos Estados Unido. Na Ásia, a China definiu o LM de contaminação de As no arroz em 0,15 mg kg⁻¹ (Zhu *et al.*, 2008).

2.2 O Arroz

O arroz é um alimento de primeira necessidade para mais de metade da população mundial. São produzidas anualmente mais de 700 milhões de toneladas de arroz (Smith *et al.*, 2009; FAO, 2013). Países como a China, Índia, Indonésia, Vietname, Tailândia e Myanmar são responsáveis pela produção de mais de 90 % de todo o arroz mundial (**Figura 5**) (Smith *et al.*, 2009). Em Portugal, o consumo de arroz é de 16,1 kg/capita/ano, o maior da Europa (INE, 2012).

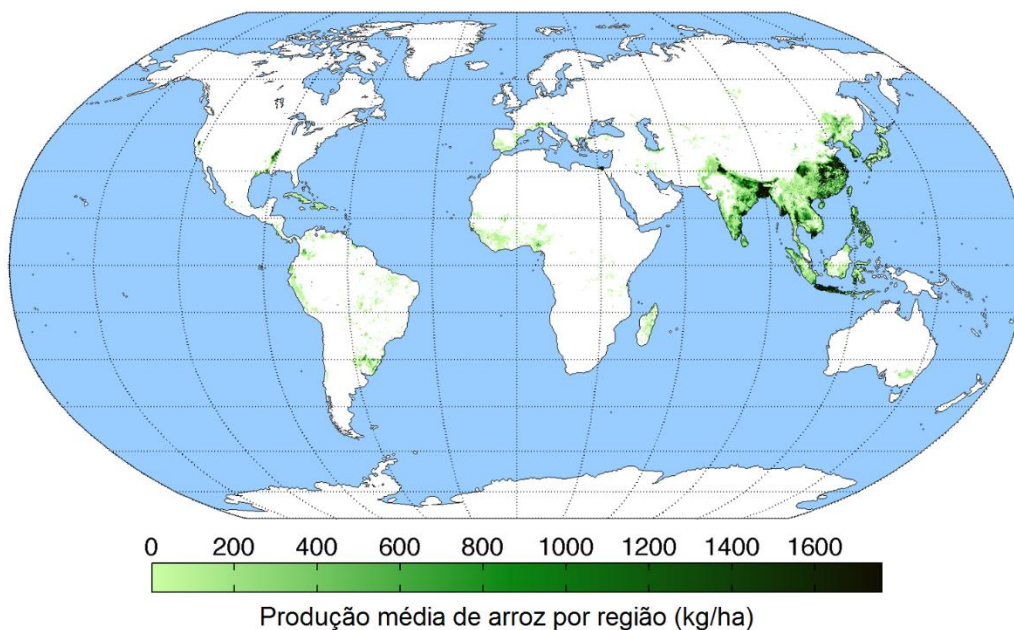


Figura 5 – Produção mundial de arroz.

Fonte: adaptado de Monfreda *et al.*, 2008

A planta de arroz (*Oriza sativa L.*) é uma planta herbácea incluída na classe das monocotiledóneas, pertencente à família das gramíneas (*Poaceae*) e ao género *Oryza*, originária da Ásia e cultivada em todo o mundo (Chang & Bardenas, 1965)

O sistema radicular da planta de arroz é constituído por raízes finas, longas e fibrosas que permitem a sua rápida fixação ao solo. Das raízes surgem numerosas hastes formadas por uma série de nós e entrenós (Chang & Bardenas, 1965). A planta de arroz é caracterizada pelas folhas longas e finas, com múltiplas inflorescências na extremidade, a panícula. Cada panícula pode conter entre 70 a 300 sementes, logo uma planta pode produzir milhares de grãos. O grão de arroz é constituído por casca, farelo, grão e germen (Zhang, 2009) (**Figura 6**).

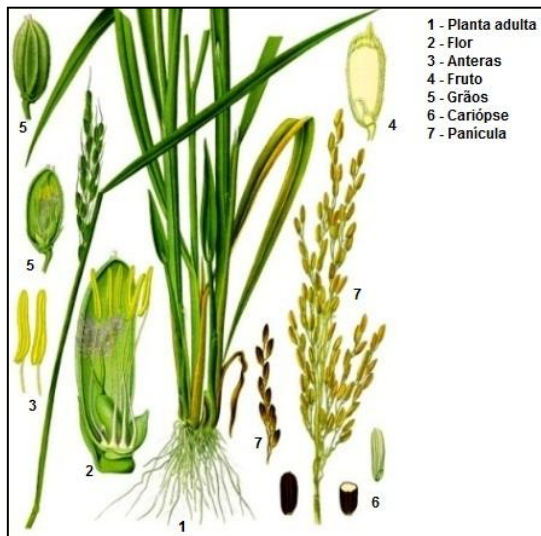


Figura 6 – Morfologia da planta de arroz.

Fonte: http://www.agrolink.com.br/culturas/arroz/arquivos/caracteristicas_arroz.jpg;

Trata-se de uma planta anual bem adaptada a zonas quentes e húmidas e ao ambiente aquático. O ciclo de desenvolvimento do arroz pode ser dividido em três fases principais: plântula, vegetativa e produtiva. A duração das fases depende da época de sementeira, região de cultivo e condições de fertilidade dos solos (Chang & Bardenas, 1965).

O arroz pode ser produzido em sequeiro ou em regadio. Em sistema inundado, o ciclo dura entre 100 e 140 dias e, em sequeiro varia entre 110 e 155 dias. Na cultura de regadio os arrozais encontram-se em terrenos alagados, sendo que este método de cultivo corresponde a 85 % da produção mundial de arroz. Os arrozais cultivados em regadio são normalmente semeados em canteiro e, posteriormente as plantas jovens são transplantadas para terrenos alagados. A duração da planta de arroz varia dos 3 aos 6 meses, dependendo da variedade e fertilidade do solo (Zhang, 2009). Em regiões de elevada humidade ou em solos de elevada fertilidade, pode produzir-se arroz em sequeiro, no entanto é um método de cultivo menos produtivo porque a captação de nutrientes pela planta é menos eficiente.

Após a colheita e secagem, os grãos de arroz seguem para a moenda, cujo objetivo é remover a casca e o farelo originando um grão branco e inteiro. Dependendo do grau de moenda do arroz pode-se obter arroz *paddy* (com casca), arroz integral e arroz branqueado (**Figura 7**). O arroz *paddy* não é sujeito a nenhum processo de moenda. No arroz integral a casca é removida, mas o farelo e o gérmen mantêm-se intactos. O arroz branco é sujeito à remoção da casca e do farelo.



Arroz Paddy



Arroz Integral



Arroz Branco

Figura 7 – Variedades de arroz, consoante o tipo de moenda.

Fonte: adaptado de Zhang, 2009

O arroz é um alimento muito valorizado pelo seu valor nutricional e o seu consumo fornece 20 % da energia nutricional mundial (FAO, 2004). O arroz é um cereal rico em glúcidos complexos e uma fonte de proteínas, fibra, lípidos, vitaminas, minerais e antioxidantes (**Tabela 2**) (Zhang, 2009).

Tabela 2 – Composição nutricional de arroz branco cru, por 100 g de parte edível.

Energia		352 kcal
		1475 kJ
Macronutrientes (g)	Água	13,9
	Proteína	6,7
	Lípidos Totais	0,4
	Glúcidos Totais	78,1
	Fibra alimentar	2,1
Vitaminas (mg)	α – tocoferol	0,10
	Tiamina	0,060
	Riboflavina	0,030
	Niacina	2,0
	Triptofano	1,4
	Vitamina B6	0,29
Minerais (mg)	Sódio (Na)	6,0
	Potássio (K)	94
	Cálcio (Ca)	13
	Fósforo (P)	87
	Magnésio (Mg)	32
	Ferro (Fe)	0,6
	Zinco (Zn)	1,3

Fonte: adaptado de INSA, 2013

Diferentes variedades de arroz têm valores nutricionais diferentes, sendo que o arroz integral tem um valor nutricional mais elevado que o arroz branco. Existem mais de 4000 variedades de arroz mas, apenas 100 são cultivadas mundialmente. Dentro das variedades de arroz existe a *Japonica* (carolino), *Indica* (agulha), *Basmati*, *Thai Jasmine*, *Arborio* (arroz para *risotto*), que foram estudadas neste trabalho (Zhang, 2009).

Em Portugal são produzidas as variedades *Japonica* e *Indica*. A variedade *Japonica*, associada ao arroz carolino ocupa uma área de cultivo de 83%, contra os 17% da variedade *Indica*, associada ao arroz agulha (MADRP, 2007).

Nos últimos anos tem-se verificado uma alteração nos padrões de consumo do arroz em Portugal que resultaram na transferência dos hábitos de consumo de arroz carolino para arroz agulha. Dados recentes mostram que a procura de outras variedades de arroz como o arroz vaporizado e o arroz *Basmati*, têm vindo a crescer ainda que de forma reduzida, representando 10% do mercado (MADRP, 2007; Dias & Rocha, 2012).

2.2.1 O arsénio no arroz

Os principais fatores que controlam a acumulação de As nas plantas são a sua elevada concentração presente no solo e a sua biodisponibilidade. A captação de As depende da especiação, composição e tipo de solo, práticas de irrigação dos terrenos, quantidade de As presente nas águas de rega e espécie da planta (Bundschuh *et al.*, 2012).

Como foi referido anteriormente, o As é um elemento não essencial e usualmente tóxico para as plantas. Caso haja contaminação do solo ou da água de irrigação, as raízes são a primeira zona da planta a contactar com este metalóide, o que provoca a inibição da extensão e proliferação das raízes. Após translocação do As das raízes para a parte aérea da planta, este interfere com o crescimento, dificultando a acumulação de biomassa e pode comprometer a capacidade reprodutiva da planta (Abedin & Meharg, 2002; Finnegan & Chen, 2012).

A interação química e biológica da rizosfera com a planta de arroz também deve ser considerada, uma vez que, influencia a biodisponibilidade de As e a sua captação. Quando os terrenos alagados do arrozal são ricos em Fe, este é oxidado em contacto com o O₂ e precipita sob a forma de hidróxido de ferro (Fe(OH)₂), levando à formação de placas de Fe nas raízes das plantas (Rahman & Hasegawa, 2011). Estudos mostram que as placas de Fe capturam o As, pois este tende a ser adsorvido nos óxidos de Fe formados, o que limita a sua entrada na planta. Assim, para concentrações de óxidos de ferro mais elevadas a fração

disponível de As no solo será menor (Chen *et al.*, 2005; Garnier *et al.*, 2010; Rahman & Hasegawa, 2011).

As condições de cultivo do arroz favorecem a captação de As, uma vez que este é produzido em condições de alagamento quase permanentes, ou seja, em meio anaeróbio. Em anaerobiose o As existe principalmente dissolvido sob a forma de AsIII, a sua forma mais tóxica e com maior biodisponibilidade para a planta de arroz (Williams *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Rahman & Hasegawa, 2011; Finnegan & Chen, 2012).

As espécies inorgânicas de As são facilmente absorvidas pelas raízes e, uma vez dentro das células ambas interferem com o metabolismo das plantas através de mecanismos distintos (Zhao, *et al.*, 2008; Finnegan & Chen, 2012). Na **Figura 8**, encontra-se representado o mecanismo de transporte de As nas plantas.

Legenda:

AsV - arsenato

AsIII – arsenito

Pi – Fosfato inorgânico

NIPs – *nodulin-26-like*

intrinsic protein

AR – Arsenato redutase

GSH – Glutathiona

PCs – Fitoquelatinas

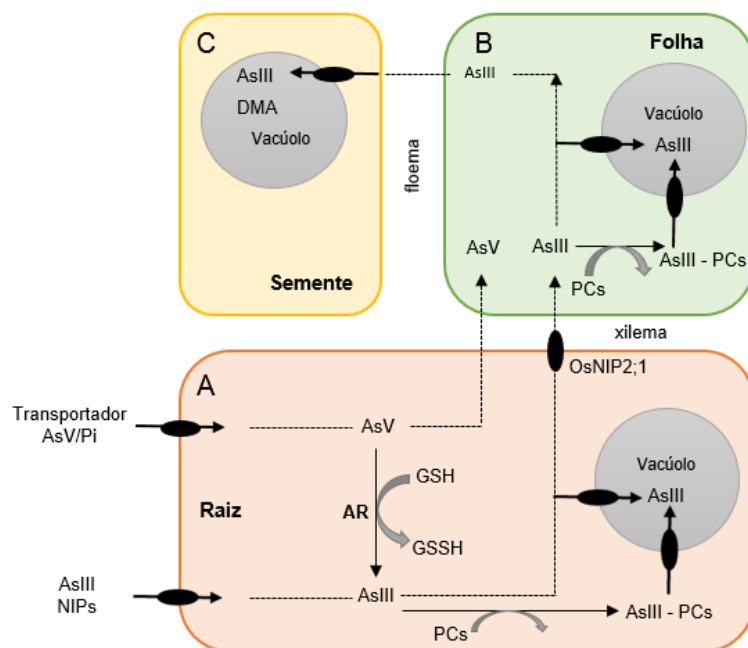


Figura 8 - Mecanismo de transporte do As nas plantas.

Fonte: adaptado de Ali, 2012

Ao nível da raiz (A), as plantas captam o AsV que é um análogo do fosfato inorgânico (Pi), através de proteínas transportadoras de fosfato, contribuindo para a desregulação do fornecimento de fosfato para a planta (Finnegan & Chen, 2012). O transporte de AsIII para dentro da célula é feito através de aquagliceroporinas do tipo NIP (*nodulin26-like-intrinsic proteins*).

Aquagliceroporinas são canais específicos de transporte de H₂O, glicerol e outras moléculas sem carga elétrica de pequenas dimensões. A passagem de AsIII por estes canais é possível, pois em solução, o AsIII surge na forma neutra - H₃AsO₃, que é uma molécula inorgânica semelhante ao glicerol (Bhattacharjee *et al.*, 2008).

Dentro da célula o AsV é reduzido a AsIII através da arsenato redutase (AR), usando a glutationa (GSH) como redutor. O AsIII consegue formar complexos com grupos tiol da GSH e fitoquelatinas (PCs) para reduzir a sua fitotoxicidade (Ali, 2012). As PCs são péptidos que contêm cisteína e, são formadas pelas plantas para ajudar a atenuar os efeitos tóxicos de quantidades essenciais e não essenciais de metais pesados (Berg, 2012). Os complexos de AsIII e as AsV são sequestrados no vacúolo por transportadores diferentes (Ali, 2012).

Quando a capacidade de armazenamento de As no sistema radicular da planta for excedida, este é translocado para a parte aérea da planta. O AsIII passa para o xilema através do transportador de silício (OsNIP2;1), que tem sido implicado como o maior responsável pela entrada desta forma inorgânica de As nas células (Ma *et al.*, 2008; Bhattacharjee *et al.*, 2008; Finnegan & Chen, 2012; Ali, 2012).

O silício (Si) é benéfico para as plantas aumentando a sua resistência a doenças, pragas e outros tipos de stresse (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Vários autores referem que o AsIII partilha os transportadores de Si, com quem apresenta duas semelhanças importantes: ambos apresentam um pK_a elevado, tem forma tetraédrica e tamanho semelhante (Ma *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009). A via de absorção do Si no arroz apresenta elevada eficiência, permitindo a passagem inadvertida de AsIII, o que explica a razão pela qual o arroz é um bom acumulador de As (Zhao *et al.*, 2008).

Através do xilema, as espécies químicas de As chegam às folhas da planta (B) onde são submetidas a mecanismos de redução e sequestração semelhantes aos referidos anteriormente. O As é conduzido pelo floema até às sementes onde é armazenado nos vacúolos e outros tecidos das partes edíveis do grão (C). O armazenamento de As no grão é principalmente sob a forma de AsIII e DMA (Smith *et al.*, 2008; Ali, 2012).

A acumulação de As nos tecidos da planta de arroz aumenta pela ordem: grão < caule e folhas << raiz (Abedin *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008; Bhattacharya *et al.*, 2010).

Como já foi referido, a toxicidade do As depende não só da sua concentração, mas também da sua especiação (Rahman & Hasegawa, 2011; Abonga, 2012). Estudos de especiação na planta de arroz mostram que a raiz, os caules e as folhas do arroz contém maioritariamente

Asi, AsIII e AsV, enquanto o grão de arroz contém predominantemente a espécie orgânica DMA e AsIII, não havendo registros de AsV no grão. Comparando com o Asi, as espécies metiladas são captadas pelas raízes do arroz com menor eficiência, mas são transportadas para o grão com maior eficácia (Smith *et al.*, 2008; Carey *et al.*, 2010). As espécies orgânicas MMA e DMA existem no solo e, podem também ser captadas pelas raízes das plantas em menor quantidade (Ali, 2012).

Embora a parte comestível do arroz seja o grão, os caules e folhas da planta são normalmente secos e, a palha formada destina-se a alimentação de gado, o que poderá levar à biotransferência de As para a cadeia alimentar, criando-se outra via de exposição humana a este poluente (Smith *et al.*, 2008; Bundschuh *et al.*, 2012).

Relativamente ao grão, a parte edível do arroz, o As distribui-se de forma desigual nas diferentes estruturas morfológicas. Rahman *et al.* (2007) mostraram que a casca é a zona do grão onde se acumula maior quantidade de As, seguida do farelo. Logo, o tipo de processamento a que é sujeito o arroz, neste caso a moenda, reduz significativamente a concentração de As no grão.

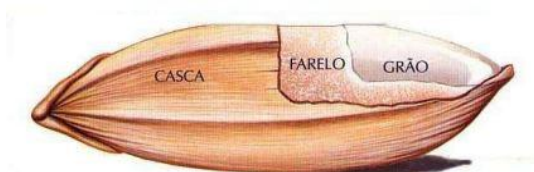


Figura 9 – Estrutura de um grão de arroz.

Fonte: http://www.ufrgs.br/alimentus/terradearroz/imagens/grao_divisao01.jpg

Desta forma, a concentração de As no grão varia na ordem, casca > farelo > arroz integral (*brown rice*) > arroz branqueado (*polished rice*) (Rahman *et al.*, 2007; Rahman & Hasegawa, 2011; Carey *et al.*, 2012).

Relativamente à especiação de As no grão de arroz, estudos mostram que 50 % do As presente é inorgânico, podendo variar de 10 a 90 %, sendo que o restante são as espécies orgânicas DMA e MMA (Rahman & Hasegawa, 2011).

As variações na especiação de As no arroz estão associadas a diferentes áreas geográficas, fontes de contaminação e capacidade de captação da planta. Na Ásia onde as águas subterrâneas apresentam uma elevada concentração de Asi e são utilizadas para irrigação dos terrenos, esta é a principal fonte de As no arroz. Na América do Norte a

principal fonte é o uso de pesticidas com As na sua composição (Zavala *et al.*, 2008; Zavala & Duxbury, 2008; Rahman & Hasegawa, 2011). Além disso a metilação microbiana das espécies inorgânicas de As presentes na rizosfera pode contribuir para a presença de compostos orgânicos no arroz (Rahman & Hasegawa, 2011).

Ainda não se encontra bem compreendido o mecanismo de especiação do As no arroz e por que razão o conteúdo em As orgânico aumenta com o aumento do As total no grão de arroz. De qualquer forma acaba por ser benéfico para a população, pois as espécies orgânicas apresentam menor toxicidade (Rahman & Hasegawa, 2011).

2.2.2 - Efeito da cozedura no teor de arsênio

As concentrações de As no arroz cozido são afetadas pelos métodos de cozedura, quando o arroz e a água de cozedura estão contaminados (Rahman *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2006; Rahman & Hasegawa, 2011).

Em áreas contaminadas com As, como o caso do Bangladesh, o arroz após cozedura apresenta um maior teor de As, quando comparado com o mesmo arroz cru. O As adicional provém da água, também contaminada, usada no processo de cozedura (Rahman *et al.*, 2006; Rahman e Hasegawa, 2011; Bundschuh *et al.*, 2012).

Além da concentração de As na água, também os métodos de cozedura influenciam a retenção de As no grão (Rahman *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2006; Rahman e Hasegawa, 2011). De acordo com Rahman *et al.* (2006) e Raab *et al.* (2009) quando o arroz é cozido com excesso de água e a água da cozedura é desprezada, a concentração de As no arroz cozido diminui. Quando o arroz é cozido em pouca quantidade de água, havendo total absorção da água pelo arroz, estudos indicam que o arroz cozido apresenta um teor de As superior ao arroz cru, independentemente de a água estar contaminada ou não (Rahman *et al.*, 2006). No entanto outros estudos contrariam essa informação reportando que não existe alteração no teor de As no arroz cozido (Raab *et al.*, 2009).

O trabalho desenvolvido por Sengupta *et al.* (2006) demonstrou que a lavagem do arroz antes da cozedura e a não utilização da água em excesso após a confeção, contribui para a diminuição da contaminação no arroz cozido.

As concentrações de As no arroz seguem a seguinte tendência: arroz cozido (em pouca água) > goma do arroz > arroz cru > arroz cozido (em excesso de água) (Rahman *et al.*, 2006).

A especiação de As no arroz cozido depende da especiação no arroz cru ou da água de cozedura, caso esteja contaminada, uma vez que não ocorrem alterações na especiação química durante o processo de cozedura (Devesa *et al.*, 2008; Rahman e Hasegawa, 2011). De acordo com vários estudos, as espécies inorgânicas são as mais frequentes no arroz cozinhado (Williams *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2006; Devesa *et al.*, 2008). A literatura refere que é necessário temperaturas de cozedura superiores a 150 °C para transformar as espécies de As, portanto a especiação de As associada à preparação de alimentos acontece, geralmente, quando a comida é assada, frita ou grelhada (Bunduschuh *et al.*, 2012).

De acordo com a OMS (1993), a MTDI (*Maximum Tolerable Daily Intake*, dose diária máxima tolerada) para AsIII é de 2 µg kg⁻¹ de peso vivo (Sengupta *et al.*, 2006). É necessário analisar a ingestão diária de As considerando o arroz cozido como uma via de exposição importante para os seres humanos (Rahman *et al.*, 2006; Devesa & Montoro, 2008), contribuindo para uma adequada avaliação de risco para o As.

2.2.3 O arsênio em alimentos derivados de arroz

A presença de As nos alimentos depende da origem geográfica, da cultura de arroz, práticas de produção e/ou protocolos de processamento (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012).

A contaminação por As em alimentos pode estar ainda associada à presença de aditivos alimentares (Jackson *et al.*, 2012; Carter & Carter, 2012). Existe um LM para adoçantes, corantes e aditivos alimentares fixado em 3 mg kg⁻¹ (COM 2008/60/EC, COM 2008/84/EC).

Sabe-se que o arroz e os produtos derivados de arroz contribuem para a exposição humana ao As, embora ainda haja pouca informação relativamente aos últimos (Jackson *et al.*, 2012). Dentro dos alimentos derivados de arroz, as farinhas para bebé ganham especial importância uma vez que têm uma elevada percentagem de arroz na sua composição. As crianças são mais suscetíveis à exposição de elementos potencialmente tóxicos, como o As, por serem consideradas um grupo de risco, estando mais vulneráveis devido à sua elevada capacidade intestinal de absorção (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012). Por ser insípido, com baixo potencial alergénico, valor nutricional e ausência de glúten, o arroz é a principal fonte de glúcidos em crianças com menos de um ano (Burló *et al.*, 2012).

A doença celíaca é uma doença do sistema digestivo que interfere com a absorção de nutrientes dos alimentos e cujo único tratamento é uma dieta livre de glúten - proteína presente no trigo, centeio e cevada (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012; NIDDK, 2012). O

arroz é um alimento seguro para os celíacos, adultos e crianças, sendo um cereal essencial na sua alimentação.

Alimentos derivados de arroz podem conter níveis elevados de As total e inorgânico como consequência da presença deste metalóide no arroz que é usado como matéria-prima para a produção desses produtos (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012). Este facto contribui para o aumento da ingestão diária desta substância tóxica pelas crianças e, principalmente, pelas crianças intolerantes ao glúten que consomem estes produtos em maiores quantidades, uma vez que têm uma menor variedade de produtos alimentares disponível que se adequa às suas necessidades (Burló *et al.*, 2012).

A análise de produtos direcionados para alimentação infantil, como cereais ou farinhas contendo arroz na sua composição, revelaram contaminação por As. Nos produtos sem glúten, onde a percentagem de arroz é mais elevada, o teor de As tem tendência a ser superior ao de produtos que contêm outros cereais (Burló *et al.*, 2012; Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012).

Burló *et al.*, (2012) referem que também estão presentes teores de As em alimentação infantil, por exemplo em purés, quando o arroz faz parte da sua formulação. O As consegue entrar na cadeia alimentar através de alimentos que tenham sido preparados com matérias-primas alimentares contaminadas, aumentando a taxa de exposição humana ao As..

Além de bolachas, farinhas láteas e cereais, este estudo também analisou bebida de arroz. A bebida de arroz surge como uma alternativa ao leite tradicional e direciona-se para o público vegan, vegetariano, dietas macrobióticas, pessoas intolerantes à lactose, entre outros. Esta bebida é preparada por liquefação do grão de arroz integral através da ação enzimática da alfaamilase e da glucosidase. As formulações comerciais são frequentemente fortificadas com minerais e vitaminas para colmatar as deficiências nutricionais desta bebida, comparando com o leite de origem animal. Embora o reduzido teor proteico e lipídico desta bebida não a torne uma opção adequada para a alimentação infantil, é importante perceber se o As presente no grão de arroz tem influência no teor de As de bebidas de arroz (Meharg *et al.*, 2008).

2.3 Toxicidade do arsênio

A contaminação ambiental por As coloca um sério risco para a saúde humana. O Homem pode ser exposto ao As através de várias vias de exposição, como a inalação, contacto dérmico e ingestão (ATSDR, 2007; Rahman *et al.*, 2008a; Rahman e Hasegawa, 2011).

Estudos recentes mostram que a maior fonte de exposição humana ao As é através da água de consumo contaminada. No entanto o As entra na cadeia alimentar humana através da água, plantações contaminadas, arroz, vegetais e peixe. A água e o arroz são atualmente, consideradas as maiores fontes de Asi para os humanos (Bhattacharya *et al.*, 2010; Rahman e Hasegawa, 2011; Finnegan e Chen, 2012).

A toxicidade do As está associada à dose de exposição, frequência, duração, idade, género e suscetibilidade individual, influenciada pelo património genético e fatores nutricionais (Faraj, 2011).

A absorção do Asi relaciona-se com a sua solubilidade. Nos humanos, mais de 90 % do Asi presente na água é absorvido e, aproximadamente 60-70 % do As ingerido nos alimentos também, o que demonstra a sua elevada disponibilidade (Abonga, 2012; Burló *et al.*, 2012).

A biodisponibilidade do As refere-se à fração de As que se dissolve no trato gastrointestinal e está disponível para ser absorvido no intestino delgado por forma a entrar na corrente sanguínea e conseqüentemente, causar danos ao organismo humano (Signes-Pastor *et al.*, 2012). A biodisponibilidade do As depende de vários fatores, tais como as propriedades da matriz onde se encontra, o seu estado de oxidação e as condições ambientais (WHO, 2001; Abonga, 2012).

As formas pentavalentes e trivalentes de As são rápida e largamente absorvidas no trato gastrointestinal. Uma vez absorvido, o As é transportado para o fígado onde é sujeito a reações de redução e metilação (WHO, 2001).

O AsV é reduzido a AsIII, que depois é sequencialmente metilado criando metabolitos como MMA e DMA. A reação de metilação realiza-se pela ação da S-adenosil metionina (SAM) como dador de grupos metil e na presença da GSH como co-fator. Após metilação do Asi, a excreção é feita através da urina, sob a forma de MMA e DMA (WHO, 2001; Hughes, 2002; Roy & Saha, 2002; Davis *et al.*, 2012).

Os efeitos adversos estão principalmente associados à exposição de Asi. No entanto quando a exposição a espécies orgânicas é elevada, observam-se os mesmos efeitos (NAS, 2001).

O As interfere com a ação enzimática, a transcrição de DNA e o metabolismo, manifestando sintomas dermatológicos, cardiovasculares, neurológicos e carcinogénicos nos humanos expostos a este metalóide (Sarkar, 2002).

A toxicidade aguda é caracterizada pela exposição de determinada substância a uma elevada concentração e num curto período de tempo. Os efeitos agudos do As fazem-se sentir a partir da ingestão de $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e, incluem vômitos, dor abdominal e diarreia, dormência das extremidades, câibras musculares e, em casos extremos, morte (NAS, 2001; JECFA, 2010)

A toxicidade crónica manifesta-se quando há contacto prolongado com determinada substância, embora em concentrações mais reduzidas. A ingestão crónica de As leva ao arsenicismo, condição que se caracteriza por alterações cutâneas e que pode resultar em hiperqueratose (nas palmas das mãos e pés) e hiperpigmentação da pele (Sarkar, 2002).

A exposição crónica ao As está associada à doença cardiovascular periférica, que pode conduzir a uma forma de gangrena que afeta as extremidades. Pelas marcas cutâneas que manifesta é chamada *blackfoot disease* (**Figura 10**) (Sarkar, 2002). Chen *et al.* (2013) encontraram uma associação positiva com a exposição ao As e o risco de doença cardiovascular.



Figura 10 – *Blackfoot disease*.

Fonte: http://d3cgb598vs7bfg.cloudfront.net/images/upload-flashcards/back/7/2/53827960_m.jpg

Outros sintomas são: a neuropatologia periférica, sintomas gastrointestinais, conjuntivite, diabetes, depressão na atividade da medula óssea, destruição de eritrócitos, anemia (WHO, 2001; JECFA, 2010).

O Asi é uma substância que demonstrou poder causar cancro em humanos através do consumo de água contaminada. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica o As e seus componentes como um carcinogéneo humano de Grupo 1, o que significa que existe evidência suficiente da sua carcinogenicidade em humanos. A exposição crónica ao As pode provocar cancro de pele, bexiga e pulmões e, existem evidências causais relacionadas com cancro de rim e fígado (EFSA, 2009; JECFA, 2010).

Na **Tabela 3** mostram-se os MRL (*Minimum Risk Levels*, níveis de risco mínimos) para a exposição crónica e aguda ao As. Estes valores correspondem à dose diária máxima que não trará qualquer risco (não carcinogénico) para a saúde humana (ATSDR, 2007).

Tabela 3 – MRL para espécies inorgânicas de As.

Via de exposição	Tipo de exposição	MRL
Oral	Aguda	0,005 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹
Oral	Crónica	0,0003 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹

Fonte: adaptado de ATSDR, 2013

Como já foi referido, a toxicidade do As varia com a sua especiação. Na **Tabela 4** estão representados os valores da DL₅₀ (Dose Letal 50%) por via oral para as espécies de As mais encontradas no arroz. A DL₅₀ é um parâmetro toxicológico que determina a dose necessária de determinada substância para eliminar 50 % da população de estudo (Zhang, 2009).

Tabela 4 – Variação da toxicidade do As com a especiação (em ratos).

Via de exposição	DL ₅₀ (ratos)			
	As III	As V	MMA	DMA
Oral	1,5 mg kg ⁻¹	5 mg kg ⁻¹	50 mg kg ⁻¹	600 mg kg ⁻¹

Fonte: adaptado de Zhang, 2009

De uma maneira geral, a avaliação de risco de exposição ao As é feita com base em adultos. No entanto determinados estudos relatam a suscetibilidade das crianças aos efeitos adversos do consumo de Asi. A exposição fetal ao Asi tem sido associada com o baixo peso no nascimento, aumento do risco de infeções e aumento da mortalidade infantil. Nas populações mais afetadas pela exposição excessiva ao As, as crianças têm revelado distúrbios neurocomportamentais (Davis *et al.*, 2012).

Além do consumo de água contaminada, estima-se que crianças, com menos de 3 anos, são as mais expostas ao Asi devido à sua alimentação à base de arroz e derivados (EFSA, 2009; JECFA, 2010; Davis *et al.*, 2012). No entanto, ainda existem poucos estudos toxicológicos que relacionem a ingestão de produtos contaminados com As com os efeitos adversos na saúde infantil.

Estima-se que um consumidor europeu esteja exposto a uma contaminação de As entre 0,13 – 0,56 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso vivo, por dia. Esta exposição em crianças com menos de 3 anos aumenta para 0,5 – 2,66 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso vivo, por dia. Os valores estimados de absorção em crianças indicam uma exposição 2-3 vezes superior à dos adultos (Calle *et al.*, 2011).

2.3.1 Caso do Bangladesh

A contaminação de água por As tem sido reportada em vários países do mundo, mas os incidentes que tiveram maior impacto na saúde humana foram reportados dos países do Sudeste Asiático, como o Bangladesh (Smith, Lingas & Rahman, 2000; WHO, 2001; Smith *et al.*, 2008).

O Bangladesh é um dos países mais pobres e povoados do mundo e enfrenta o maior envenenamento massivo da população na história da Humanidade. Devido à contaminação das fontes de abastecimento de água por Asi, estima-se que 35 a 77 milhões dos 125 milhões de habitantes do Bangladesh foram afetados por envenenamento acidental (UNICEF, 2008). Este envenenamento aconteceu pela ocorrência natural de Asi na região. Determinações analíticas realizadas aos depósitos de água mostraram níveis de As superiores a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, um valor claramente mais elevado do que 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ recomendado pela WHO (WHO, 2001; Smith, Lingas & Rahman, 2000; Faraj, 2011).

A população do Bangladesh exposta a estes níveis de As está em risco de desenvolver arsenicismo, cancro de pele, cancros internos, neuropatologias, doenças cardiovasculares, entre outras doenças. Estas doenças estão associadas a períodos de latência longos (> 10 anos), o que explica o facto de só recentemente terem sido observados, colocando em risco toda a população afetada. Espera-se que num futuro próximo haja um aumento de casos de doenças relacionadas com a exposição ao As (Smith, Lingas & Rahman, 2000).

As águas subterrâneas são a principal fonte de água de consumo no Bangladesh e ainda são usadas para o regadio das culturas. Estima-se que a cultura de arroz no Bangladesh ocupe 75 % da área total de cultivo e 83 % da área total irrigada (Abedin *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2008). O regadio das culturas de arroz com água contaminada por Asi eleva a magnitude deste problema, aumentando a via de exposição da população ao As.

Rahman *et al.* (2006) desenvolveram um estudo que analisava a ingestão diária de As na população do Bangladesh considerando o consumo de água e de arroz. Os valores mostraram que a ingestão de arroz, para além da água, também deve ser considerada para uma correta avaliação do risco à exposição de As pela população no Bangladesh (**Quadro 5**).

Tabela 5 – Dados referentes ao consumo diário de As da população do Bangladesh.

Fonte	Consumo Diário	Teor de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Ingestão de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Consumo de água	4.0 – 6.01 L	130	500 – 780
Arroz cru	400 – 650 g	570 – 690	250 – 360

Fonte: Adaptado de Rahman *et al.*, 2006

2.4 Determinação analítica do teor de arsênio em amostras vegetais

Como já foi referido, elevados níveis de poluição ambiental por As são potencialmente perigosos, uma vez que este tem a capacidade de contaminar as águas subterrâneas, os ambientes aquáticos, é captado pelas plantas afetando animais e plantas (Sarkar, 2002; Mandal & Suzuki *et al.*, 2003; ATSDR, 2007 Bhattacharya *et al.*, 2007).

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos instrumentos e técnicas analíticas para determinar as concentrações de espécies químicas do nosso ecossistema, atmosfera, solos, sedimentos e amostras biológicas. O uso de métodos analíticos simples e precisos para monitorizar a presença de As é essencial em estudos ambientais e toxicológicos (Güven & Akinci, 2011).

Os métodos mais utilizados para determinar metais pesados e metalóides, como o caso do As em amostras ambientais, são as técnicas espectrofotométricas, tais como espectrofotometria de absorção atômica (EAA) à chama, em câmara de grafite, EAA eletrotérmica e a espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ATSDR, 2007).

Antes de serem submetidas a análises espectrofotométricas, as amostras têm que ser digeridas. O princípio da digestão é a libertação das espécies inorgânicas da sua matriz sólida para uma solução ácida durante o processo de extração.

Os parâmetros críticos destes procedimentos são: a temperatura da digestão, o programa utilizado, o tempo e o poder químico dos reagentes usados. Para este processo de extração são utilizados determinados ácidos ou a combinação entre eles (HNO_3 , HNO_3 -HF, HNO_3 -HCl) como reagentes (Güven & Akinci, 2011).

Neste trabalho usaram-se duas técnicas diferentes de digestão ácida - bloco digestor de aquecimento e, assistida por microondas. No primeiro método, as amostras são submetidas a elevadas temperaturas à pressão atmosférica, enquanto na digestão em microondas as amostras são submetidas a elevadas temperaturas e pressão em recipientes fechados.

Segundo a literatura, a digestão assistida por microondas é a que apresenta mais vantagens, por ser um método rápido, confiável e com elevada taxa de recuperação. No entanto, os dados também mostram que, de uma maneira geral, não apresenta diferenças significativas acentuadas com alguns procedimentos convencionais de digestão ácida (Tuzen *et al.*, 2004; Güven & Akinci, 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produtos Alimentares

3.1.1 Recolha de amostras

As amostras alimentares usadas foram obtidas numa grande superfície comercial na região de Lisboa (Portugal) em 2013.

Foram usadas 21 amostras diferentes e agrupadas em quatro categorias de produtos:

- 10 amostras de arroz de 5 variedades diferentes (arroz carolino (*japonica*), agulha (*indica*), risotto (*arborio*), *basmati* e *thai jasmine*) de várias marcas comerciais (**Tabela 6**).
- 3 amostras de bolachas de diferentes marcas comerciais (2 amostras sem glúten) (**Tabela 7**).
- 4 amostras de farinhas de arroz, 1 farinha para culinária e 3 farinhas de alimentação infantil (sem glúten) (**Tabela 8**).
- 4 amostras de outros produtos derivados, incluindo palitos de arroz, folhas de arroz, cereais de pequeno-almoço e bebida de arroz (**Tabela 9**).

Pela informação contida nos rótulos dos produtos analisados é possível afirmar que as matérias-primas são provenientes de Portugal ou da União Europeia, exceto quando estão especificadas outras origens. No entanto, na maior parte das amostras não se encontra informação específica sobre o local de produção.

Tabela 6 – Identificação das amostras de arroz e informações contidas no rótulo dos produtos.











Cód. Amostra	Amostra	Produto	Origem	Observações
A1		Arroz Carolino	Ribatejo, Portugal	Branqueado
A2		Arroz Carolino	Portugal (Mondego) e outros países	Branqueado
A3		Arroz Agulha	Desconhecida	Branqueado
A4		Arroz Carolino	Desconhecida	Branqueado
A5		Arroz Carolino	Ribatejo, Portugal	Baby rice (aconselhado para latentes > 6 meses) Sem Glúten
A6		Arroz para risotto	Desconhecida	Variedade Arborio
A7		Arroz Basmati	Punjab, Índia	Branqueado
A8		Arroz Thai Jasmine	Desconhecida	Branqueado Extra longo
A9		Arroz Thai Jasmine	Tailândia	---
A10		Arroz para risotto	Itália	Variedade Arborio

Tabela 7 – Identificação das amostras de bolachas e informações contidas no rótulo dos produtos.




Cód. Amostra	Amostra	Produto	Origem	Composição	Obs.
B1		Bolacha de arroz pré-refeição	Desconhecida	Arroz integral (99,3%)	Sem glúten
B2		Bolachas de arroz biológicas com multicereais	Bélgica	Arroz integral (84,9%)	Agricultura Biológica
B3		Bolacha <i>Maria</i> integral	Desconhecida	Mistura de farinhas (incluindo de arroz)	Sem glúten

Tabela 8 - Identificação das amostras de farinhas e informações contidas no rótulo dos produtos.









Cód. Amostra	Amostra	Produto	Origem	Composição	Observações
F1		Farinha de arroz	Desconhecida	Arroz (100%)	Uso culinário
F2		Farinha de cereais	Desconhecida	Farinha de arroz (63%)	Sem glúten Bebês a partir dos 4 meses
F3		Cereais para crianças	Desconhecida	Farinha de cereais (arroz e arroz hidrolisado) (96,35%)	Sem glúten
F4		Farinha láctea	Portugal	Farinha de arroz (30%)	Sem glúten Bebês a partir dos 4 meses.

Tabela 9 - Identificação das amostras de outros produtos derivados de arroz e informações contidas no rótulo dos produtos.

Cód. Amostra	Amostra	Produto	Origem	Composição	Observações
O1		Palitos crocantes de arroz e milho	Desconhecida	Farinha de arroz (50%)	Sem glúten
O2		Folhas de arroz	Vietname	Farinha de arroz (55%)	---
O3		Cereais de pequeno-almoço	Península Ibérica	Arroz (99%)	---
O4		Bebida de arroz	União Europeia	Arroz (13%)	Agricultura Biológica

3.1.2 Efeito da cozedura no teor de arsénio

No ensaio inicial, as amostras foram analisadas cruas, não tendo sido sujeitas a qualquer tratamento térmico. No entanto para se estudar se a cozedura teria alguma influência no teor de As das amostras, 3 amostras de arroz (A2, A4 e A5) foram sujeitas a uma cozedura tradicional.

Pesaram-se cerca de 200 g de cada amostra para cozer. Cada amostra de arroz foi previamente lavada, passada por água várias vezes e, seguidamente colocada em água fervente com uma pitada de sal. A quantidade de água usada na cozedura foi calculada a partir da medida comumente usada, de uma parte de arroz para duas partes de água (1:2). As amostras foram cozidas até à absorção quase total da água (≈ 10 minutos), não sendo necessário escorrer o arroz.

Estas amostras cozidas foram posteriormente secas em estufa (Selecta, Serie 2000) a 70 °C até à estabilização do peso das amostras (≈ 15 dias).

3.2 Determinação do conteúdo mineral

Para se determinar o conteúdo mineral das amostras realizou-se uma digestão ácida, através de dois métodos e equipamentos diferentes, com o objetivo de avaliar a presença de As nas amostras e comparar os métodos.

3.2.1 Preparação das amostras

Todas as amostras, exceto as amostras de farinha (F1, F2, F3 e F4) e a bebida de arroz (O4) que foram analisadas na sua forma de comercialização, foram trituradas num robot de cozinha doméstico (Bimby, Vorwerk).

As amostras de arroz cozido (A2, A4 e A5) após terem sido secas na estufa a 70 °C e o seu peso ter estabilizado, foram também trituradas antes de serem submetidas ao processo de digestão ácida.

3.2.2 Digestão ácida em bloco de aquecimento

Neste ensaio realizou-se uma digestão ácida em bloco de aquecimento (DigiPrep MS, SCP Science) (**Figura 11**). Através deste método as amostras são submetidas a elevadas temperaturas, sem aumento de pressão, o que torna este método demorado (aproximadamente 120 minutos), comparando com a digestão em microondas. O objetivo da digestão ácida é digerir a matéria orgânica das amostras até à sua completa mineralização.

Após trituração das amostras pesou-se 0,5 g de amostra para um cilindro de plástico previamente tarado. No caso da amostra O4 (bebida de arroz) pipetou-se 1 mL e 3 mL de amostra para cilindros previamente tarados. Adicionou-se a cada tubo 6 mL de HNO₃ a 65 % e 1 mL de ácido clorídrico (HCl) a 37 %, tapando-os em seguida. Realizou-se em cada digestão um ensaio em branco (com 3 réplicas) contendo apenas HNO₃ e HCl. Foram feitos triplicados de todas as amostras.

Colocaram-se as amostras no tabuleiro do digestor, substituíram-se as tampas de rosca por tampas transparentes côncavas em todos os tubos cilíndricos, exceto num que continha um ensaio em branco, onde se ligou o sensor de temperatura.

Quando a digestão terminou, transferiu-se o conteúdo dos cilindros para balões volumétricos de 25 mL e perpez-se o volume com água desionizada na *hotte*.



Figura 11 –Bloco de aquecimento DigiPrep MS (SCP Science)

3.2.2.1 Ensaio em branco

Realizou-se ensaios em branco, seguindo a técnica descrita em 3.2.2.e, usando a mesma quantidade de todos os reagentes, à exceção da amostra.

3.2.2.2 Ensaio em meio fortificado

Ensaio de fortificação são uma técnica utilizada para avaliar a exatidão de um método. A exatidão de um método corresponde a uma medida de concordância entre o valor obtido por aplicação de um método e o valor teórico. Os ensaios em meio fortificado consistem em adicionar às amostras, uma quantidade conhecida do composto que se está a analisar, neste caso o As (IPAC, 2007).

Realizaram-se ensaios em meios fortificados com As com uma concentração conhecida de 1 mg L^{-1} . Para o primeiro ensaio seguiu-se o procedimento descrito em 3.2.2.1 (ensaio em branco) e adicionou-se 50 e 100 μL de As, na concentração referida. No segundo ensaio seguiu-se o procedimento descrito em 3.2.2. usando a mesma quantidade de reagentes e o mesmo peso de amostra, adicionando-se 50 ou 100 μL de As (1 mg L^{-1}).

3.2.2.3 Ensaio com material de referência certificado

Materiais de referência certificados (MRC) são substâncias usadas como controlo para verificar a qualidade e rastreabilidade dos procedimentos. Estes materiais são usados para calibração dos equipamentos, avaliação de procedimentos analíticos e controlo de qualidade (IPAC, 2007). Neste caso usou-se o MRC (WEPAL-IPE-556 Wheat (grain) / Triticum aestivum) para verificar se o processo de extração usado seria adequado para o As.

Para este ensaio pesou-se 0,30 g do material de referência e seguidamente procedeu-se como descrito em 3.2.2.

3.2.3 Digestão ácida em microondas (CEM MDS 2000)

Para determinação do conteúdo mineral de As nas amostras foi utilizado o método descrito por Singh *et al.* (2006). Após a trituração pesou-se cerca de 0,5 g de material para tubos de teflon, previamente tarados, e adicionou-se 5 mL de ácido nítrico (HNO_3) a 65% a cada tubo, fechando-os de imediato. Foram realizados triplicados de todas as amostras.

Os tubos com amostra e os que continham apenas ácido nítrico (ensaio em branco) foram colocados no microondas (CEM MDS 2000) (**Figura 12**) de modo a dar início à digestão ácida, durante a qual as amostras foram sujeitas a elevadas temperaturas e pressão para que toda a matéria orgânica fosse digerida, deixando apenas o conteúdo mineral das amostras. No processo de digestão ocorre a libertação de dióxido de carbono e vapor de água.

Quando a digestão ficou completa (cerca de 30 minutos), na *hotte*, o conteúdo dos tubos foi transferido para balões volumétricos de 25 mL e o volume certo com água desionizada.



Figura 12 –Microondas (CEM MDS 2000)

3.2.3.1 Ensaio em branco

Efetuuou-se um ensaio em branco, seguindo a técnica descrita em 3.2.3. usando a mesma quantidade de HNO_3 a 65 %, à exceção do produto submetido à análise.

3.2.3.2 Ensaio em meio fortificado

No primeiro ensaio seguiu-se o procedimento descrito em 3.2.3.1 (ensaio em branco) e adicionou-se 50 μL de As (1mg mL^{-1}). Para o segundo ensaio seguiu-se o procedimento descrito em 3.2.3. usando a mesma quantidade de reagente e o mesmo peso de amostra e, adicionou-se 50 μL de As (1mg mL^{-1}).

3.2.3.3 Ensaio com material de referência certificado

Para este ensaio pesou-se 0,40 g do material de referência (WEPAL - IPE-556 Wheat (grain)/Triticum aestivum), em vez das amostras e, seguiu-se o mesmo procedimento descrito em 3.2.3.

3.3 Espectrofotometria de absorção atômica (EAA)

A espectrofotometria de absorção atômica é o procedimento analítico mais utilizado para determinar a presença de As em materiais biológicos, incluindo amostras alimentares. Em EAA em câmara de grafite a amostra é aquecida até quebrar as suas ligações químicas e produzir átomos no estado fundamental. Os átomos absorvem a energia de radiação e passam ao estado excitado, o detector fotoelétrico mede a intensidade da radiação transmitida que varia em função do analito. Esta técnica foi escolhida por ter um limite de detecção baixo e permitir analisar quantidades de amostra muito reduzidas (Dabeka & Lacroix, 1987; ATSDR, 2007).

As determinações analíticas do teor total de As foram analisadas por EAA em câmara de grafite (Unicam Solar M). O limite de detecção do método foi calculado em $10\ \mu\text{g kg}^{-1}$, ou seja não há confiança em determinações analíticas de As abaixo desse valor.

3.3.1 Curva padrão de Arsênio

Para determinar o teor de As das amostras digeridas por EAA é necessário realizar padrões com concentração conhecida a partir de uma solução-mãe. A solução de padrão de As com concentração $1000\ \text{mg L}^{-1}$ serviu de referência para a preparação da curva de calibração.

Partiu-se de uma solução-mãe ($1000\ \text{mg L}^{-1}$) retirando-se 1 mL para um balão volumétrico de 100 mL e fez-se o volume com água desionizada obtendo-se uma solução de $10\ \text{mg L}^{-1}$. Dessa solução obteve-se posteriormente uma solução com uma concentração conhecida de $0,1\ \text{mg L}^{-1}$. Foi a partir desta que se obteve as concentrações finais dos padrões de As utilizadas e que se encontram descritas na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Concentrações finais dos padrões de As.

Padrões de As				
0,5 mL em 100 mL	1,0 mL em 100 mL	2,0 mL em 100 mL	4,0 mL em 100 mL	8,0 mL em 100 mL
0,5 μgL^{-1}	1,0 μgL^{-1}	2,0 μgL^{-1}	4,0 μgL^{-1}	8,0 μgL^{-1}

3.4 Tratamento Estatístico

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o programa estatístico “SPSS Statistics 20.0” (SPSS Inc.).

Aos resultados foi aplicada a análise de variância a um fator (ANOVA) para comparar os valores de concentração média obtidos para cada tipo de amostra. Para comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a um nível de confiança de 95 %.

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias da concentração de As nas amostras. Amostras com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ao nível de significância considerado.

As barras de erro nas colunas dos gráficos apresentados representam o desvio-padrão da média das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do teor mineral de As no arroz

Inúmeros estudos têm-se focado na determinação da concentração de As no grão de arroz cru em várias regiões do mundo, mostrando uma grande variação de valores (Bae *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2008; Meharg *et al.*, 2009; Rahman & Hasegawa, 2011; Sahoo & Kim, 2013).

Sabe-se que o teor de As no arroz varia significativamente com a sua origem, variedade e cultivar, por isso é expectável que arroz com diferentes origens tenha concentrações de As discrepantes (Meharg *et al.*, 2009).

Na **Figura 13** apresentam-se as concentrações médias de As em $\mu\text{g kg}^{-1}$ nas amostras de arroz analisadas.

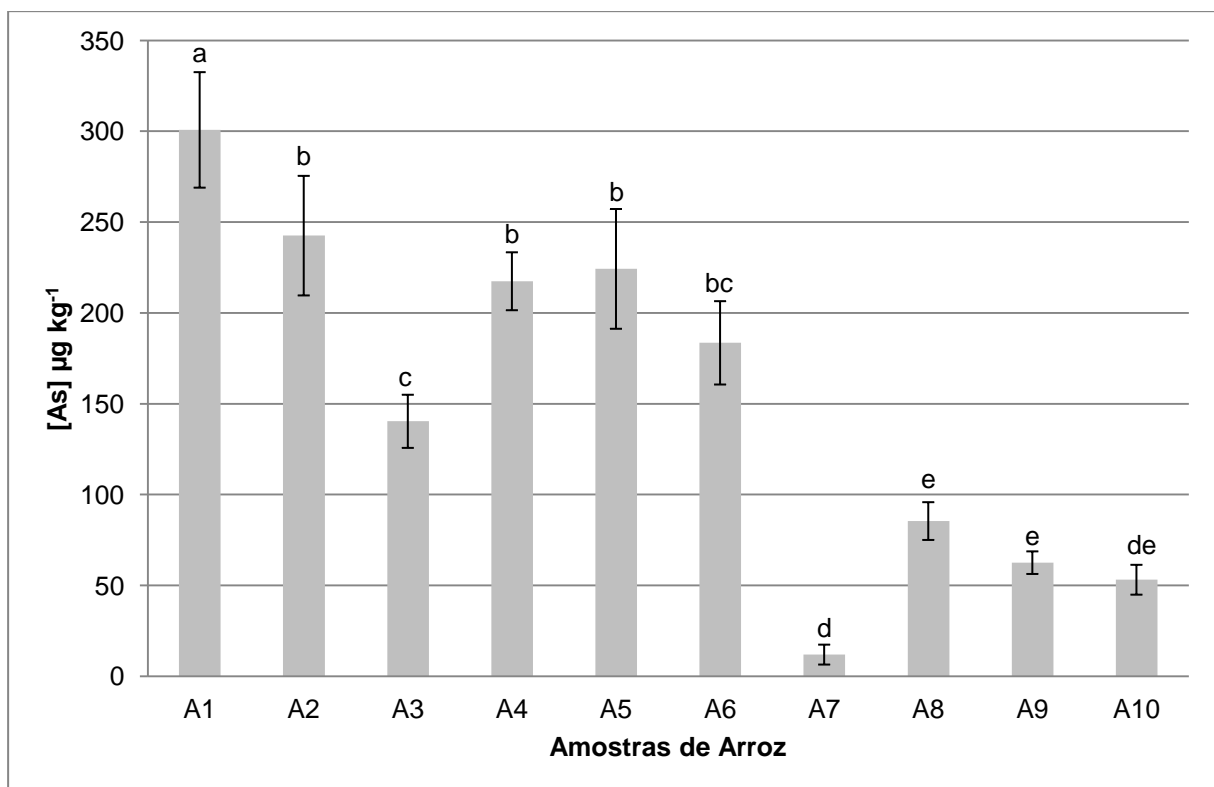


Figura 13 – Concentração média de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras comerciais de arroz.

As letras minúsculas dizem respeito a diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Valores com a mesma letra não são significativamente diferente entre eles. As barras de erro indicam os valores de desvio-padrão.

Foi detetado As em todas as amostras de arroz, sendo que nenhum valor se situou abaixo do limite de deteção do método ($< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$). A preparação das amostras para este ensaio foi realizada por digestão ácida em bloco de aquecimento (DigiPrep MS, SCP Science). Os valores variaram entre $12,0 \pm 5,48$ e $300,8 \pm 31,79 \mu\text{g kg}^{-1}$, revelando uma grande discrepância de concentrações.

As amostras com teor de As mais elevado, A1 ($300,8 \pm 31,79 \mu\text{g kg}^{-1}$), A2 ($242,6 \pm 32,97 \mu\text{g kg}^{-1}$), A5 ($224,3 \pm 32,97 \mu\text{g kg}^{-1}$) e A4 ($217,5 \pm 15,94 \mu\text{g kg}^{-1}$) apresentaram concentrações acima dos $200 \mu\text{g kg}^{-1}$. Embora não haja dados quanto à origem de todas as amostras, de acordo com o rótulo, sabe-se que as amostras A1, A2, A5 são de origem portuguesa, sendo que o arroz A1 e A5 pertence à mesma marca comercial. É também importante realçar que não existem diferenças significativas entre as amostras A2, A4 e A5 sugerindo que têm a mesma origem. As amostras referidas são todas de arroz carolino.

Os resultados obtidos para as amostras A1, A2 e A5, de origem portuguesa, estão em concordância com os valores detetados num estudo realizado em Portugal (Coelho *et al.*, 2013) onde foram reportados valores entre $114 - 285 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Importante mencionar que a amostra A5 é referente a arroz *baby rice*, adequado à alimentação infantil, sem glúten. O teor de As desta amostra é de $224,3 \pm 33,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, um dos valores mais elevados das amostras analisadas. Meharg *et al.* (2008) analisaram 17 amostras de *baby rice* no Reino Unido com concentrações entre $60-160 \mu\text{g kg}^{-1}$, mais reduzidas que a amostra em questão.

Williams *et al.* (2005), num estudo realizado na Europa, reportaram concentrações de As no arroz de $130-200 \mu\text{g kg}^{-1}$. Em Espanha, um estudo de recolha de amostras de arroz, detetou teores de As entre $50-820 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Meharg *et al.*, 2009). Em França os valores situaram-se entre $120-610 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Williams *et al.*, 2007). Estes valores permitem supor que as amostras A3, A4, A6, cuja informação sobre a sua origem não consta no rótulo, podem ser originárias da Europa.

As amostras com teores de As abaixo dos $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, A7 ($12,0 \pm 5,48 \mu\text{g kg}^{-1}$), A10 ($53,2 \pm 8,21 \mu\text{g kg}^{-1}$), A9 ($62,6 \pm 6,21 \mu\text{g kg}^{-1}$) e A8 ($85,5 \pm 10,39 \mu\text{g kg}^{-1}$) pertencem às variedades orientais de arroz analisadas, arroz *basmati* e arroz *thai jasmine*.

Na amostra A7 de arroz *basmati* e, origem asiática (Punjab, Índia) foi onde se determinou a menor concentração média de As ($12 \pm 5,5 \mu\text{g kg}^{-1}$). Segundo Meharg *et al.* (2008) as zonas não contaminadas do continente asiático produzem arroz com baixo teor de As. O arroz *basmati* indiano reporta valores 5 vezes menores que os encontrados no arroz norte-americano (Zavala & Duxbury, 2008). As amostras A8 ($85,5 \pm 10,4 \mu\text{g kg}^{-1}$) e A9 ($62,6 \pm 6,2$

$\mu\text{g kg}^{-1}$) não apresentam valores de concentração média de As significativamente diferentes e pertencem à mesma variedade de arroz, *thai jasmine*. Sabe-se pela informação contida no rótulo, que a amostra A9 é proveniente da Tailândia onde o mais recente estudo (Meharg *et al.*, 2009) detetou teores de As entre 10-390 $\mu\text{g kg}^{-1}$, concordantes com os valores detetados neste ensaio. Os valores sugerem que as amostras têm a mesma proveniência e que a variedade está relacionada com baixo teor em As (Sommella *et al.*, 2013).

Relativamente à amostra A10 cuja origem é italiana, o valor detetado ($53,2 \pm 8,2 \mu\text{g kg}^{-1}$) está abaixo dos valores identificados por Williams *et al.* (2005), num estudo realizado em Itália, que reportou concentrações de As em arroz cru na ordem de 190-220 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Sommella *et al.* (2013) num estudo mais recente, onde se avaliou o teor de As em arroz italiano por variedade e região produtora também reportaram valores mais elevados (80-280 $\mu\text{g kg}^{-1}$) que o determinado neste ensaio.

Como já foi referido, não existem limites definidos para a concentração de As no arroz na Europa. Foi proposto recentemente proposto pela FAO/WHO que se estabelecesse o teor de As (total ou inorgânico) em 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No ensaio realizado todas as amostras, exceto A1 (300,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$), se situam abaixo desse valor. No entanto, se considerarmos o limite definido na China, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, cinco amostras (A1, A2, A4, A5 e A6) já se encontrariam acima desse limite (Zhu *et al.*, 2008; FAO/WHO, 2012, 2012b).

Os valores obtidos sugerem que existe uma relação entre a origem geográfica do arroz e o seu conteúdo em As, como descrito em estudos prévios (Meharg *et al.*, 2009). No entanto, é importante referir que existem muitos fatores que não estão a ser considerados neste estudo que contribuem para a presença de As no grão de arroz como, a natureza geoquímica do solo, práticas de irrigação dos terrenos e, diferenças genéticas entre as variedades de arroz estudadas (Zavala & Duxbury, 2008).

4.1.1 Comparação do teor de As em arroz cru versus arroz cozido

Com o objetivo de se perceber se os processos culinários teriam influência no teor de As do arroz procedeu-se à cozedura das amostras A2, A4 e A5 e, comparou-se o teor de As dessas amostras com o teor de As obtido no primeiro ensaio, em arroz cru. As amostras foram preparadas por digestão ácida em bloco de aquecimento (DigiPrep MS, SCP Science). Optou-se por cozer o arroz do modo tradicionalmente usado em Portugal e, como se encontra sugerido no rótulo das embalagens.

Na **Figura 14** estão representados os valores relativos à comparação do teor de As em amostras de arroz, antes e após a cozedura.

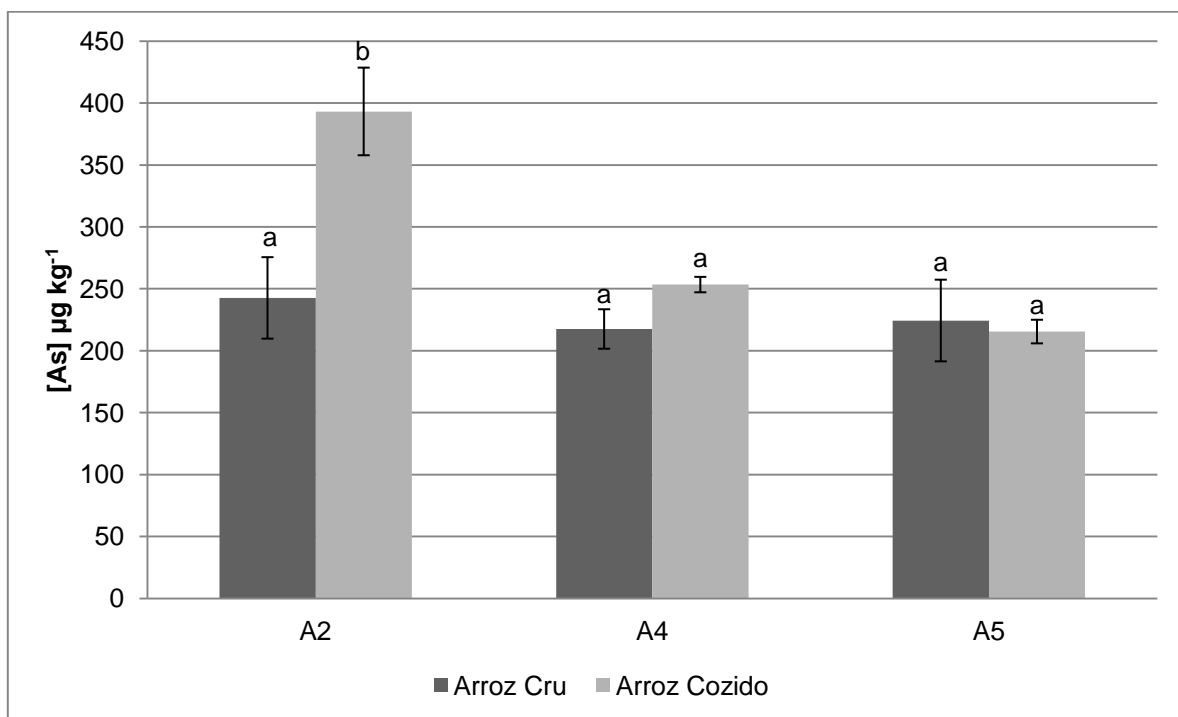


Figura 14 – Comparação do teor de As (µg kg⁻¹) em amostras de arroz cru e cozido.

As letras minúsculas dizem respeito a diferenças significativas entre amostras do mesmo arroz cru e cozido ($p < 0,05$). Valores com a mesma letra não são significativamente diferente entre eles. As barras de erro indicam os valores de desvio-padrão.

Analisaram-se as amostras A2, A4 e A5 por serem de arroz carolino e o teor de As detetado nas amostras em cru ter apresentado valores muito semelhantes, entre $217,5 \pm 15,9$ e $242,6 \pm 32,9$ µg kg⁻¹. Observaram-se desigualdades entre o teor de As no arroz cru e cozido em todos os casos, embora não tenham sido significativamente diferentes para as amostras A4 e A5. Os valores nas amostras de arroz cozido tiveram uma variação de concentração na gama de $215,43 \pm 9,54$ a $393,16 \pm 35,39$ µg kg⁻¹.

Em relação às amostras A2 e A4, a variação foi positiva, verificando-se o aumento do teor de As nos dois casos. Na amostra A2 a cozedura fez aumentar a concentração de As numa variação percentual de $\approx 62\%$, aumentando significativamente o teor de As no arroz. Na amostra A4 a variação percentual foi menor, $\approx 16\%$, e os valores não são significativamente diferentes. No caso da amostra A5 houve uma redução não significativa no teor de As do arroz cozido, a variação negativa foi de $\approx 0,04\%$.

É importante referir que a água utilizada na cozedura não estava contaminada com As. De acordo com as análises do último trimestre de 2013 relativas à água de consumo na zona de Lisboa, a concentração de As situa-se entre $<0,500-1,62 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=35$). O valor paramétrico usado é $10 \mu\text{g L}^{-1}$, valor indicado pela WHO e previsto no Decreto-Lei nº 306/2007, de acordo com a legislação portuguesa (WHO, 2001; Decreto-Lei nº 306/2007; EPAL, 2013).

Tal como foi referido anteriormente, as amostras foram cozidas de maneira a que não sobrasse nenhuma água no fim da cozedura, ou seja de forma a que houvesse total absorção da água pelo arroz durante o processo de confeção: De acordo com a literatura, o método de confeção do arroz pode influenciar o teor de As no arroz cozido (Laparra *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2006; Raab *et al.*, 2009). No entanto, o modo de confeção utilizado neste ensaio não prevê nenhuma variação significativa (Raab *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos na amostra A2 sugerem que possa ter havido alguma interferência no decorrer do ensaio que tenha levado ao aumento significativo do teor de As na amostra cozida. Seria necessário realizar ensaios semelhantes com maior representatividade de amostras para obter resultados mais conclusivos.

4.1.2 Estimativa da Ingestão Diária de Arsénio

Para populações que não são expostas a contaminações de As na água de consumo, a principal via de exposição ao As é através do arroz (Meharg *et al.*, 2008). Sendo Portugal o maior consumidor de arroz da Europa é interessante perceber a quantidade de As a que poderá estar exposta a população portuguesa através da ingestão de arroz na sua alimentação.

Portugal tem atualmente um consumo de 16,1 kg/capita/ano (INE, 2012), o que significa um consumo médio diário de cerca de 45 g de arroz. Através dos dados deste trabalho relativos às amostras que sabemos terem sido produzidas em Portugal (A1, A2 e A5), as concentrações de As variaram entre 224,3 e 300,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o que corresponde a uma ingestão diária de As estimada entre 10,09 e 13,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 11 – Dados estimados referentes ao consumo diário de As para a população portuguesa.

Fonte	Consumo Diário	[As] $\mu\text{g kg}^{-1}$	Ingestão de As $\mu\text{g kg}^{-1}$
Arroz Cru	45 g	224,3 – 300,8	10,09 – 13,5

De acordo com os dados obtidos, considerando uma pessoa de 60 kg, a ingestão diária de As estimada é de de 0,17 – 0,23 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Estes resultados encontram-se dentro dos valores definidos por Calle *et al.* (2011) relativamente a um consumidor europeu (0,13 – 0,56 $\mu\text{g kg}^{-1}$), previamente citado.

Também como já foi referido, não existem limites definidos para a presença de As nos alimentos. No entanto, considerando a PMTDI (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*, dose diária admissível máxima provisória) definida pela JECFA de 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os MRLs de exposição crónica por via oral (0,3 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) verificamos que os resultados obtidos ficam muito abaixo deste valor (EFSA, 2009; JECFA, 2010; ATSDR, 2013).

Podemos concluir que a presença de As no arroz português não se traduz numa ingestão significativa deste metalóide na dieta dos portugueses, uma vez que se encontra abaixo de todos os parâmetros toxicológicos considerados. Ainda assim será importante que se defina um LM para a presença de As em géneros alimentícios, nomeadamente no arroz.

4.2 Avaliação do teor mineral de As nas amostras derivadas de arroz

4.2.1 Concentrações médias de As em bolachas

Na **Figura 15** estão representadas as concentrações médias de As detetadas nas amostras de bolachas derivadas de arroz. Na amostra B3 a quantidade analisada foi $<10 \mu\text{g kg}^{-1}$, pelo que não há confiança no resultado obtido.

Neste ensaio as amostras foram submetidas ao processo de digestão ácida em bloco de aquecimento (DigiPrep MS, SCP Science).

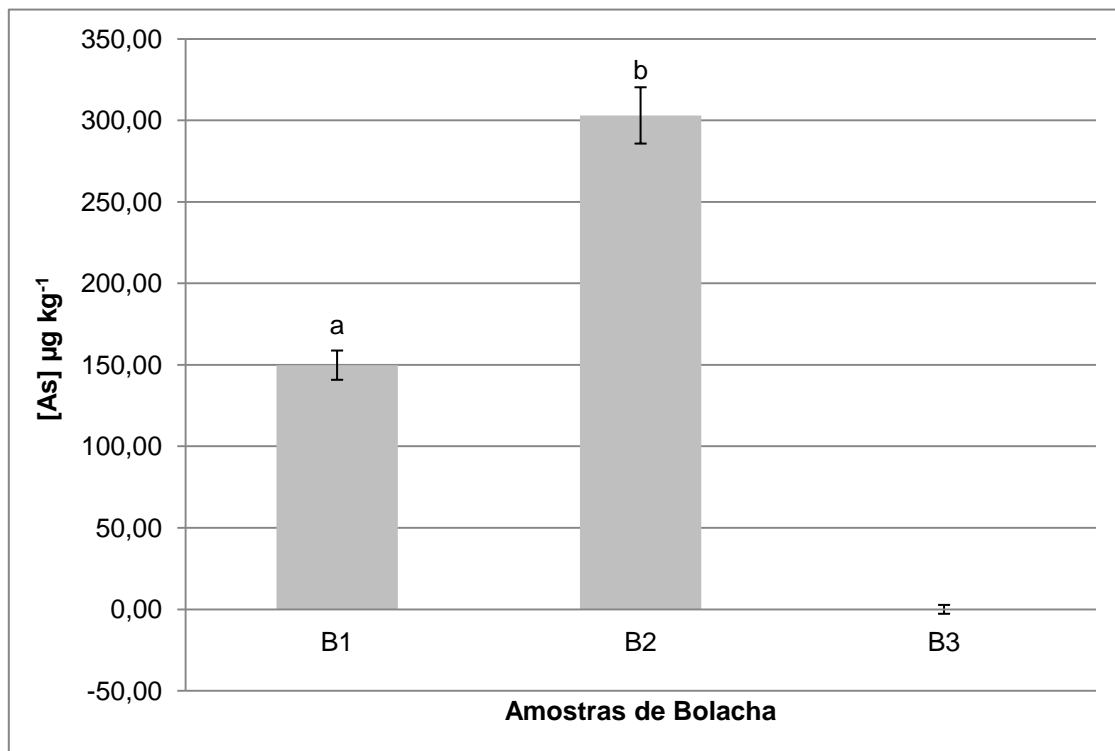


Figura 15 - Concentração média de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras comerciais de bolachas.

As letras minúsculas dizem respeito a diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). As barras de erro indicam os valores de desvio-padrão.

Os teores de As nas amostras B1 e B2 variaram entre $149,8 \pm 8,98$ e $303,1 \pm 17,28 \mu\text{g kg}^{-1}$, respetivamente. Os valores de concentração obtidos são significativamente diferentes em todas as amostras. O teor de arroz integral nestas amostras é superior a 80 % em ambos os casos, sendo mais elevada na amostra B1 (99,3 %) do que na B2 (84,9 %). A amostra B3 não tem referência à percentagem de arroz na sua composição, mas a lista de ingredientes no rótulo refere que o produto é constituído por farinha de arroz, não sendo o ingrediente que surge em primeiro lugar na relação de ingredientes do produto.

Segundo a bibliografia, as concentrações de As em produtos derivados de arroz podem depender de vários fatores: teor de arroz, composição em cereais, zona de cultivo e processamento do arroz (Meharg *et al.*, 2009; Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012). Neste caso existe ainda outro fator a ser considerado, que é o facto da amostra B2 provir de agricultura biológica. Estudos mostram que a concentração de As no arroz é maior em arroz de produção orgânica (Hernández-Martínez & Navarro-Blasco, 2013), o que poderá explicar os valores obtidos. Além disso as formulações orgânicas, como a amostra B2, usam arroz integral na sua composição. Como já foi referido, a maior concentração de As encontra-se na casca e no farelo, zonas do grão de arroz que não são removidas no arroz integral (Rahman *et al.*, 2007; Hernández-Martínez & Navarro-Blasco, 2013). Não obstante estas razões, o valor detetado nesta amostra é semelhante ao valor das amostras de arroz com teor mais elevado obtido no ensaio anterior, o que parece ser um valor muito elevado tendo em conta que se trata de um produto derivado de arroz.

As amostras B1 e B3 são adequadas à alimentação de pessoas com doença celíaca, uma vez que não contêm glúten. A origem da amostra B1 é desconhecida e a amostra B2 é proveniente da Europa. Todas as amostras pertencem a marcas comerciais diferentes.

,

4.2.2 Concentrações médias de As em farinhas

Na **Figura 16** apresentam-se as concentrações médias de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) detetadas nas amostras de farinhas derivadas de arroz. As amostras foram submetidas a digestão ácida em bloco de aquecimento (DigiPrep MS, SCP Science).

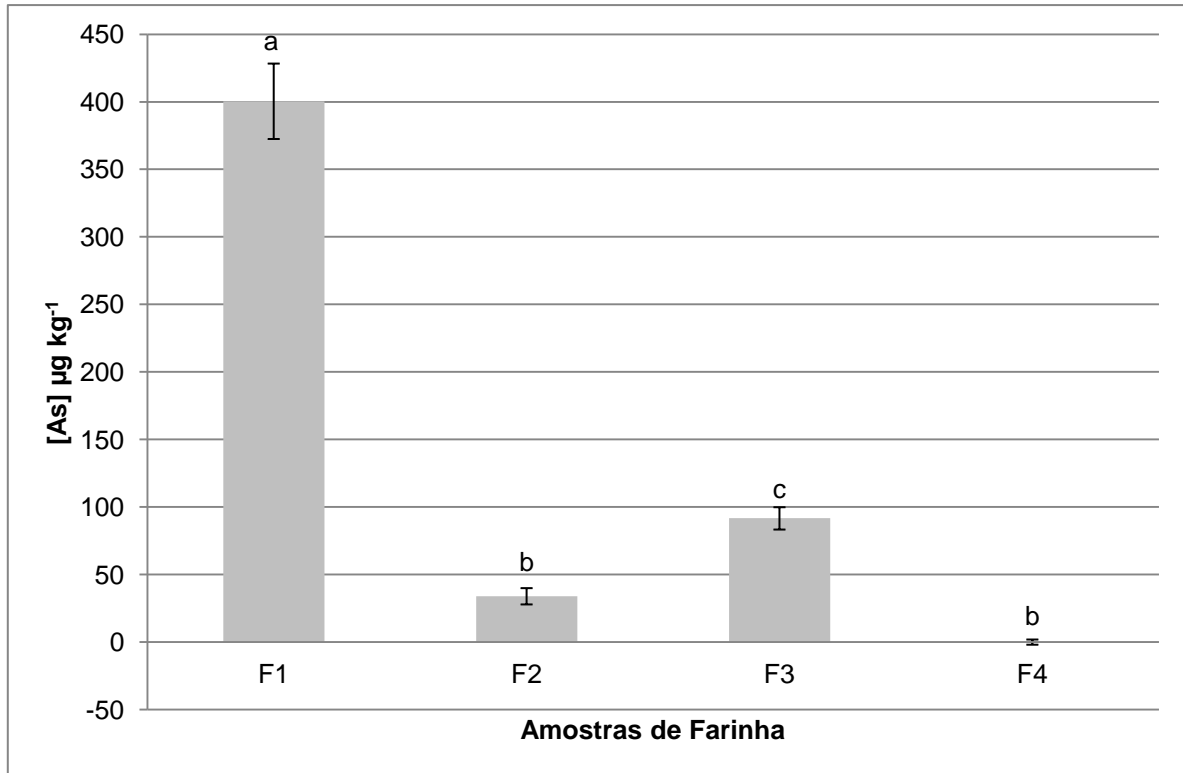


Figura 16 - Concentração média de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras comerciais de farinhas.

As letras minúsculas dizem respeito a diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes entre eles. As barras de erro indicam os valores de desvio-padrão.

Foi detetado As em todas as amostras exceto na amostra F4, cujo valor foi menor que $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, não havendo confiança nesse valor. As concentrações médias de As neste ensaio variaram entre $33,93 \pm 6,04$ e $400,49 \pm 27,93 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de concentração obtidos são significativamente diferentes em todas as amostras de farinha.

Na amostra F1 foi identificado o maior teor de As ($400,49 \pm 27,93 \mu\text{g kg}^{-1}$) de todas as amostras que foram analisadas. A amostra é uma farinha de arroz para uso culinário de marca portuguesa.

Relevância dada às amostras F2, F3 e F4 por serem farinhas destinadas à alimentação infantil, não contendo glúten, por isso também adequadas a crianças e adultos com doença celíaca.

Existe uma correlação positiva entre a percentagem de arroz presente na formulação e a concentração de As detetada nas amostras. A amostra com maior percentagem de arroz é a F1 (100 %), seguidamente a amostra F3 (96,35 %) composta por farinha de arroz e arroz hidrolisado, F2 (63 %) e F4 (30 %). Todas as amostras pertencem a marcas comerciais diferentes.

4.2.3 Concentrações médias de As em amostras de outros produtos derivados de arroz

Na **Figura 17** encontram-se os valores das concentrações médias de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) detetadas em amostras de outros produtos derivados de arroz. Neste grupo inclui-se uns palitos pré-refeição (O1), folhas de arroz (O2), cereais infantis de pequeno-almoço (O3) e bebida de arroz (O4). Para a bebida de arroz analisaram-se dois volumes diferentes de amostra (1 e 3 mL) e a concentração é dada em $\mu\text{g L}^{-1}$. As amostras foram sujeitas a digestão ácida em bloco de aquecimento (DigiPrep MS, SCP Science).

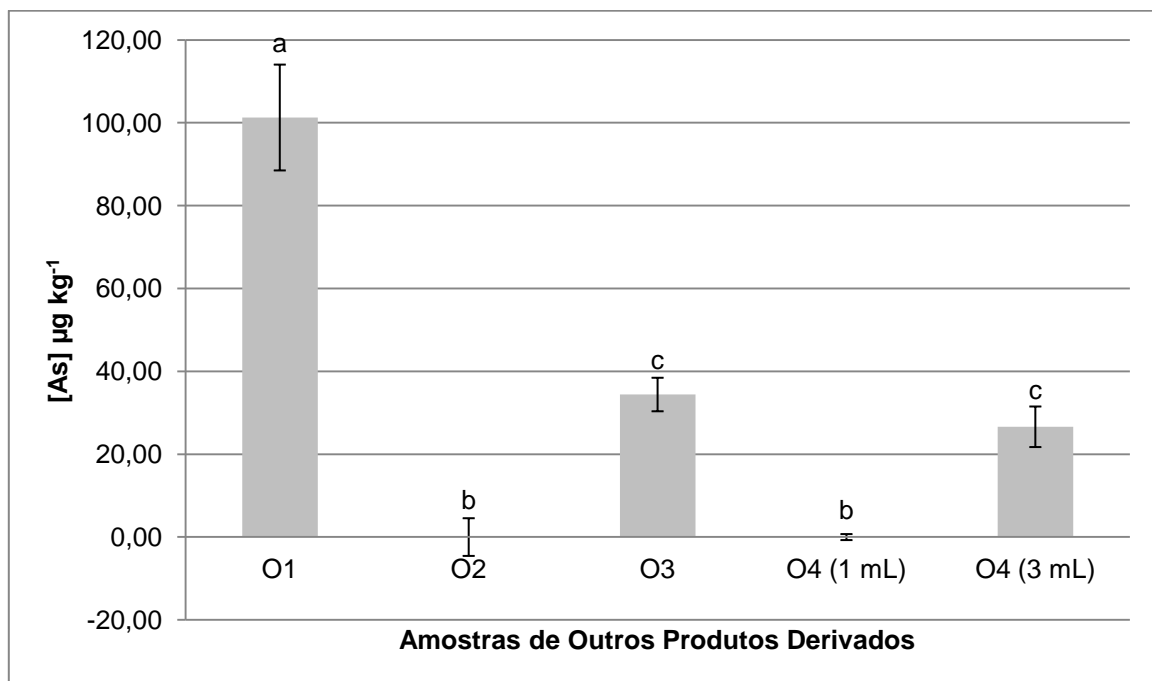


Figura 17 - Concentração média de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$ e $\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras comerciais de outros produtos derivados de arroz.

As letras minúsculas dizem respeito a diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Valores com a mesma letra não são significativamente diferente entre eles. As barras de erro indicam os valores de desvio-padrão

Neste ensaio foi detetado As nas amostras O1, O3 e O4 (3 mL), sendo que a amostra O2 e O4 (1 mL) revelaram um valor <10 , não havendo confiança nesse valor por se situar abaixo do limite de deteção do método. Os resultados para a concentração de As variaram entre $26,63 \pm 4,90$ e $101,29 \pm 12,77 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Analisando a relação entre o teor percentual de arroz, na composição destes produtos e, os seus valores de concentração de As, nota-se uma grande discrepância.

Estes valores sugerem que a presença de As nos produtos derivados de arroz depende de muitos fatores, além da sua composição em arroz (Meharg *et al.*, 2009). A amostra O1 apresenta o teor de As mais elevado para este ensaio ($101,3 \pm 12,8 \mu\text{g kg}^{-1}$) e, a amostra O2 revelou um valor $<10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Uma vez que contêm praticamente a mesma quantidade de arroz na sua composição (50 % e 55 %, respetivamente), sugere que a presença de As nestes produtos é multifatorial, como já foi referido.

No caso da amostra O3 (cereais infantis) o valor detetado ($34,4 \pm 4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) está de acordo com estudos prévios que reportaram concentrações de As em alimentos similares na ordem de $24,0 \pm 9,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Burló *et al.*, 2012) e $33,0 \pm 6,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012).

Relativamente à bebida de arroz (O4) analisaram-se dois volumes diferentes (1 e 3 mL), por se desconhecer o teor de As que poderia estar presente na amostra. A concentração de As para o primeiro volume situou-se abaixo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, por isso considerámos o segundo volume para a discussão. A concentração média de As na amostra O4 (3 mL) ($26,6 \pm 4,9 \mu\text{g L}^{-1}$) é concordante com o estudo publicado por Meharg *et al.* (2008) onde se detetaram valores entre $10,2 - 33,3 \mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores são relevantes, pois situam-se acima do limite definido pela WHO de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para água de consumo (WHO, 2001). Embora a bebida de arroz não seja água, poderá ser usada como um substituto desta se for usada para repor fluidos no organismo. O teor de As presente nesta amostra poderá estar também relacionado com o facto de se tratar de um produto de produção orgânica, que como já foi referido, apresenta teores de As mais elevados relativamente à produção convencional (Hernández-Martínez & Navarro-Blasco, 2013).

Relativamente à origem geográfica dos produtos, as amostras O3 e O4 são produzidas na Europa e, a amostra O2 é proveniente da Ásia. O rótulo da amostra O1 não continha qualquer referência relativamente à origem da amostra. As amostras pertencem todas a marcas comerciais diferentes.

4.2.4 Comparação do teor de As em produtos com e sem glúten

Como já foi referido, é importante analisar o teor de As em alimentos sem glúten, pois normalmente destinam-se a populações suscetíveis, crianças e doentes celíacos, cuja base glucídica da sua alimentação é o arroz e seus derivados (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012).

Na **Tabela 12** encontram-se as concentrações médias obtidas nos produtos derivados de arroz com e sem glúten. Na tabela estão representadas as concentrações médias de As detetadas nos produtos derivados de arroz referentes às amostras que apresentaram um valor $> 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$, no caso da bebida de arroz.

Tabela 12 – Concentrações de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras com e sem glúten.

[As] $\mu\text{g kg}^{-1}$			
	Glúten		Sem Glúten
F1	$400,49 \pm 27,93^{\text{e}}$	B1	$149,81 \pm 8,98^{\text{c}}$
B2	$303,06 \pm 17,28^{\text{d}}$	O1	$101,29 \pm 12,77^{\text{b}}$
O3	$34,41 \pm 4,05^{\text{a}}$	F3	$91,62 \pm 8,27^{\text{b}}$
O4 (3 mL) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$26,63 \pm 4,90^{\text{a}}$	F2	$33,94 \pm 6,04^{\text{a}}$

Concentração média de As \pm desvio-padrão. As letras minúsculas dizem respeito a diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Valores com a mesma letra não são significativamente diferente entre eles

Os teores mais elevados de As foram encontrados nas amostras com glúten sendo que os valores mais elevados (F1 e B2) são significativamente diferentes de todos os valores detetados. A média dos valores analisados para as amostras com glúten ($191,15 \mu\text{g kg}^{-1}$) é claramente superior à média das concentrações nos produtos sem glúten ($94,16 \mu\text{g kg}^{-1}$). Estes valores são meramente indicativos, uma vez que estamos a analisar concentrações muito diferentes.

Relativamente às amostras destinadas a alimentação infantil (F3 e F2) estas apresentam teores de As mais elevados, mas não significativamente diferentes, que os valores reportados por Burló *et al.* (2012), que analisaram farinhas à base de arroz (com e sem glúten) para alimentação infantil e obtiveram resultados entre $43,0 \pm 2,0 - 80,0 \pm 5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, para as amostras sem glúten. Carbonell-Barrachina *et al.* (2012) também reportaram concentrações superiores a $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ em produtos sem glúten destinados à alimentação infantil, claramente superiores aos analisados neste ensaio.

Segundo Burló *et al.* (2012) e Carbonell-Barrachina *et al.* (2012) amostras com glúten apresentavam um teor de As menor que as amostras sem glúten, atribuindo esse facto à maior percentagem de arroz presente nos produtos que não continham glúten. Neste ensaio não se verificou essa tendência provavelmente porque o número de amostras analisadas foi reduzido, proveniente de marcas comerciais diferentes e, tipos de produtos muito distintos na sua formulação.

As concentrações de As em produtos de arroz detetadas nas amostras dependem de vários fatores como a percentagem de arroz e outros cereais na sua composição, zona de cultivo e processamento do arroz, como já foi referido (Meharg *et al.*, 2009; Burló *et al.*, 2012; Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012).

4.2.5 Avaliação da correlação entre [As] e composição de arroz nos produtos derivados

Analisou-se a existência de uma relação positiva entre o teor de As presente nos produtos derivados de arroz analisados e, a percentagem de arroz na sua composição.

É preciso ter em conta que estamos a analisar uma gama de produtos muito distintos entre si, na sua composição e, que a presença de As no arroz é dependente de vários fatores, como já foi referido anteriormente (Megharg *et al.*, 2009; Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012).

A **Figura 18** mostra a correlação positiva ($R^2=0,3119$) existente entre a concentração de As nos produtos e a percentagem de arroz na sua composição.

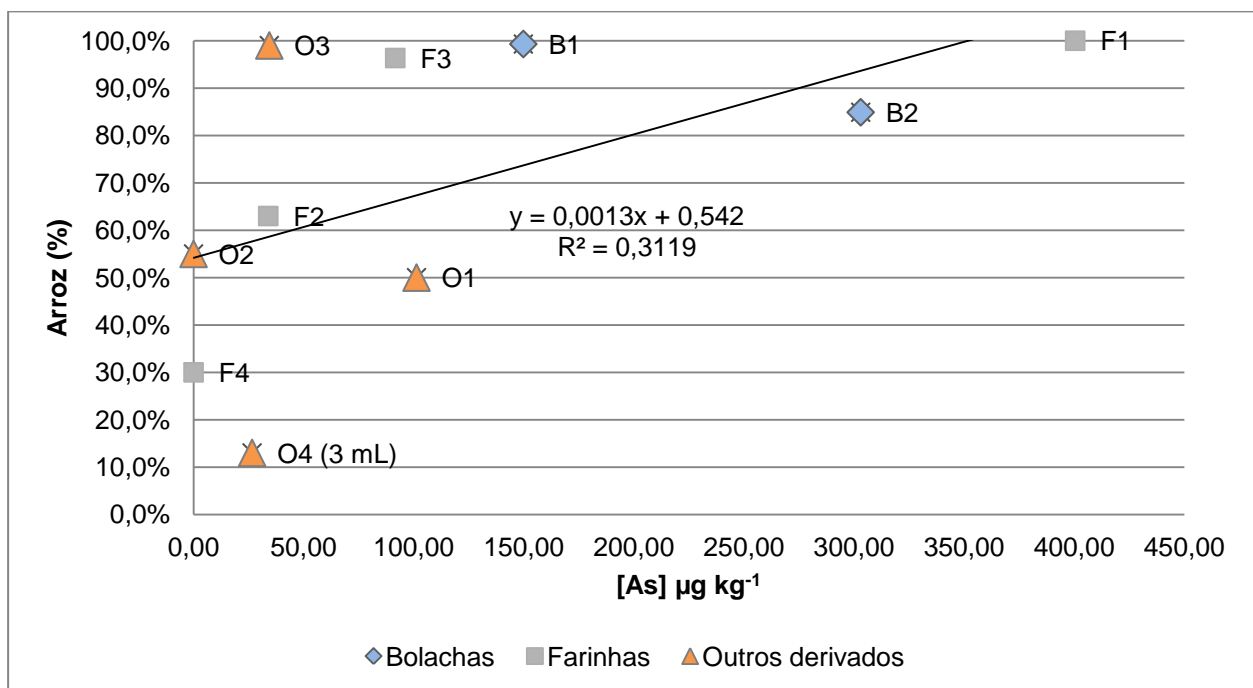


Figura 18 – Relação entre o conteúdo em As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e a percentagem de arroz nos produtos derivados de arroz.

A taxa de correlação não é forte porque existe uma grande variedade de concentrações de As e teores de arroz com valores muito discrepantes. Só se consideraram as amostras que apresentaram valores de concentração de As $> 10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Conseguimos identificar três grupos de amostras. As amostras O2, F2, B2 e F1 seguem uma tendência relativamente linear, perto da reta de correlação, evidenciando que quanto maior for a percentagem de arroz presente na composição de um produto, maior será o seu conteúdo em As, como seria expectável.

O segundo grupo de amostras, O3, F3 e B1, tem uma percentagem muito elevada de arroz na sua composição, mas apresenta concentrações de As relativamente baixas. O terceiro grupo, amostras F4 e O4 (3 mL) revela percentagens de arroz reduzidas, assim como baixos teores de As.

Esta análise mostra-nos que não basta controlar o teor de arroz nos produtos derivados para haver uma menor concentração de As nos alimentos. As discrepâncias detetadas nesta determinação devem-se a uma multiplicidade de fatores dos quais depende o teor de As presente no arroz: origem, variedade, tipo de processamento do arroz usado na composição dos produtos, processamentos das amostras, outros compostos usados na formulação dos produtos, entre outros (Meharg *et al.* 2009; Carbonell-Barrachina *et al.*, 2012).

4.4 Comparação de dois métodos de digestão ácida

Na **Figura 19** está representado o gráfico que compara as concentrações médias de As analisadas em amostras que foram submetidas a dois métodos de digestão ácida diferentes, em bloco de aquecimento (DigiPrep) e em microondas (MW).

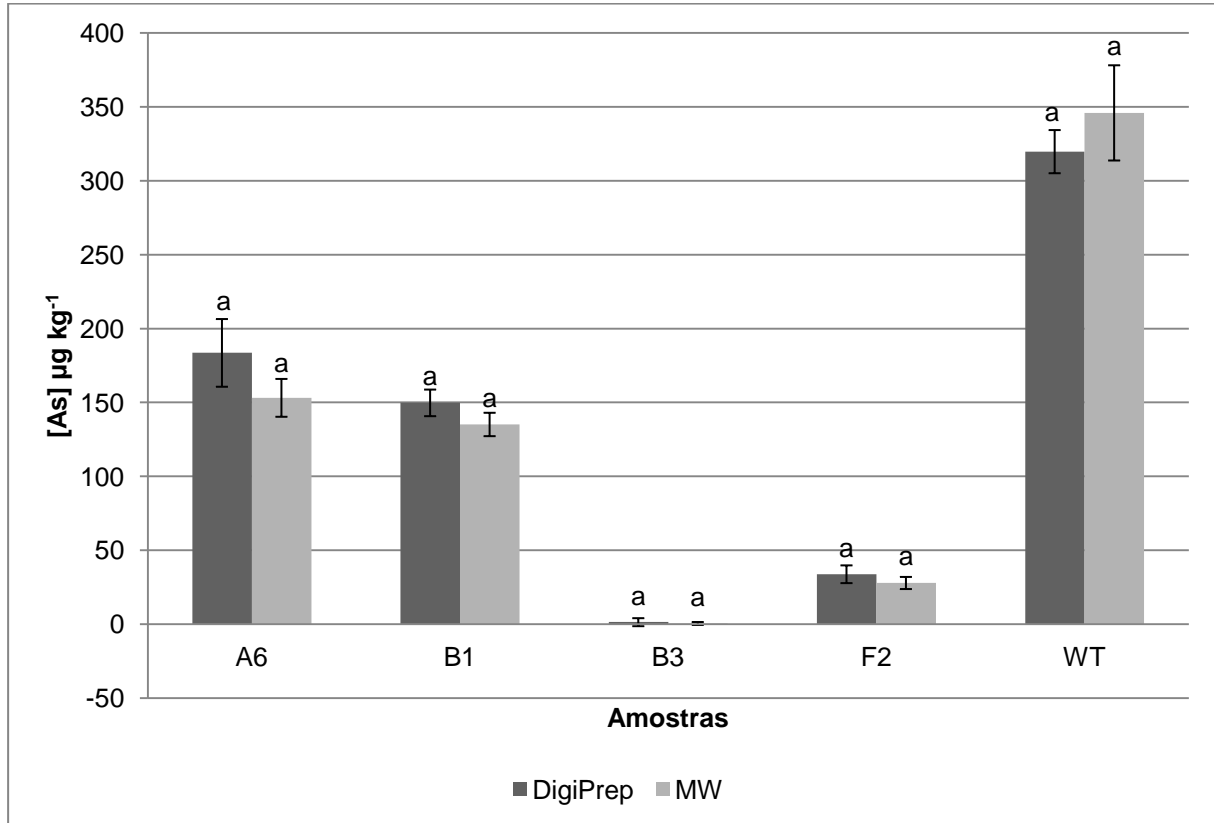


Figura 19 – Teor de As em µg kg⁻¹ em amostras submetidas a dois métodos diferentes de digestão ácida.

As letras minúsculas dizem respeito a diferenças significativas entre as mesmas amostras digeridas pelos dois métodos de digestão ($p < 0,05$). Valores com a mesma letra não são significativamente diferente entre eles. As barras de erro indicam os valores de desvio-padrão

Comparando os dois conjuntos de valores, verificamos que as diferenças não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para os dois métodos, em nenhuma das amostras analisadas.

As determinações para o caso da amostra B3 situaram-se abaixo de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, em ambos os métodos, pelo que não há confiança nesse valor.

Estes resultados são discrepantes relativamente a estudos semelhantes de comparação de digestão ácida por microondas com outros métodos (Tuzen *et al.*, 2004; Güldas, 2008) em que a digestão em microondas permitiu obter as determinações analíticas mais elevadas.

Os estudos de comparação de métodos utilizam maioritariamente MRCs e, neste ensaio, usámos amostras do estudo (A6, B1, B2 e F3) e, uma amostra MRC. No caso deste último, o resultado foi concordante com os trabalhos existentes na literatura.

Os valores obtidos não são significativamente diferentes para se poder sugerir que um método é mais adequado que o outro. As diferenças verificadas podem ser justificadas pelo facto de no procedimento em bloco de aquecimento se ter utilizado uma combinação de dois ácidos (HNO₃ e HCl) e, no método em microondas apenas um ácido (HNO₃), o que pode ter contribuído para diferenças na mineralização das amostras.

4.4.1 Validação dos métodos de digestão

A validação dos métodos de digestão é necessária para assegurar a precisão e confiança nos resultados obtidos. A precisão dos métodos analíticos foi verificada pela análise do MRC WEPAL-IPE-556 Wheat (grain)/Triticum aestivum e, através de ensaios de fortificação.

Na **Tabela 13** estão representados os valores obtidos da análise do material de referência pelos dois métodos descritos, comparação com o valor certificado e a taxa de recuperação de cada método. A taxa de recuperação é obtida pelo cálculo da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação MRC (\%)} = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor certificado}} \times 100$$

Tabela 13 – Validação dos métodos de digestão pela comparação da taxa de recuperação do MRC para cada método de digestão ácida.

	Valor Certificado	Método 1 DigiPrepMS	Recuperação (%)	Método 2 MW	Recuperação (%)
MRC [As] $\mu\text{g kg}^{-1}$	362 ± 61,1	319,74 ± 14,6	88,33%	345,89 ± 32,2	95,55%

Verificou-se que a taxa de recuperação mais elevada (95,55%) foi obtida através do método de digestão ácida em microondas para o MRC, sugerindo que este método será o mais adequado para esta análise.

Na **Tabela 14** estão registadas as determinações de As (μg) analisadas em amostras que foram fortificadas e as respetivas taxas de recuperação.

A taxa de recuperação em amostras fortificadas é calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação fortificado (\%)} = \frac{(\text{quantidade detetada} - \text{original})}{\text{fortificação}} \times 100$$

Tabela 14 – Taxas de recuperação das amostras fortificadas para cada método de digestão ácida.

Amostra	Fortificação (µg)	Original (µg)	Detetado (µg)	Recuperação (%)
Método 1 – DigiPrep MS				
A6	0,05	0,0924	0,1280	71,2 %
Fo1		0 (branco)	0,0526	105,2 %
A1	0,1	0,149	0,2994	149,8 %
Fo2		0 (branco)	0,1069	106,9 %
Método 2 - MW				
B1	0,05	0,0672	0,1057	77%
Fo3		0 (branco)	0,0467	93,4%

Fo = Ensaio em Branco Fortificado

As taxas de recuperação obtidas para o método 1 (DigiPrep MS) variaram entre 71,2% e 149,8%, Sendo que os valores mais relevantes são os dos ensaios em branco, onde se obteve uma boa taxa de recuperação, perto dos 100%.

Para o método 2 (MW), a taxa de recuperação do ensaio em branco fortificado foi 93,4% e o fortificado com amostra apresentou uma taxa de recuperação de 77%. Conforme se verificou pelo ensaio de comparação de métodos, o método em microondas permitiu detetar uma concentração menor de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em todas as amostras analisadas, exceto no MRC. É previsível que neste caso a taxa de recuperação seja mais baixa para B1, revelando a mesma tendência já verificada.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível tirar as seguintes conclusões:

Considerando as amostras analisadas verificou-se que existe presença de As no arroz e em produtos derivados de arroz, nomeadamente bolachas, farinhas, cereais, bebida de arroz e outros.

Os resultados obtidos sugerem que o teor de As no arroz depende principalmente da sua origem geográfica e da sua variedade. Das amostras analisadas os valores mais elevados observaram-se em arroz de origem portuguesa, no tradicional arroz carolino (variedade *japonica*). As variedades orientais *thai jasmine* e *basmati* apresentaram os valores mais reduzidos de concentração de As.

Comparando o arroz cozido com o arroz cru verificou-se que a confeção do arroz influencia a concentração de As no grão. O arroz cozido em pouca água, de maneira a que haja total absorção da água pelo arroz, tem tendência a apresentar uma maior concentração de As. Os valores obtidos não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) nas amostras analisadas, exceto numa, pelo que será necessário fazer mais ensaios semelhantes para tirar conclusões relativamente à influência da cozedura no teor de As.

Pelo cálculo da estimativa da ingestão diária de As através de consumo de arroz, verificou-se que os valores determinados se situam abaixo dos parâmetros toxicológicos considerados, PMTDI e MRL para a exposição crónica por via oral. Estes resultados sugerem que os valores de As presentes no arroz português não são significativos em termos de potenciais consequências negativas para a saúde pública.

Nos produtos derivados de arroz detetou-se a presença de As em quase todas as amostras analisadas. De acordo com os dados obtidos pela determinação analítica e as informações contidas nos rótulos dos produtos é possível sugerir que a concentração de As presente em bolachas, farinhas e outros produtos derivados depende de múltiplos fatores, como o teor de arroz na composição dos produtos, origem geográfica e variedade do arroz, tipo de produção e processamento do arroz.

Relativamente ao teor de arroz presente nos produtos derivados, quanto maior for a percentagem de arroz na sua composição, observa-se uma tendência para o aumento do teor de As, verificado pelo ensaio de correlação entre a percentagem de arroz na composição dos produtos derivados de arroz e o seu teor de As. Esta correlação é fraca sugerindo que existem outros fatores que influenciam a presença de As nos produtos

alimentares derivados de arroz, como já referido. A origem geográfica dos produtos é na maior parte dos casos desconhecida e, neste caso, não se identificou nenhuma relação significativa do teor de As entre produtos provenientes da mesma região.

Sabemos, pelo ensaio do arroz, que a variedade do arroz tem influência na presença de As no arroz, mas nos rótulos dos produtos derivados não existe informação sobre o tipo de matéria-prima utilizada. No entanto, os resultados sugerem uma relação entre o modo de produção e o teor de As presente na amostra, uma vez que as amostras produzidas em agricultura biológica apresentaram valores elevados dentro do seu respetivo grupo. Estes dados podem ser justificado pela frequente utilização da variedade de arroz selvagem, menos processado, em produtos de produção biológica.

Comparando os teores de As em produtos derivados de arroz com e sem glúten, foi possível verificar que os produtos com glúten apresentaram um teor de As mais elevado, contrariando os dados da literatura. Estes dados são justificados pela presença de teores de As muito elevados nas amostras que contém glúten e pela fraca representatividade da amostra que continha produtos com formulações e teores de arroz muito distintos, diferentes modos de produção e pertencentes a marcas comerciais distintas.

O estudo comparativo relativo aos procedimentos de digestão ácida entre a digestão em bloco de aquecimento e microondas não revelou diferenças significativas entre os dois métodos. No entanto, a digestão em bloco de aquecimento revelou determinações de As mais elevadas para todas as amostras o que poderá ser justificado pelo facto de que na digestão ácida em microondas se usou apenas um ácido e, na digestão em bloco de aquecimento usou-se uma combinação de dois ácidos, permitindo uma mineralização mais completa. A amostra de referência utilizada revelou uma taxa de recuperação mais elevada no caso da digestão em microondas, mostrando que o processo de extração usado é adequado para o As. O ensaio de fortificação revelou taxas de recuperação satisfatórias.

Como estudos futuros propõe-se a realização de ensaios de especiação de As nas amostras onde foi detetada a presença deste metalóide porque, como já referido, a especiação influencia a toxicidade deste composto.

Seria interessante desenvolver o ensaio relativo à confeção do arroz, com outros métodos de confeção (com excesso de água, a vapor) determinando o teor de As presente na água utilizada por forma a compreender a sua influência na concentração final de As no arroz.

Propõe-se a realização de ensaios comparativos entre produtos derivados de arroz mais semelhantes na sua formulação por forma a definir com maior precisão os fatores determinantes para a presença de As nesses produtos e, dessa forma, contribuir para que

os mesmos possam ser controlados. Com vista aos interesses da população em geral e, mais especificamente das populações mais sensíveis, como as crianças e os doentes celíacos, sugere-se a realização de estudos de avaliação da presença e especiação de As em produtos derivados de arroz sem glúten.

Importa realçar a importância da realização de estudos de avaliação de risco toxicológico com vista a definir limites máximos de exposição ao arsénio pelo consumo de arroz e seus derivados, uma vez que estes ainda não estão definidos na Europa onde existem países com elevado consumo de arroz per capita, como é o caso de Portugal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abedin, J., Cresser, M. S., Meharg, A. A. & Feldmann, J. Cotter-Howells, J. 2002. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Sci. Technol.*, **36** (5): 962-968.

Abedin, M. J. & Meharg, A. A., 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiology*, **128** (3): 1120-1128.

Abonga, M., 2012. *Arsenic bioaccessibility under variable physiological conditions of the human gut*. Master's Dissertation. Ghent University, Belgium.

Ali, W., 2012. *Arsenic transport in plants*. PhD's Dissertation. University of York, Heslington, UK.

Alloway, B. J., 2013. *Heavy Metals in Soils*. 3rd edition, Springer.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. *Toxicological Profile for Arsenic*, Atlanta, USA.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2013. *Minimal Risk Levels (MRLs)*. [Online] Available at: http://www.atsdr.cdc.gov/mrls/pdfs/atsdr_mrls_july_2013.pdf

Bae, M., Watanabe, C., Inaoka, T., Sekiyama, M., Sudo, N., Bokul, M. H., Ohtsuka, R., 2002. Arsenic in cooked rice in Bangladesh. *The Lancet*, **360** (9348): 1839-40.

Berg, T., 2012. *Determination and speciation of arsenic in environmental and biological samples*. PhD's Dissertation. University of Massachusetts-Amherst, USA.

Bhattacharjee, H., Mukhopadhyay, R., Thiyagarajan, S. & Rosen, B., 2008. Aquaglyceroporins: ancient channels for metalloids. *Journal of Biology*, **7** (33): 1-6.

Bhattacharya, P., Samal, A. C., Majumdar, J. & Santra, S., 2010. Accumulation of arsenic and its distribution in rice plant (*Oryza sativa* L.) in Gangetic West Bengal, India. *Paddy Water Environment*, **8**: 63-70.

Bundschuh, J., Carrera, A. P. & Litter, M. I., 2008. *IBEROARSEN Distribución del arsénico en las regiones ibérica e iberoamericana*, Argentina: CYTED.

Bundschuh, J., Nath, B., Bhattacharya, P., Liu, C., Armienta, M. A., López, M. M., Lopez, D. L., Jean, J., Cornejo, L., Macedo, L. F., Filho, A. T., 2012. Arsenic in the human food chain: the Latin America perspective. *Science of the Total Environment*, **429**: 92-106.

- Burló, F., Ramírez-Gandolfo, A., Signes-Pastor, A. J., Haris, P. I., Carbonell-Barrachina, A. A., 2012. Arsenic contents in spanish infant rice, pureed infant foods and rice. *Journal of Food Science*, **71** (1): 15-19.
- Calle, M., Emteborg, H., Linsinger, T. P. J., Montoro, R., Sloth, J. J., Rubio, R., Baxter, M. J., Feldmann, J., Vermaercke, P., Raber, G., 2011. Does the determination of inorganic arsenic in rice depend on the method?. *Trend in Analytical Chemistry*, **30** (4): 641-651.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999. *Canadian Soil Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*, Environment Canada. Manitoba.
- Carbonell-Barrachina, A. A., Ramírez-Gandolfo, A., Wu, X., Norton, G. J., Burló, F., Deacon, C., Meharg, A. A., 2012. Essential and toxic elements in infant foods from Spain, UK, China and USA. *J. Environ. Monit.*, **14**: 2447.
- Carbonell-Barrachina, Á. A., Wu, X., Ramírez-Gandolfo, A., Norton, G. J., Burló, F., Deacon, C., Meharg, A. A. et al., 2012. Inorganic arsenic contents in rice-based infant foods from Spain, UK, China and USA. *Environmental Pollution*, **163**: 77-83.
- Carey, A., Lombi, E., Donner, E., Jonge, M., Punshon, T., Jackson, B., Guerionot, M., Price, A., Meharg, A., 2012. A review of recent developments in speciation and location of arsenic and selenium in rice grain. *Anal Bioanal Chem*, **402** (10): 3275-3286.
- Carey, A., Scheckel, K., Lombi, E., Newville, M., Choi, Y., Norton, G., Charnock, J., Feldmann, J., Price, A., Meharg, A., 2010. Grain unloading of arsenic species in rice. *Plant Physiology*, **152** (1): 309-319.
- Carter, K. F. & Carter, G. L., 2012. Evaluation of Metal Impurities in Foods Preserved With Sodium Lactate. *Journal of Environmental Health*, **75** (6): 22-27.
- Chang, T. & Bardenas, E. A., 1965. *The Morphology and Varietal Characteristics of the Rice Plant*, Laguna, The Philippines: The International Rice Research Institute.
- Chen, Y., Wu, F., Liu, M., Parvez, F., Slavkovich, V., Eunus, M., Ahmed, A., Argos, M., Islam, T., Rakibuz-Zaman, M., Hasan, R., Sarwar, G., Levy, D., Graziano, J., Ahsan, H., 2013. A prospective study for arsenic exposure, arsenic methylation capacity and risk of cardiovascular disease in Bangladesh. *Environmental health perspectives*, **121** (7): 832-8.
- Chen, Z., Zhu, Y., Liu, W. & Meharg, A., 2005. Direct evidence showing the effect of root surface iron plaque on arsenite and arsenate uptake into rice (*Oryza sativa*) roots. *The New Phytologist*, **165** (1): 91-97.

Coelho, I., Gueifão, S., Pinto, T. & Castanheira, I., 2013. Estudos de especiação de arsénio no arroz. *INSA Boletim Epidemiológico*, **5** (2): 6-7.

Commission Directive 2008/60/EC of 17 June 2008 laying down specific purity criteria concerning sweeteners for use in foodstuffs. Official Journal of the European Union.

Commission Directive 2008/84/EC of 27 August 2008 laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners. Official Journal of the European Union.

Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities.

Dabeka, R. W. & Lacroix, G., 1987. Total arsenic in foods after sequential wet digestion, dry ashing, coprecipitation with ammonium pyrrolidine dithiocarbamate, and graphite-furnace atomic absorption spectrometry. *J Assoc Off Anal Chem*, **70** (5): 866-870.

Davis, M. A., Mackenzie, T., Cottingham, K., Gilbert-Diamond, D., Punshon, T., Karags, M., 2012. Rice consumption and urinary arsenic concentration in U.S. children. *Environmental Health Perspectives*, **120** (10): 1418-1424.

Decreto-lei N.º 306/2007 de 27 de Agosto. Diário da República nº 164 - I Série. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.

Decreto-lei N.º 236/98 de 1 de Agosto. Diário da República nº 176 - I Série - A. Ministério do Ambiente. Lisboa.

Devesa, V., Veléz, D. & Montoro, D., 2008. Effect of thermal treatments on arsenic species contents in food. *Food and Chemical Toxicology*, **46** (1): 1-8.

Dias, M. F. P. & Rocha, A. M. C. N., 2012. Evolução das Estratégias de Investigação do Arroz no INIA - Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, **35** (7): 69-87.

SCOOP (Scientific Cooperation), 2004. SCOOP Report of experts participating in Task 3.2.11. March 2004. *Assessment of the dietary exposure to As, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States*. European Commission - Directorate-General Health and Consumer Protection.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2009. Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal*, **7** (10): 1351.

EPAL, 2013, Qualidade da Água - Resultados das Análises. Grupo Águas de Portugal, Lisboa.

Esteves, C. S., 2009. *Influência de aditivos em solos contaminados com arsênio na produção de hortícolas*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Francesconi, K. A. & Kuehnelt, D., 2004. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst*, **129**: 373-395.

FAO (Food and Agriculture Organization), 2004. *Rice and human nutrition*. Rome, Italy, FAO.

FAO/WHO, 2012, *Joint FAO/WHO Food Standards Programme*. - CL2012/7-CF, Maastrich, The Netherlands.

FAO/WHO, 2012b. *Proposed draft maximum levels for arsenic in rice - CX/CF 12/6/8*. Maastrich, The Netherlands.

Faraj, J. M., 2011. *Iron Status, Inflammation and Anemia in Bangladeshi Women Exposed to Arsenic*. University of Massachusetts Amherst, USA.

Finnegan, P. M. & Chen, W., 2012. Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, **3** (182): 1-18.

Food and Agriculture Organization (FAO), 2013. *FAO Rice Market Monitor*, Volume XVI, Issue no. 4 [Online] Available at: <http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/>.

Garnier, J., Travassac, F., Lenoble, V., Rose, J., Zheng, Y., Hossain, M. S., Chowdhury, S. H., Biswas, A. K., Ahmed, K. M., Cheng, Z., Geen, A., 2010. Temporal variations in arsenic uptake by the rice plants in Bangladesh: The role of iron plaques in paddy fields irrigated with groundwater. *The Science of the Total Environment*, **408** (109): 4185-4193.

Güven, D. E. & Akinci, G., 2011. Comparison of acid digestion techniques to determine heavy metals in sediment and soil samples. *Gazi University Journal of Science*, **24** (1): 29-34.

Heikens, A., 2006. *Arsenic contamination of irrigation water, soil and crops in Bangladesh: Risk implications for sustainable agriculture and food safety in Asia*. FAO - RAP Publication 2006/20, Bangkok.

Hernández-Martínez, R. & Navarro-Blasco, I., 2013. Survey of total mercury and arsenic content in infant cereals marketed in Spain and estimated dietary intake. *Food Control*, **30** (2): 423-432.

- Hughes, M. F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, **133**: 1-16.
- INE (Instituto Nacional de Estatística), 2012. *Balanços de Aproveitamento de Produtos Vegetais: Consumo humano de arroz branqueado per capita (kg/hab) por comprimento de grão*, Lisboa.
- INSA, 2013. *Tabela da Composição de Alimentos*. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.
- IPAC (Instituto Português de Acreditação), 2007. *Guia para quantificação da incerteza em ensaios químicos*, Caparica: IPAC.
- Jackson, B. P., Taylor, V. F., Karagas, M. R., Punshon, T., Cottingham, K., 2012. Arsenic, Organic Foods, and Brown Rice Syrup. *Environmental Health Perspectives*, **120**(5): 623-626.
- JECFA, 2010. Evaluation of Certain Contaminants in Food. 72nd Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series* **959**, 21–37
- Laparra, J., Vélez, D., Barberá, R., Farré, R., Montoro, R., 2005. Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice: practical aspects for human health risk assessments. *J Agri Food Chem*, **53** (23): 8829-33.
- MADRP (Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e Pescas), 2007. *Culturas Arvenses - Diagnóstico Sectorial*, GPP, Lisboa.
- Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X., Su, Y., McGrath, S., Zhao, F., 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS*, **105** (29): 9931-9935.
- Mandal, B. K. & Suzuki, K. T., 2002. Arsenic around the world: a review. *Talanta*, **58** (1): 201-235.
- Meharg, A. A. & Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, **154** (1): 29-43.
- Meharg, A. A., Sun, G., Williams, P., Adomako, E., Deacon, C., Zhu, Y., Feldmann, J., Raab, A., 2008. Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. *Environmental Pollution*, **152** (3): 746-749.

Meharg, A., Deacon, C., Campbell, R., Carey, A., Williams, P., Feldmann, J., Raab, A., 2008. Inorganic arsenic levels in rice milk exceed EU and US drinking water standards. *J. Environ. Monit.*, **10**: 428-431.

Meharg, A., Williams, P., Domako, E., Lawgali, Y., Deacon, C., Villada, A., Cambell, R., Sun, G., Zhu, G., Feldmann, J., Raab, A., Zhao, F., Isalm, R., Hossain, S., Yanai, J., 2009. Geographical variation in total and inorganic content of polished (white) rice. *Environm. Sci. Technol.*, **43**: 1612-1617.

Monfreda, C., Ramankutty, N. & Foley, J. A., 2008. Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary production in the year 2000. *Global Biogeochemical Cycles*, **22**.

National Academy of Sciences, 2001. *Dietary References Intakes for Vitamin C, K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. The National Academies Press, Washington D.C., USA.

NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases), 2008. *Celiac Disease*. [Online] Available at: <http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/celiac/celiac.pdf> [Acedido em 2013].

OMS (Organização Mundial de Saúde), 1993. *Guidelines for Drinking Water Quality*. 2nd ed. WHO, Geneva.

Pinto, F. R., 2011. *Avaliação da resposta ao stresse oxidativo induzido por cádmio em plantas de espinafre*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Raab, A., Baskaran, C., Feldmann, J. & Meharg, A. A., 2009. Cooking rice in a high water to rice ratio reduces inorganic arsenic content. *J. Environ. Monit.*, Volume 11, pp. 41-44.

Rahman, M. A. & Hasegawa, H., 2011. High levels of inorganic arsenic in rice in areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation and cooking. *Science of the Total Environment*, **409** (22): 4645-4655.

Rahman, M. A., Hasegawa, H., Rahman, M., Rahman, M., Miah, M.A., 2006. Influence of cooking method on arsenic retention in cooked rice related to dietary exposure. *Science of the Total Environment*, **370**: 51-60.

- Rahman, M. A., Hasegawa, H., Rahman, M., Miah, M., Tasmin, A., 2008a. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.): human exposure through food chain. *Ecotoxicol Environ Saf*, **69** (2): 317-24.
- Rahman, M. A., Hasegawa, H., Rahman, M., Rahman, M., Miah, M., 2007. Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza sativa* L.) and its distribution in fractions of rice grain. *Chemosphere*, **69** (6): 942-948.
- Reichman, S., 2002. *The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc*, Melbourne, Australia: Australian Minerals & Energy Environment Foundation.
- Roy, P. & Saha, A., 2002. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Current Science*, **82** (1): 38-45.
- Sahoo, P. K. & Kim, K., 2013. A review of the arsenic concentration in paddy rice from the perspective of geoscience. *Geosciences Journal*, **17** (1): 107-122.
- Sarkar, B., 2002. *Heavy Metals in the Environment*. 10th ed. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Semedley, P. L. & Kinniburgh, D. G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, **17** (5): 517-568.
- Sengupta, M., Hossain, M. A., Mukherjee, A., Ahamed, S., Das, B., Nayak, B., Pal, A., Chakraborti, D., 2006. Arsenic burden of cooked rice: Traditional and modern methods. *Food and Chemical Toxicology*, **44** (11): 1823-1829.
- Signes-Pastor, A. J., Al Rmalli, S. W., Jenkins, R. O., Carbonell-Barrachina, A. A., Haris, P. I., 2012. Arsenic bioaccessibility in cooked rice as affected by arsenic in cooking rice. *Journal of Food Science*, **77** (11): 201-6.
- Singh, N., Ma, L. Q., Srivastava, M. & Rathinasabapathic, B., 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris sensiformis* L. *Plant Science*, **170** (2): 274-282.
- Smith, A. H., Lingas, E. O. & Rahman, M., 2000. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, Volume **78** (9): 1093-1103.

- Smith, E., Juhasz, A. L., Weber, J. & Naidu, R., 2008. Arsenic uptake and speciation in rice plants grown under greenhouse conditions with arsenic contaminated irrigation water. *Science of the Total Environment*, **392**: 277-283.
- Smith, E., Kempson, I., Juhasz, A., Weber, J., Skinner, W., Gräfe, M., 2009. Localization and speciation of arsenic and trace elements in rice tissues. *Chemosphere*, **76** (4): 529-535.
- Sommella, A., Deacon, C., Norton, G., Pigna, M., Violante, A., Meharg, A., 2013. Total arsenic, inorganic arsenic, and other elements concentrations in Italian rice grain varies with origin and type. *Environmental Pollution*, **181**: 38-43.
- Tuzen, M., Sari, H. & Soylak, M., 2004. Microwave and wet digestion procedures for AAS determination of trace contents of sediment samples. *Analytical Letters*, **37** (9): 1925-1936.
- UNICEF, 2008. *Arsenic Mitigation in Bangladesh*. [Online] Available at: <http://www.unicef.org/bangladesh/Arsenic.pdf>.
- Varenes, A., 2003. *Produtividade dos solos e ambiente*. Escolar Editora, Lisboa.
- WHO (World Health Organization), 2000. *Arsenic - Air Quality Guidelines*. 2nd ed. Copenhagen, Denmark: WHO, pp. 1-14.
- WHO (World Health Organization), 2001. *Arsenic and Arsenic Compounds*, Geneva: s.n.
- Williams, P. N., Villada, A., Deacon, C., Raab, A., Figueirola, J., Green, A., Feldmann, J., Meharg, A., 2007. Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environmental Science and Technology*, **41** (19): 6854-6859.
- Williams, P., Price, A., Raab, A., Hossain, S., Feldmann, J., Meharg, A., 2005. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environ. Sci. Technol.*, **39** (15): 5531-40.
- Xu, X. Y., McGrath, S. P., Meharg, A. A. & Zhao, F. J., 2008. Growing rice aerobically markedly decreases As accumulation. *Environ. Sci. Technol.*, **42**: 5574-5579.
- Zavala, Y. J. & Duxbury, J. M., 2008. Arsenic in Rice I: Estimating Normal Levels of Total Arsenic in Rice Grain. *Environm. Sci. Technol.*, **42** (10): 3856-3860.
- Zavala, Y. J., Gerads, R., Gürlleyük, H. & Duxbury, J. M., 2008. Arsenic in rice: II. Arsenic speciation in USA grain and implications for human health. *Environ. Sci. Technol.*, **42** (10): 3861-3866.

Zhang, J. Z., 2009. *The Toxicity Assessment of Heavy Metals and their Species in Rice*, University of Cincinnati, Ohio, USA.

Zhang, W., Cai, Y., Tu, C. & Ma, L. Q., 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *Science of the Total Environment*, **300** (1-3): 167-177.

Zhao, F. J., Meharg, A. A. & McGrath, S. P., 2008. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, **181**: 777-794.

Zhu,, Y., Williams, P. & Meharg, A., 2008. Exposure to inorganic arsenic from rice: a global health issue?. *Environmental Pollution*, **154** (2): 167-171.