



Brígida Daniela Fernandes Simões

## Identificação e Quantificação de Níquel em Produtos Alimentares para Crianças

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e pelo Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira Pereira, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Brígida Daniela Fernandes Simões

**Identificação e quantificação de níquel em produtos  
alimentares para crianças**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para a  
obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar sob a orientação da Professora  
Doutora Angelina Lopes Simões Pena e do Professor Doutor André Monteiro Pais  
Teixeira Pereira

Setembro de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Angelina Pena pela sugestão deste trabalho e pela oportunidade que me concedeu ao permitir a sua realização.

Ao Doutor André Pereira por toda a paciência, apoio e orientação, bem como pelas críticas e sugestões ao longo de todo o trabalho.

Ao Doutor Rui por toda a disponibilidade sempre demonstrada e cooperação na realização deste trabalho.

À Adriana, à Diana, à Filipa, à Caterina, à Joana, por todas as horas passadas no laboratório, pelo apoio, pela partilha e ensinamentos, porque sem vocês a realização deste trabalho não teria sido tão animada.

Aos meus amigos, pelo apoio e força que me deram, sempre presentes nas alturas mais complicadas.

E por último, mas não menos importante, aos meus pais e irmão, por me incentivaram a seguir sempre em frente e não desistir, pela paciência e apoio sempre prestados.

A todos os demais que contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero obrigada.

## **Abstract**

The main sources of exposure of metallic elements, such as nickel, to the general non-smoking population are found in food and water. Once absorbed by the body, these are not completely eliminated, promoting toxic effects and even classified by the International Agency of the World Health Organization for Cancer Research (IARC) as a carcinogenic agent for health. The permitted maximum residue limits for nickel have not yet been established.

There is currently a special concern for foods intended for children, especially newborns. This is related to the greater susceptibility to food contaminants by this population subtype, mainly due to the higher food intake per Kg of body weight compared to the rest of the population. In parallel, the mechanisms that could minimize the toxicity of these compounds are not yet fully developed.

We analyzed 85 samples of food for children, from ready meals, fruits and flours, of which 76 are contaminated. The group with the highest contamination is the ready meal with an average value of 55  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  and the smallest group of the flour with an average value of 17  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Within the comparisons between biological and non-biological samples and brand and white label no comparison was possible.

It is thus concluded that it is of utmost importance to legislate a ceiling for nickel as far as the value is above the tolerable daily dose (2.8  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  body weight) representing a danger to children.

**Key-words:** Children; graphite furnace atomic absorption spectrometry; infant formulas; nickel; susceptibility.

## Resumo

As principais fontes de exposição de elementos metálicos, como é o caso do níquel, para a população em geral não fumadora, encontram-se nos alimentos e a água. Uma vez absorvido pelo organismo, estes não são completamente eliminados, promovendo efeitos tóxicos, sendo inclusive classificados pela Agência Internacional da Organização Mundial da Saúde para Pesquisa sobre o Cancro (IARC) como agente carcinogénico para a saúde. Os limites máximos de resíduo permitidos para o níquel ainda não foram estabelecidos.

Existe atualmente uma especial preocupação com alimentos destinados a crianças, nomeadamente a recém-nascidos, uma vez que este sub-tipo de população apresente uma maior susceptibilidade aos contaminantes alimentares devido sobretudo à maior ingestão de alimento por Kg de peso corporal, comparativamente à restante população. Paralelamente, os mecanismos que poderiam minimizar a toxicidade destes compostos ainda não estão completamente desenvolvidos.

Foram analisadas 85 amostras de alimentos para crianças, desde refeições prontas, frutas e farinhas, das quais 76 se encontram contaminadas. O grupo que apresenta maior contaminação é o das refeições prontas com um valor médio de 55  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  e o menor grupo, o das farinhas, com um valor médio de 17  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Dentro das comparações entre amostras biológicas com não biológicas; e marca com marca branca, não foi possível estabelecer qualquer comparação.

Assim, conclui-se que é de extrema importância legislar um limite máximo para o níquel, na medida em que o valor se encontra acima da dose tolerável diária (2,8  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  por peso corporal) representando um perigo para as crianças.

**Palavras-chave:** Crianças; espectrometria de absorção atómica em câmara de grafite; fórmulas infantis; níquel; suscetibilidade.

## Índice Geral

Agradecimentos .....	III
Abstract .....	IV
Resumo .....	V
Índice de Figuras.....	I
Índice de Tabelas.....	I
Abreviaturas.....	2
Objetivos .....	3
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
1.1 Introdução .....	5
1.2 Alimentos para crianças.....	7
1.3 Metais pesados.....	9
1.3.1 Níquel .....	10
1.3.1.1 Características principais .....	10
1.3.1.2 Fontes de níquel e suas aplicações.....	10
1.3.1.3 Exposição ao níquel.....	10
1.4 Legislação .....	12
1.5 Metodologias analíticas para a determinação de metais .....	15
1.5.1 Espectrometria de Absorção atômica com câmara de grafite. ....	17
1.6 Comparação entre as metodologias analíticas .....	18
1.7 Ocorrência de níquel em alimentos .....	21
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
2.1 Materiais e metodologia analítica .....	28
2.1.1 Reagentes e Soluções .....	28
2.1.1.1 Reagentes:.....	28
2.1.1.2 Soluções: .....	28
2.1.2 Material Utilizado .....	28
2.1.3 Equipamentos .....	29

2.2 Amostragem.....	29
2.2.1 Recolha de amostras.....	29
2.3 Metodologia Analítica.....	33
2.4 Validação da metodologia analítica.....	35
2.5 Discussão de Resultados .....	38
2.5.1 Otimização dos parâmetros do equipamento de espectrometria de absorção atômica.....	38
2.5.1.1 Temperatura de pirólise e temperatura de atomização .....	38
2.5.1.2 Otimização da extração.....	38
2.5.2 Validação.....	39
2.5.2.1 Linearidade .....	39
2.5.2.2 Limites de deteção e quantificação .....	40
2.5.2.3 Exatidão e Precisão .....	40
2.5.3 Níveis de níquel nas amostras encontradas.....	41
2.6 Avaliação do risco.....	44
3. Conclusão .....	48
4. Referências Bibliográficas.....	50
5. Anexos.....	55

## Índice de Figuras

Figura 1. Processo de limpeza dos cadinhos.....	33
Figura 2. Preparação da amostra.....	34
Figura 3. Linearidade em padrão .....	39
Figura 4. Linearidade para amostras fortificadas.....	40
Figura 5. Médias e frequências gerais. ....	42
Figura 6. Médias e frequências do grupo das refeições prontas. ....	42

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Alimentos com teor em níquel que podem agravar a dermatite induzida pela ingestão de níquel (Carrapatoso <i>et al.</i> , 2004).....	11
Tabela 2. Definições presentes no Artigo 2.º do Regulamento (UE) n.º609/2013.....	14
Tabela 3. Comparação entre espectrometria de absorção atômica com chama e com câmara de grafite (Costa 2013).....	18
Tabela 4. Metodologias analíticas utilizadas na determinação de níquel em alimentos .....	20
Tabela 5. Tabela de ocorrência de níquel em alimentos. ....	23
Tabela 6. Lista de amostras. ....	30
Tabela 7. Temperaturas e tempos das etapas da espectrometria de absorção atômica do método utilizado.....	35
Tabela 8. Exatidão e Precisão intra-dia e inter-dia.....	41
Tabela 9. Ingestão de alimentos e peso por faixa etária.....	44

## **Abreviaturas**

**ASAE** - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

**CC** - Curva de calibração

**CV AAS** - Espectrometria de absorção atómica – vapor frio

**EAA** - Espectroscopia de absorção atómica

**ESFA** - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

**FAAS** - Espectrometria de absorção atómica com atomização em chama

**GFAAS** - Espectrometria de absorção atómica em câmara de grafite

**IARC** - Agência Internacional para a pesquisa sobre o cancro

**ICP-MS** - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

**LOD** - Limite de deteção

**LOQ** - Limite de quantificação

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**TDI** - Dose tolerável diária

## **Objetivos**

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica que permitisse a determinação de níquel em fórmulas alimentares para crianças por espectrometria de absorção atômica em câmara de grafite.

Após a validação da metodologia, foi identificado e quantificado o níquel em fórmulas alimentares para crianças, tendo também sido avaliado o risco para esta sub-população.

# **I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1.1 Introdução

Ao longo dos últimos anos, o crescente aumento da população tem levado a um aumento da procura de alimentos. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento da agricultura e de novas técnicas para que a sua produção satisfaça o seu consumo. Dependendo do local onde estes produtos são cultivados, existem algumas fontes de contaminação, como por exemplo zonas poluídas pelo tráfego automóvel, indústrias, fertilizantes químicos, uso de pesticidas, água contaminada, entre outros. Uma das contaminações que nos últimos anos tem sido muito estudada é precisamente a contaminação por metais pesados (Pacheco, 2015; Siqueira, 2017).

Os metais pesados são os agentes tóxicos mais conhecidos pelo homem e necessitam de uma maior preocupação devido à sua alta toxicidade (mesmo que as concentrações sejam baixas), e às suas características bioacumulativas no organismo, acrescentando ainda a sua persistência e a permanência no ambiente, por longos períodos de tempo (Rocha, 2009; Mesquita, 2014).

Desde o nascimento e especialmente nos primeiros 2 anos de vida, deve-se ter um cuidado redobrado com a alimentação da criança, pois este será um período decisivo para o crescimento e desenvolvimento da mesma. Se não for devidamente cuidada, a longo prazo, poderá ter repercussões na vida do indivíduo (Monte e Giugliani, 2004; Rodrigues, 2017).

Nos últimos 20 anos, foram adquiridos novos conhecimentos sobre a alimentação infantil, resultando em mudanças significativas na alimentação das crianças. As atuais necessidades recomendadas são menores que as anteriores e alimentos complementares são inseridos em torno dos 4/6 meses de idade (Rodrigues, 2017).

O aleitamento materno é um componente importante na alimentação infantil e esse leite, isoladamente, tem a capacidade de nutrir adequadamente as crianças nos primeiros 6 meses de vida, sendo que após esse período deverá ser complementado com outro tipo de alimentos (Monte e Giugliani, 2004).

A alimentação complementar é definida como um processo onde os alimentos e líquidos são introduzidos, como consequência do leite materno se começar a tornar insuficiente para satisfazer as necessidades nutricionais dos bebés. Assim, torna-se necessária a inserção de outros alimentos e líquidos indispensáveis à alimentação. Segundo a OMS, a alimentação complementar deve ser: oportuna para que os alimentos sejam inseridos apenas quando a

alimentação já não suprima as necessidades de energia e nutrientes; adequada, de modo a fornecer as quantidades de macro e micronutrientes que a criança requer; apropriada, na medida em que os alimentos devem existir em quantidades suficientes e dos diversos grupos alimentares; segura através da limpeza de utensílios e equipamentos; e responsiva, garantindo que o método de alimentação é adaptado à idade da criança (Rodrigues, 2017).

As crianças constituem o grupo populacional mais vulnerável e estão expostas a cerca de 70.000 poluentes, dispersos no ambiente. A vulnerabilidade destas é justificada pelo facto das vias metabólicas, nos primeiros anos de vida, serem imaturas, não apresentando tanta facilidade em metabolizar e excretar os poluentes que se acumulam no organismo. Comparativamente com um indivíduo adulto, respiram mais ar/Kg de peso, ingerem mais alimentos e bebem mais água/leite facilitando a exposição a elementos patogénicos através dos alimentos, água e ar. Uma alimentação pouco segura pode provocar danos irreversíveis na sua saúde (Alvito, Martins, Vasco, 2014; Behrman, 2011; Félix, 2001).

A população moderna é cada vez mais tentada a consumir produtos e serviços em relação dos quais pouco ou nada se sabe. As empresas procuram o lucro, acabando assim por expor o consumidor a vários riscos. Na sua base, os alimentos são constituídos por elementos essenciais: vitaminas, sais minerais, fibras, entre outros, podendo vir em acréscimo outros elementos, que não deveriam fazer parte desta constituição. Estes elementos estando presentes podem vir a manifestar danos para a saúde do indivíduo, como é o caso de microrganismos patogénicos e/ou substâncias químicas tóxicas (Santos, 2009).

A agência internacional para a pesquisa sobre o cancro (IARC) classifica o níquel como carcinogénico para o Homem, sendo que já existe evidência científica (International Agency for Research on Cancer, 2012). Através da legislação que visa proteger e assegurar que os alimentos consumidos são saudáveis, estes elementos devem ser controlados e fiscalizados de forma a garantir a proteção eficaz da saúde dos lactentes e das crianças jovens. O caso do níquel, é ainda um caso complexo na medida que este ainda não possui valores máximos permitidos. No entanto, é necessário reunir mais informações sobre a sua concentração, toxicocinética (absorção, distribuição, biotransformação e excreção), assim como o risco real a que a população estará exposta no caso de consumo deste elemento. Posto isto, torna-se essencial uma avaliação de risco para averiguar os efeitos adversos deste metal. A EFSA, inclusive, já propôs um dose tolerável aceitável (TDI) de 2,8 µg/Kg por peso corporal para este metal (EFSA, 2015; Santos, 2009).

Nos últimos anos vários estudos epidemiológicos demonstraram que a exposição humana ao níquel traduz-se principalmente em problemas do foro respiratório, como cancro do pulmão, laringe e nasal. No entanto, além da origem antropogénica, cuja concentração aumenta com o crescimento da população e das emissões agrícolas e industriais, a principal forma de entrada destas substâncias tóxicas permanentes é através da cadeia alimentar, sendo um constituinte natural da superfície terrestre, não vital para as funções humanas (Miceli, 2015).

Num estudo epidemiológico, realizado em 1958, numa refinaria de níquel, verificou-se que os trabalhadores expostos apresentavam um risco 150 vezes maior de terem cancro nas vias respiratórias do que aqueles que não se encontravam expostos. Em 2004, um outro estudo relata a ocorrência de dermatite endógena induzida pela ingestão de alimentos com níquel. Foi também observado por vários autores, que as metodologias de processamento e confeção dos alimentos podem estar na origem de valores elevados de níquel nos alimentos (Miceli, 2015; Ventura *et al.*, 2016; Tavares, 2010).

## **1.2 Alimentos para crianças**

O leite materno é referido como sendo a melhor fonte de nutrição para bebés, contendo os nutrientes, hormonas e anticorpos necessários para garantir ao bebé tudo o que necessita para o seu bem-estar. As fórmulas para lactentes utilizam-se em alternativa e/ou substituição do leite humano quando as mães se tornam incapazes ou optam por não amamentar. Esta torna-se uma hipótese viável para a alimentação do bebé continuar a ser completa. Estas fórmulas são confeccionadas de forma a se assemelharem o mais possível ao leite materno, garantindo a adequada composição nutricional e a segurança dos alimentos. Como desvantagem esta forma de alimentação não contém todos os fatores protetores encontrados no leite humano (Organização Mundial de Saúde, 1981).

A introdução de alimentos na dieta da criança, após os 6 meses, deve ser complementar ao leite materno. A alimentação complementar funciona como um processo adaptativo, aproximando a criança a novos hábitos alimentares, introduzindo e apresentando novos sabores, cores, aromas e texturas. Começam ser introduzidos alimentos como a carne (aves, borrego), frutas, vegetais e legumes (Ministério da Saúde, 2009; Pina, 2011). Os 6 meses de idade tornam-se a altura ideal pois a criança já se encontra com reflexos necessários para a deglutição; já manifesta exaltação quando vê o alimento; sustenta a cabeça; e começa a

aparecer a primeira dentição, o que facilita a mastigação e desenvolvimento do paladar. É necessário ainda garantir que a alimentação complementar fornece as quantidades necessárias de água, energia, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais para suprir todas as necessidades, sendo também agradável ao paladar da criança (Ministério da Saúde, 2009).

Cerca de 70% das crianças, em algum momento da sua vida, são alimentadas através de fórmulas infantis e cerca de 60% das crianças europeias sofrem a inserção destas fórmulas antes dos 6 meses de vida (Associação Nacional da Indústria de Alimentação Infantil e Nutrição Especial, nd).

Atualmente existe uma grande variedade de produtos alimentares comercializados e, como já referido, é necessário que a composição destes seja adequada às necessidades de lactentes e crianças. Assim, de forma a garantir a saúde deste grupo tão vulnerável, surgiram diretivas nos países europeus, revogadas agora por um regulamento (Regulamento (UE) n.º609/2013) que “estabelece requisitos gerais em matéria de composição e informação para diferentes categorias de alimentos, incluindo fórmulas para lactentes e fórmulas de transição” (Parlamento Europeu e do Conselho, 2013). Estes alimentos passam a ter de cumprir critérios rigorosos de controlo microbiológico e químico, de forma a garantir níveis máximos tão baixos quanto possível. A produção de alimentos destinados a bebés, passa a apresentar um grande desafio para os produtores, pois os resíduos tóxicos que podem resultar do cultivo ou da produção devem ser controlados e reduzidos ao máximo (Pina, 2011).

Os metais pesados, cujas concentrações nestes alimentos são influenciadas pelo cultivo, pela contaminação ambiental, assim como por possíveis contaminações de produção e de processamento, tornando a ingestão dos alimentos numa importante via de exposição aos metais pesados. Estes são mais difíceis de regular na medida que são mais suscetíveis a variações (Pina, 2011; Martins, Mercês, Alvito, 2009).

Como qualquer problemática que envolve perigos para a saúde humana e para o ambiente, as pessoas começam a ter consciência e a manifestar-se no sentido de abrir o leque a outras opções: produtos de origem biológica. A tomada de consciência tem promovido um aumento na procura destes produtos que são, alegadamente, menos prejudiciais ao ambiente e saudáveis para o ser humano (Martins, Mercês, Alvito, 2009).

### 1.3 Metais pesados

Entende-se por metais pesados o grupo de elementos que aparecem de forma natural, em pequenas concentrações, com uma densidade igual ou superior a  $5\text{g cm}^{-3}$  ou cujo número atômico é superior a 20. Alguns destes metais são causadores de intoxicações, nomeadamente, alumínio, cádmio, chumbo, mercúrio, níquel, entre outros, que alteram a estrutura celular e substituem metais co-factores de atividades enzimáticas (Lopes, 2014; Tavares, 2010).

As formas mais comuns de contaminação por metais pesados no ambiente são: a indústria, agropecuária, a utilização de fertilizantes e pesticidas, entre outros, que deste modo se incorporam nos solos, ar, água e conseqüentemente alteraram a cadeia trófica, chegando assim ao indivíduo e ao meio ambiente pela inalação de poeira e do consumo de água e alimentos contaminados por metais (Londoño Franco, Londoño Muñoz, Muñoz Garcia, 2016; Miceli, 2015; Tavares, 2010).

Mercúrio, cádmio, chumbo, arsênio, manganês, tálio, crómio, níquel, selênio, telúrio, antimônio, berílio, cobalto, molibdênio, estanho, tungstênio e vanádio são inseridos na lista de elementos que são considerados tóxicos para o ser humano. Alguns destes elementos, em pequenas concentrações, são essenciais. No entanto, muitos deles têm relevante interesse no ponto de vista toxicológico. Os elementos reagem com macromoléculas e com ligantes presentes nas membranas, sendo quimicamente reativos, provocando um efeito de bio-magnificação e bioacumulação, sendo dificilmente eliminados do organismo e persistindo assim no indivíduo (Tavares, 2010).

Normalmente, os metais pesados têm tendência a acumular-se na camada mais superficial do solo, camada essa que se encontra acessível para as raízes das plantas. Tendo em consideração que são de baixa mobilidade e persistentes ao longo do tempo, estes podem manter-se no solo ou serem absorvidos pelas plantas e assim incorporados neste sistema. A quantidade de metais encontrados é frequentemente mais significativa em zonas urbanas do que em zonas mais rurais, onde o tráfego rodoviário não está tão presente e não existem grandes emissões industriais. O cobre, magnésio, zinco e níquel são exemplos de elementos essenciais para o normal desenvolvimento das plantas, sendo que, como já referido, são necessárias ter sempre em conta as concentrações (Lopes, 2014).

Aproximadamente 90% da exposição humana de metais e outros contaminantes é feita através do consumo de alimentos (Virga, Geraldo, Santos, 2007).

## **1.3.1 Níquel**

### **1.3.1.1 Características principais**

O níquel é um elemento químico, de símbolo Ni, sendo o 28º elemento da tabela periódica e o 24º metal em abundância na crosta terrestre. Caracteriza-se pela cor prateada, brilhante, muito dúctil e maleável. Existe na natureza em partículas insolúveis, fumos e poeiras, como sulfetos, óxidos e silicatos de níquel, ou em compostos de níquel solúveis em água, como o acetato, cloreto e sulfato de níquel (Miceli, 2015; Pires, 2017; Mesquita, 2014).

O níquel é amplamente utilizado na indústria, devido às várias propriedades que possui como a baixa condutividade térmica e elétrica, alta resistência à corrosão e oxidação, resistência e dureza em temperaturas elevadas e capacidade de magnetização (Miceli, 2015; Pires, 2017; Mesquita, 2014).

### **1.3.1.2 Fontes de níquel e suas aplicações**

O níquel encontra-se amplamente distribuído na natureza, nomeadamente no solo, água e ar, representando 0,008% da crosta terrestre. Pode também encontrar-se na atmosfera, em poeiras provenientes de emissões vulcânicas e da erosão das rochas e do solo (Pires, 2017).

O níquel é utilizado na produção de ligas, fabricação de aço inoxidável, indústria de galvanoplastia, fabricação de baterias, produtos de petróleo, fertilizantes e ferro fundido de níquel que posteriormente vai incluir-se na composição de ferramentas, máquinas, utensílios domésticos entre outros. Ao ser combinado com outros metais, forma ligas altamente resistentes a altas temperaturas e à corrosão podendo, por exemplo, ser utilizado na cunhagem de moedas e fabricação de jóias (Miceli, 2015; Mesquita, 2014).

### **1.3.1.3 Exposição ao níquel**

Como já referido anteriormente, a principal via de exposição ao níquel é pelos alimentos, podendo também entrar no organismo por inalação ou por absorção dérmica.

Alguns dos alimentos em que o níquel se encontra presente são: flocos de aveia, caju torrados, cacau, chocolate, chá preto, avelãs, produtos de soja, legumes, entre outros

(Tabela I) e consumindo este tipo de alimentos em maiores quantidades pode aumentar-se a ingestão diária deste elemento até 900 mg (Carrapatoso et al., 2004).

**Tabela I.** Alimentos com teor em níquel que podem agravar a dermatite induzida pela ingestão de níquel (Carrapatoso et al., 2004).

<b>Fruta fresca:</b>
Peras, cerejas, pêssegos, bananas;
<b>Todos os frutos secos e passas de frutas.</b>
<b>Leguminosas:</b>
Soja, amendoim, ervilhas e feijões;
<b>Verduras/hortícolas:</b>
Espargo, salsa, cebola, alface, cogumelos, couves, espinafres, tomates;
<b>Todos os cereais.</b>
<b>Produtos lácteos:</b>
Soro lácteo, queijos, margarina;
<b>Peixes:</b>
Arenque, atum, sardinha, cavala;
<b>Crustáceos:</b>
Lagosta, camarão, caranguejo, ostras, mexilhão;
<b>Molhos:</b>
Ketchup, vinagre, soja;
<b>Bebidas:</b>
Café, chá, cacau, sumos de frutas (sobretudo de frutos ácidos), vinho, cerveja;
<b>Outros alimentos:</b>
Fermento em pó, alimentos enlatados, vegetais conservados, todos os alimentos cozinhados em utensílios de níquel.

No entanto, o níquel não apresenta apenas um potencial tóxico. Em alguns organismos vivos é um elemento essencial, sendo que plantas, bactérias e eucariotas são os principais beneficiados com a sua presença (Pires, 2017; Mesquita, 2014).

Nas plantas, o teor normal de níquel estabelece-se de 1 a 10 mg/Kg de matéria seca e o nível considerado crítico, em plantas sensíveis, é 10 mg/Kg. Os efeitos tóxicos nas plantas envolvem a inibição de atividades mitóticas e enzimáticas, a redução no crescimento da planta, a interferência na absorção de outros metais e a indução de stress oxidativo (Pacheco, 2015).

Para além de ainda não estar confirmado, estudos em animais relatam que o níquel pode ser benéfico para funções reprodutivas, composição e força óssea, metabolismo energético e função sensorial (Pires, 2017; Mesquita, 2014).

Na saúde humana os principais efeitos divulgados são alergias induzidas por níquel (dermatite), carcinogénese (que demonstra muito baixa ou nenhuma mutagenicidade na maioria dos ensaios realizados para o efeito), doenças respiratórias, cardiovasculares e renais (Pires, 2017; Mesquita, 2014).

A extrapolação de resultados de experimentação animal para o homem, sugere que a ingestão necessária para produzir efeitos tóxicos no homem rondaria os 250 mg de níquel solúvel por dia. Por outro lado, em indivíduos sensíveis, uma dose oral de 300 µg de níquel é suficiente para provocar uma reação cutânea (Pires, 2017; Mesquita, 2014).

#### **1.4 Legislação**

Atualmente, 65 milhões de europeus sofrem de alergia ao níquel. Em 1994, de forma a combater esta problemática, o Parlamento Europeu e o Conselho Europeu, emitiram uma diretiva apelidada como “Diretiva do Níquel” (Diretiva 94/27/CE), onde acrescentam este elemento à lista de substâncias perigosas e se impõe restrições à comercialização e utilização do níquel na União Europeia (Pires, 2017).

Até há poucos anos, o níquel tinha pouco ou nenhum controlo, tendo assim surgido a necessidade de criar regulamentação para o controlo e proteção do homem, uma vez que é um metal bastante abundante na superfície terrestre. Encontra-se presente em muitos alimentos e águas por contaminação natural e/ou antropogénicas. Em 2016, surge a Recomendação (UE) 2016/1111 da Comissão, que obriga todos os estados-membros da UE, os operadores de empresas do sector alimentar e outras partes interessadas a proceder à monitorização da presença de níquel nos alimentos. Como este regulamento, surgiu também o parecer científico sobre os riscos para a saúde pública relacionados com a presença de níquel em alimentos e água, identificando-se assim toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento, como o efeito crítico na caracterização dos riscos de exposição ao níquel (Comissão Europeia, 2015; Pires, 2017).

Como os dados referentes a este metal ainda são reduzidos, insuficientes e não representativos, não existem níveis máximos para níquel em alimentos. No entanto, segundo a opinião científica emitida pela EFSA, para o consumo de água e águas minerais naturais, o nível máximo deve ser de 20 µg/L, levantando assim, potenciais preocupações para a saúde devido aos níveis atuais de exposição ao níquel (EFSA, 2015).

Tendo em conta esta problemática, são já vários os estudos que apontam o níquel como um elemento presente em alguns fertilizantes e no solo (Rodak *et al.*, 2015; Viñas, Pardo-Martinez, Hernández-Córdoba, 2000).

Para a sua monitorização, foram definidos alguns grupos de alimentos com maior potencialidade de conterem uma quantidade de níquel significativa, constando entre eles, cereais e produtos à base de cereais, fórmulas infantis e fórmulas de transição, alimentos à base de cereais processados para lactentes e crianças pequenas e alimentos para fins médicos especiais destinados especificamente a lactentes e crianças pequenas (Eurofins, nd).

Segundo o Regulamento (UE) n°609/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, Capítulo I, Artigo 1º, são definidas as seguintes categorias de alimentos (Tabela 2):

**Tabela 2.** Definições presentes no Artigo 2.º do Regulamento (UE) n.º609/2013.

<b>Lactente:</b>	“Uma criança com idade inferior a 12 meses.”	
<b>Criança pequena:</b>	“Uma criança com idade entre um e três anos.”	
<b>Fórmula para lactentes:</b>	“Alimento destinado a lactentes durante os primeiros meses de vida e que satisfazem os requisitos nutricionais desses lactentes até à introdução de alimentação complementar adequada.”	
<b>Fórmula de transição:</b>	“Alimentos destinados a lactentes quando é introduzida uma alimentação complementar adequada, que constituem o componente líquido principal de um regime alimentar progressivamente diversificado desses lactentes.”	
<b>Alimentos transformados à base de cereais:</b>	Destinados a satisfazer as necessidades particulares de lactentes saudáveis aquando do seu desmame e de crianças pequenas saudáveis como suplemento do seu regime alimentar e/ou para sua adaptação progressiva a alimentos correntes, e:	
	- Que pertençam a umas das 4 categorias seguintes:	- Cereais simples que são ou devem ser reconstituídos com leite ou outros líquidos nutritivos adequados.
		- Cereais a que se adicionam alimentos com elevado teor de proteínas, a reconstituir com água ou outros líquidos desprovidos de proteínas.
		- Massas a utilizar após a cozedura em água ou noutros líquidos apropriados.
	- Tostas e biscoitos, a utilizar diretamente, ou, após trituração, com água, leite ou outros líquidos apropriados.	
<b>Alimentos para bebés</b>	Alimentos destinados a satisfazer as necessidades particulares de lactentes saudáveis quando do seu desmame e de crianças pequenas saudáveis como suplemento do seu regime alimentar e/ou para a sua adaptação progressiva a alimentos correntes, excluindo:	-Alimentos transformados à base de cereais.
		-Bebidas lácteas e produtos semelhantes destinados a crianças pequenas.
<b>Alimentos para fins medicinais específicos</b>	Alimentos especialmente transformados ou compostos e destinados a satisfazer os requisitos nutricionais de pacientes, incluindo lactentes, e para consumo sob supervisão médica. Destinam-se à alimentação exclusiva ou parcial de pacientes, com capacidade limitada, diminuída ou alterada para ingerir, digerir, absorver, metabolizar, ou excretar alimentos correntes ou alguns dos nutrientes neles contidos ou metabolitos, ou cujo estado de saúde determine requisitos nutricionais particulares que não possam ser satisfeitas por uma modificação do regime alimentar normal.	

Este regulamento aborda, sobretudo, as fórmulas infantis e fórmulas subsequentes de forma a garantir a saúde e segurança dos lactentes e crianças pequenas. Nele estão ainda inseridos os requisitos gerais da composição e rotulagem destes produtos, acrescentando que a Comissão deverá adotar medidas de maneira a restringir e proibir o uso de pesticidas nestas fórmulas. No entanto, foi fixado um limite de resíduo (0,01 mg/Kg) para todos os pesticidas, não os especificando na composição das suas fórmulas nem a sua toxicidade (Parlamento Europeu e do Conselho, 2013).

O níquel na alimentação ainda não faz parte da legislação de muitos países, no entanto o Brasil já é um dos países que se encontra na linha da frente na prevenção do níquel. Para além dos diversos estudos já realizados em alimentos, também já possuem um limite máximo legislado de 5,00 mg/L para este elemento (Miceli, 2015).

Por outro lado, em Portugal, a diretiva sobre a qualidade da água destinada ao consumo humano estabelece um valor paramétrico de 0,002 mg/L partindo do pressuposto que um adulto de 60 Kg bebe 2 litros de água (EFSA, 2015).

## **1.5 Metodologias analíticas para a determinação de metais**

Devido ao avanço da tecnologia, são vários os métodos analíticos que poderão ser utilizados para a deteção de metais, como por exemplo: métodos gravimétricos, potenciométricos e espectrofotométricos de absorção, entre outros. No entanto, todos eles exigem tempo e recursos humanos intensivos. Hoje em dia existe uma gama mais extensiva de métodos analíticos mais rápidos e mais sensíveis, entre os quais a espectrometria de absorção atómica, chama (FAAS) ou câmara de grafite (GFAAS), com gerador de hidretos (HGAAS), a espectrometria de emissão com plasma indutivo (ICP-AES), a espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS), entre outros (Martins, Mercês, e Alvito, 2009).

Os métodos analíticos referidos anteriormente utilizam equipamentos de elevado custo, poupando recursos humanos na medida em que a maior parte do processo é automatizado e permitem a utilização de reagentes aumentando a sensibilidade.

Na escolha do método analítico deve-se ter em consideração o tipo de informação que se pretende obter:

- A quantidade de amostra disponível e a proporção dos constituintes a analisar;
- A exatidão e a precisão do método analítico;

- As interferências analíticas e o seu controlo;
- As possíveis contaminações que os elementos podem ter e/ou sofrer;
- O tempo e custo de análise.

Nem todos os métodos analíticos são iguais e cada um possui um campo de aplicabilidade diferente, mais ou menos específico, sendo necessário que antes de qualquer utilização, seja necessário o conhecimento do mesmo, dos princípios dos fenómenos físicos presentes, vantagens e desvantagens e as limitações de modo a criar condições ótimas para a sua aplicação no estudo (Pires, 2017; Tavares, 2010).

A espectrometria de absorção atómica é uma técnica analítica muito utilizada na determinação de metais que se encontrem em concentrações vestigiais devido à sua elevada especificidade e sensibilidade, recorrendo à absorção de radiação pelos átomos no seu estado gasoso. Como em todos os métodos este também apresenta limitações, como por exemplo, a interferência de outros elementos dissolvidos. No entanto, este método aplica-se melhor a soluções em estado líquido, sendo que, caso isto não se verifique, a amostra tem de sofrer vários procedimentos (Tavares, 2010).

É uma técnica de análise quantitativa e usa o princípio da absorção de radiação ultravioleta pelos átomos no seu estado atómico livre, permitindo-lhe assim que estes absorvam a radiação, passando para um estado excitado, denominando-se assim absorção atómica. Através da quantidade de radiação absorvida pode medir-se e determinar-se quantitativamente o elemento que está presente. Para que este processo seja realizado é necessária uma lâmpada. A energia emitida pela lâmpada só vai ser absorvida pelos átomos do elemento da lâmpada em questão (Costa, 2013; Sá, 2014).

Para a espectrometria de absorção atómica, as lâmpadas normalmente utilizadas são as lâmpadas de cátodo oco, existindo também as lâmpadas de descarga sem eléctrodos. Normalmente para cada elemento é preciso uma lâmpada específica, constituída por 2 eléctrodos que se encontram no interior de uma ampola de vidro que contém um gás essencial para o funcionamento das mesmas, normalmente árgon (Tavares, 2010; Sá, 2014).

Para todo este processo ser concretizado é necessária uma fonte de atomização, ou seja, é necessário converter a amostra em átomos livres, podendo-se utilizar a atomização por chama, atomização sem chama (câmara de grafite) ou atomização por plasma acoplado por indução (Tavares, 2010; Sá, 2014).

### **1.5.1 Espectrometria de Absorção atômica com câmara de grafite**

Uma das técnicas mais utilizadas para a determinação quantitativa de metais é a espectrometria de absorção atômica em câmara de grafite (Nunes, 2009). Nesta metodologia analítica, a amostra deve estar preferencialmente no estado líquido para ser introduzida no forno de grafite e sujeita a um aquecimento progressivo previamente programado, no entanto, amostras sólidas e suspensões também poderão ser analisadas por este processo. A temperatura a utilizar vai depender do elemento em estudo e da matriz da amostra, sendo necessário vários ensaios para perceber qual a temperatura ideal. O próprio equipamento já possui um “cookbook” onde estão descritas as temperaturas consideradas ideais, podendo ser necessário ajustar, para garantir bons resultados para a precisão e exatidão. A grafite é utilizada para material de construção das câmaras devido à sua alta condutividade elétrica e resistência a temperaturas elevadas (Costa, 2013).

O processo consiste nas seguintes etapas:

- Secagem;
- Pirólise;
- Atomização;
- Limpeza.

A etapa de secagem consiste na passagem do fluxo de gás inerte (árgon) através do tubo para uma secagem rápida e suave da amostra. A evaporação do solvente deverá ser feita de um modo suave para garantir que não hajam projeções da amostra e assim não se perca conteúdo. Na etapa de pirólise ocorre um aumento de temperatura para não perder o elemento a analisar e o árgon passa através do tubo para eliminar vapores de constituintes de matriz ou fumos. Para a atomização, a temperatura também aumenta, tão alta quanto possível para conduzir a uma máxima atomização do elemento; o fluxo do árgon é interrompido, na medida em que reduz o tempo de residência dos átomos no tubo de grafite e conseqüentemente a sensibilidade do método. Por fim, a etapa de limpeza serve apenas para a eliminação de vapores para se proceder à próxima análise sem contaminações (Soares, 2012; Costa, 2013).

Geralmente associados a alguns elementos, temos de inserir também modificadores de matriz, que são consideradas substâncias que têm a função de alterar as propriedades - seja do analito seja da matriz - com o objetivo de tornar o analito menos volátil e permitir que as

temperaturas de pirólise sejam elevadas, evitando a interferência de outros elementos associados ao elemento em estudo (Costa, 2013).

A técnica mais eficaz para a determinação de metais em quantidades vestigiais é a espectrometria de absorção atômica, sendo que dentro desta pode-se ainda escolher entre a chama e a câmara de grafite. Como em todos os métodos existem vantagens e limitações para cada um (Tabela 3) (Costa, 2013).

**Tabela 3.** Comparação entre espectrometria de absorção atômica com chama e com câmara de grafite (Costa, 2013).

<b>EAA Chama</b>	<b>EAA câmara de grafite</b>
Apenas aplicado em líquido	Sensibilidade cerca de 100 a 1000x maior
O volume utilizado é superior ao utilizado na câmara de grafite	Volumes muito mais pequenos (10 – 20 µl)
Mais rápido	Permite a determinação diretamente em amostras sólidas
Boa precisão	Equipamento mais dispendioso

## 1.6 Comparação entre as metodologias analíticas

A literatura científica reporta várias formas de aplicação da espectrometria de massa, dando mais ênfase à espectrometria de massa com atomização em chama e à de massa em câmara de grafite para a determinação de quantidades vestigiais de metais em matrizes alimentares, sendo o grupo dos vegetais aquele que merece mais destaque (Pires, 2017).

Dada a diversidade das amostras alimentares estudadas torna-se difícil a sua comparação. No entanto, através do método ICP-MS foram analisadas fórmulas infantis e alimentos infantis em que o limite de deteção para as fórmulas foi inferior a 0,5 mg/L, não definido limite de quantificação. Para os alimentos infantis não foi definido um limite de deteção, mas um limite de quantificação de 0,080 mg/Kg. Por FAAS foram analisados sumos de fruta com um limite de deteção de 0,2 mg/L; e por GFAAS tecido vegetal, leite em pó e cogumelos com limites de deteção 0,098 mg/Kg, 0,085 mg/L e 0,063 mg/L, respectivamente, e limites de quantificação de 0,217 mg/Kg, 0,283 mg/L e 0,208 mg/L, respectivamente. Para todos os estudos, as percentagens de recuperação encontram-se em valores acima dos 90%, não sendo estas boas percentagens, tendo em conta as grandezas em que estamos a trabalhar (Tabela 4) (EFSA, 2015).

São várias as técnicas analíticas que são utilizadas variando entre espectrometria de absorção atômica (câmara de grafite, chama, plasma), espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivo e espectrometria de massa de plasma acoplado indutivo. Na opinião científica da EFSA é referido que os valores encontrados variaram entre 0,02 mg/Kg para ETV-ICP-MS, 0,29 mg/Kg para chama e 0,000006 mg/Kg para espectrometria de massa de plasma acoplado indutivo. Existe ainda um método padronizado europeu para a determinação de níquel apenas em gorduras animais e vegetais e óleos por espectrometria de massa de absorção atômica em câmara de grafite em que o valor detetado foi < 0,25 mg/Kg (EFSA, 2015).

**Tabela 4.** Metodologias analíticas utilizadas na determinação de níquel em alimentos.

<b>Metodologia analítica</b>	<b>Matriz</b>	<b>Limite de detecção (LOD)</b>	<b>Limite de quantificação (LOQ)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
ICP-MS	Fórmulas infantis	<0,50 mg/L	Nd	Nd	(Ikem <i>et al.</i> , 2002)
ICP-MS	Alimentos infantis	Nd	0,080 mg/Kg	92%	(Zand <i>et al.</i> , 2012)
FAAS	Sumos de frutas	0,2 mg/L	Nd	95 - 102%	(Campos <i>et al.</i> , 2010)
CV AAS	Peixes do Rio Sorocaba	<0,1 mg/Kg	Nd	Nd	(Castro, 2002)
GFAAS	Tecido vegetal	0,098 mg/Kg	0,217 mg/Kg	95%	(Lima, 2011)
GFAAS	Leite em pó	0,085 mg/L	0,283 mg/L	Nd	(Filho e Mainier, nd)
GFAAS	Cogumelos	0,063 mg/L	0,208 mg/L	Nd	(Figueiredo, 2007)

**Legenda:** Nd – Não definido

## 1.7 Ocorrência de níquel em alimentos

Na literatura já foram relatados outros casos de ocorrência de níquel em alimentos, sendo que as concentrações médias mais elevadas foram encontradas em alimentos como cogumelos silvestres comestíveis, cacau e produtos à base de cacau (> 10 mg/Kg de peso seco), feijão, sementes, nozes e grãos. Foram ainda determinados possíveis fatores que influenciam a concentração de níquel dos alimentos, por exemplo: o tipo de alimentos (grão, vegetal, etc...), as condições de crescimento (como já referido anteriormente, o tipo de solo de cultivo também poderá influenciar a contaminação do alimento) e as técnicas de preparação (EFSA, 2015).

Por Pandelova *et al.*, 2012, foi determinado o teor de níquel em 11 amostras combinadas de alimentos infantis mais consumidos da Europa durante os primeiros 9 meses de vida, onde se inclui fórmulas infantis, alimentos sólidos e bebidas, em 6 países diferentes (França, Alemanha, Itália, Portugal, Suécia e Reino Unido) e ainda, alimentos para bebés do cesto alimentar (entende-se como o conjunto formado pelos produtos utilizados por uma família durante 1 mês) de 4 países (Itália, Espanha, Eslováquia e Suécia), verificando-se que as concentrações variaram entre 0,1 a 1,3 mg/Kg (EFSA, 2015).

Na Croácia as concentrações de níquel em 72 amostras de leite variaram entre 0,072 a 0,097 mg/L (Vahčić *et al.*, 2010).

Em França os níveis de concentração média para cereais de pequeno-almoço detetados foram de 0,63 mg/Kg (Leblanc *et al.*, 2005), e para outros grupos no qual estavam inseridos os cereais e produtos à base de cereais foi detetado um valor de 0,155 mg/Kg (Noël *et al.*, 2012).

Sommella *et al.* (2013), analisou 101 amostras de 8 tipos diferentes de grãos de arroz italianos com umas concentrações médias entre 0,15 a 0,48 mg/Kg (EFSA, 2015).

Outro estudo realizado por Storelli (2009), foram estudados 15 peixes e 7 moluscos cefalópodes, capturados no sul do mar Adriático, verificaram-se as maiores concentrações de níquel para os moluscos com 2,12 mg/Kg contra 1,13 mg/Kg nos peixes. Para o carapau o valor médio detetado foi de 2,72 mg/Kg (EFSA, 2015).

Gastol e Domagala-Swiatkiewicz (2012), analisaram amostras orgânicas e convencionais de sumos de cenoura, aipo e beterraba vermelha variando os valores de contaminação entre 0,15 a 0,29 mg/Kg para as orgânicas e 0,14 a 0,22 mg/Kg para as convencionais. Para sumos

de maçã, pera e groselha preta variou entre 0,04 a 0,23 mg/Kg para as orgânicas e 0,06 a 0,22 mg/Kg para as convencionais. E aqui mais uma vez se demonstra que as amostras orgânicas apresentam uma faixa de concentração de níquel com valores mais elevados do que as amostras convencionais, indo de encontro aos resultados obtidos por este estudo (EFSA, 2015).

Em amostras de cereais (trigo, cevada e aveia), de 3 regiões da Eslováquia foram encontrados valores entre 0,07 a 4,25 mg/Kg (Mikuška *et al.*, 2008).

Em 144 amostras de vegetais, frutas e arroz, de 16 localidades da zona ribeirinha do rio Ebro, Catalunha, as concentrações médias variam entre <0,010 a 0,49 mg/Kg (EFSA, 2015).

Foram analisadas 223 amostras brasileiras de frutas (n=89), vegetais folhosos (n=34), vegetais verdes (n=74) e vegetais gerais (n=26) em que o níquel variou de não detetado (Nd) a 0,40 mg/Kg, de 0,07 a 0,70 mg/Kg, de 0,10 a 0,74 mg/Kg e de 0,06 a 0,47 mg/Kg, respetivamente. E em sumos (n=19) de 7 marcas diferentes, as concentrações variaram entre 0,0039 mg/L e 0,030 mg/L (Tormen *et al.*, 2011).

Apesar de não se encontrarem muitos estudos relacionados com o tema, o Brasil é o país que demonstra mais preocupação em relação ao tema, sendo que aplicam a espectrometria de massa principalmente para estudos de vegetais, frutas e cereais (EFSA, 2015). Em relação a Portugal foi encontrado apenas um único estudo relevante, em que é referido que os sumos de fruta são os que apresentam concentrações mais baixas e os bivalves as mais elevadas, sendo que estes valores variarem entre 0,0212 mg/Kg e 1,05 mg/Kg, respetivamente. Em produtos secos e os produtos com chocolate também foram encontrados valores consideráveis de níquel. Por outro lado, os alimentos que apresentam valores mais baixos foram as omeletes e as batatas confeccionadas. O níquel é detetado e quantificado em todos os grupos sendo que o grupo dos lacticínios e do pescado são os grupos que apresentam maior variabilidade. É ainda importante referir que a percentagem mais elevada de valores quantificáveis se verificou nas amostras constituídas por mais do que um elemento o que poderá ter sido associada à complexidade do processo culinário (Tabela 5) (Costa, 2013).

**Tabela 5.** Tabela de ocorrência de níquel em alimentos.

<b>Matriz</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>País</b>	<b>Frequência de contaminação</b>	<b>Intervalo de concentrações detetadas</b>	<b>Média das concentrações</b>	<b>Ano do estudo</b>	<b>Referências bibliográficas</b>
1. Farinha de trigo, 2. Pão francês, 3. Café, 4. Batata inglesa, 5. Tomate, 6. Banana caturra, 7. Arroz, 8. Feijão preto, 9. Carne, 10. Leite pasteurizado, 11. Óleo de soja, 12. Açúcar refinado, 13. Margarina com sal.	49	Brasil - Curitiba	Nd	1. 0,19 a 0,41 mg/Kg 2. Nd a 0,39 mg/Kg 3. 0,44 a 0,74 mg/Kg 4. Nd a 0,46 mg/Kg 5. Nd a 0,47 mg/Kg 6. 0,11 a 0,55 mg/Kg 7. 0,28 a 1,34 mg/Kg 8. 2,49 a 4,66 mg/Kg 9. 0,34 a 1,16 mg/Kg 10. 0,10 a 0,70 mg/Kg 11. Nd 12. Nd a 0,08 mg/Kg 13. 0,14 a 0,45 mg/Kg	1. 0,28 mg/Kg 2. 0,13 mg/Kg 3. 0,55 mg/Kg; 4. 0,15 mg/Kg; 5. 0,19 mg/Kg; 6. 0,34 mg/Kg; 7. 0,79 mg/Kg; 8. 3,49 mg/Kg; 9. 0,89 mg/Kg; 10. 0,43 mg/Kg; 11. Nd; 12. Nd; 13. 0,32 mg/Kg respectivamente	1995	(Elpo e Freitas, 1995)
Peixes do Rio Sorocaba	63	Brasil - São Paulo	Nd	0,2 a 2,2 mg/Kg	Nd	2002	(Castro, 2002)
Carne: 1. Carne branca; 2. Carne vermelha; 3. Charcutaria; Pescado: 4. Peixe magro; 5. Peixe Gordo; 6. Moluscos; 7. Bivalves;	1. 3 2. 4 3. 3 4. 168 5. 144 6. 36 7. 12	Portugal	50%  60%	0,0212 mg/Kg (sumos) e 1,05 mg/Kg (bivalves)	1. Nd 2. 0,0592 mg/Kg 3. 0,0633 mg/Kg  4. 0,0744 mg/Kg 5. Nq 6. Nq 7. 1,05 mg/Kg	2016	(Ventura et al., 2016)

**Tabela 5.** Tabela de ocorrência de níquel em alimentos f7 cbhbi U -ct

8. Crustáceos; Cereais e Derivados:	8. 12				8. 1,61 mg/Kg	
9. Arroz;	9.12	10%			9. 0,0848 mg/Kg	
10. Pão;	10. 12				10. 0,0839 mg/Kg	
11. Confeitaria sem chocolate;	11. 144				11. 0,0914 mg/Kg	
12. Confeitaria com chocolate;	12. 36				12. 0,622 mg/Kg	
Lactícínios:						
13. Leites;		20%			13. Nq	
14. Iogurtes;	13. 36				14. Nq	
15. Queijos;	14. 24				15. Nq	
Ovos;	15. 12					
16. Omelete;		50%			16. 0,0356 mg/Kg	
17. Mistura de Ovos;	16. 12				17. Nq	
Frutas:	17. 12					
18. Frutas frescas;		40%			18. 0,0545 mg/Kg	
19. Frutas enlatadas;	18. 312				19. 0,0484 mg/Kg	
20. Frutos secos;	19. 12				20. 0,751 mg/Kg	
21. Sumos;	20. 60				21. 0,0212 mg/Kg	
22. Compotas;	21. 12				22. 0,0924 mg/Kg	
Leguminosas:	22. 12					
23. Grãos;		20%			23. 0,357 mg/Kg	
Pratos compostos:	23.72				24. 0,0916 mg/Kg	
24. Pratos à base de carne, pescados ou mistos;		100%			25. 0,0455 mg/Kg	
25. Sopas;	24. 192				26. 0,0564 mg/Kg	
26. Saladas;	25. 36					
Tubérculos:	26. 12					
27. Batatas confeccionadas.	27. 48	25%			27. 0,0387 mg/Kg	

**Tabela 5.** Tabela de ocorrência de níquel em alimentos f7 cbh]bi U -ct

Cogumelos	37	Portugal	Nd	Nd	Nd	2007	(Figueiredo, 2007)
1. Cereais	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	1,12±0,51 mg/Kg (chapeús), 1,88±0,36 mg/Kg (pés); 73,98±39,59 mg/Kg (solos).	(Reilly, 1980)
2. Frutas							
3. Vegetais							
4. Carnes							
5. Produtos lácteos							
1. Fórmulas infantis	1. 30	1.UK	Nd	Nd	1. 0,0002 ± 0,0009 mg/L	Nd	(Ikem et al., 2002)
2. Fórmulas infantis	2. 15	2.USA			2. 0,00002 ± 0,0007 mg/L		

**Legenda:** Nd – Não definido; Nq – Não quantificado

Normalmente os teores mais altos de metais pesados tendem a encontrar-se nas folhas do vegetal, sendo que os vegetais de grandes folhas, como por exemplo a alface, tendem a apresentar teores mais elevados comparativamente a leguminosas e plantas de raiz tuberosa (Lopes, 2014).

A nível internacional já foram registados valores de contaminantes superiores em produção de origem biológica, no entanto, ainda são necessários desenvolver mais estudos sobre esta problemática (Martins, Mercês, Alvito, 2009).

Em Portugal, já se encontram alguns estudos, no entanto, é necessário continuar a investir nesta área, na medida em que cada vez temos mais níquel a infiltrar-se nos solos, devido à poluição e a ser absorvido pelas plantas, que conseqüentemente chega aos animais e ao Homem (Pacheco, 2015).

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

## Parte Experimental

### 2.1. Materiais e metodologia analítica

#### 2.1.1. Reagentes e Soluções

##### 2.1.1.1 Reagentes

- Ácido Nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 68% - superpure (Carlo ERBA, Milão, Itália);
- Água desionizada, purificada em sistema Milli-Q (Milli-Q Integral 10, Billerica, E.U.A);
- Níquel, concentração 1 000 mg/L (Merk, Alemanha).

##### 2.1.1.2 Soluções

- Solução de ácido nítrico a 0,5%, preparada através da dissolução de 14,71 ml de ácido nítrico 68% num balão volumétrico de 2000 ml, perfazendo com água Milli-Q;
- Solução padrão stock de níquel a 10 000  $\mu\text{g/L}$  preparada a partir da concentração inicial de 1 000 000  $\mu\text{g/L}$  num balão volumétrico de 100 ml. Retirou-se 1 ml da solução inicial e perpez-se com ácido nítrico a 0,5% num balão de 100 ml;
- Solução padrão de níquel, preparada com uma concentração de 100  $\mu\text{g/L}$  a partir da concentração de 10 000  $\mu\text{g/L}$ . Retirou-se 1 ml da solução de 10 000  $\mu\text{g/L}$  e perpez-se com ácido nítrico a 0,5% num balão de 100 ml;
- Prepararam-se várias soluções de níquel para a curva de calibração em padrão com as seguintes concentrações de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/L}$ .

#### 2.1.2 Material Utilizado

- Balões Volumétricos (5, 10, 50, 100, 2000 ml);
- Espátula;
- Cadinhos;
- Parafilm;
- Pipetas;
- Copos de Precipitação.

### **2.1.3 Equipamentos**

- Aparelho de ultrassonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha);
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285 (Columbus, Ohio, EUA);
- Banho de areia Falc BS70 (Treviglio, Itália);
- Mufla Selecta (Barcelona, Espanha);
- Espectrómetro de Absorção Atômica com câmara de Grafite, da marca Analytikjena, modelo ZEE nit 700 MPE 60 e com Hollow Cathode Lamp para o níquel, número de série HEIO429 (Jena, Alemanha).

## **2.2 Amostragem**

### **2.2.1 Recolha de amostras**

A recolha de amostras foi realizada durante os meses de fevereiro e março de 2018. Foi realizada em grandes superfícies comerciais, no distrito e concelho de Coimbra, selecionando diversas marcas, incluindo marcas brancas, e diferentes tipos de alimentos, ou seja, refeições prontas, smoothies/boiões de fruta, sobremesas e ainda farinhas lácteas. No total foram analisadas 85 amostras: 26 de refeições prontas (31%), 31 de smoothies/boiões de fruta (36%), 8 de sobremesas (9%) e 20 de farinhas lácteas (24%). Não foi feita a discriminação de amostras, ou seja, foram analisadas marcas brancas (31%) e marcas conhecidas (69%) assim, como amostras classificadas como biológicas (26%) ou não biológicas (74%). É de referir que a terminologia “biológica” ou “não biológica” é atribuída pela marca (Tabela 6). É ainda de salientar, que dentro das refeições prontas, 77% das amostras têm maioritariamente na sua composição carne, contendo também outro tipo de legumes na sua constituição; 11% contém apenas mistura de legumes; 8% sopas e 4% peixe.

**Tabela 6.** Lista de amostras.

<b>Refeições prontas</b>	<b>Marca</b>	<b>Tipo de Refeição</b>	<b>Especificações</b>	<b>Biológica</b>	<b>Marca branca</b>
Frutas variadas selecionadas 250 g	Nutribén – Bio Boiões	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Seleção de banana e maçã 130 g	Nutribén – Bio Boiões	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Pera, banana e kiwi bio	Holle	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Maçã e pera	Holle Boião	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Pera, pêsego, framboesas e trigo espelta	Holle Baqueta	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Puré de maçã e mirtilo biológico	Holle Boião	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Cenoura e frutos	Holle Saqueta	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Muesli e frutos biológicos	Holle Boião	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Pera, maçã e espinafres	Holle Saqueta	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	
Maçã e banana	Baby Bio	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	X
Pera Williams	Baby Bio	Boião/Saqueta Fruta	fruta	X	X
Banana laranja bolacha	Nestlé – NaturNes – Saqueta	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Maçã banana e aveia	Nestlé – NaturNes – Saqueta	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Frutas variadas	Nestlé	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Banana morango	Nestlé – Yogolino	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Maçã banana e morango	Nestlé – NaturNes Saqueta	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
100% pera	Blédina Frutapura Boião	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Maçã morango banana e cereja	Blédina – Saqueta	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Multifrutas com cereais 200 g	Nutribén	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Seleção de banana e maçã 200 g	Fruta & GO	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Banana, morango e iogurte natural	Fruta & GO	Boião/Saqueta Fruta	fruta		
Puré de fruta multifrutas	Continente – Purés de Fruta	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Puré Fruta banana / laranja / bolacha maria	Continente – Purés de Fruta	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Maçã e manga	Continente – Smoothie	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Puré de frutas	Baby Auchan – Jumbo	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Melancia melão	Pingo Doce	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Pera e maçã	Pingo Doce	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X

**Tabela 6.** Lista de amostras (Continuação).

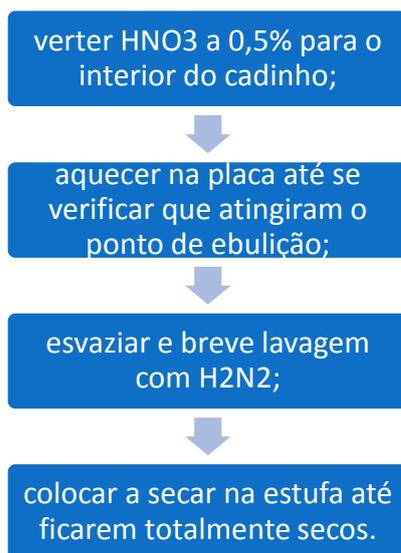
Pera, banana e cenoura	Hero Baby	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Maçã verde	Hero Baby	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Pêssego manga maçã	Humana	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Maça banana	Humana	Boião/Saqueta Fruta	fruta		X
Muesli	Holle	Farinha	láctica/não, láctea	X	
Aveia	Holle	Farinha	láctica/não, láctea	X	
Multicereais	Hero Baby	Farinha	não láctea	X	
1ª papa multifrutos	Nestlé – Cerelac	Farinha	láctica		
1ª papa milho e arroz	Blédina	Farinha	láctica		
8 cereais e 4 frutas	Nutribén	Farinha	láctica		
Primeira papa s/glúten (milho aveia)	Nutribén	Farinha	láctica		
logurte e 8 cereais	Nestlé – Cerelac	Farinha	não láctea		
Cerelac	Nestlé – Cerelac	Farinha	não láctea		
7 cereais e banana	Blédina	Farinha	não láctea		
Papa láctea	Milfarin	Farinha	láctica		
Farinha láctea maçã	Continente	Farinha	láctica		X
Farinha láctea	Baby Auchan – Jumbo	Farinha	láctica		X
Farinha láctea multifrutas	Baby Auchan – Jumbo	Farinha	láctica		X
Farinha láctea 5 frutos	Intermarché	Farinha	láctica		X
Farinha láctea de pera	Pingo Doce	Farinha	láctica		X
Cereal e mel	Continente	Farinha	não láctea		X
8 cereais e bolacha maria	Baby Auchan – Jumbo	Farinha	não láctea		X
Farinha não láctea bolacha Maria (250 g)	Intermarché	Farinha	não láctea		X
Farinha de trigo	Pingo Doce	Farinha	não láctea		X
Legumes da horta com peru 200 g	Nutribén Bio Boiões	Refeição pronta	carne	X	
Frango gourmet com arroz 250 g	Nutribén Bio Boiões	Refeição pronta	carne	X	
Puré de cenoura, batata e carne vaca biológica	Holle	Refeição pronta	carne	X	
Puré de carne de frango biológico	Holle	Refeição pronta	carne	X	
Puré de abobora, arroz integral e carne frango biológico	Holle	Refeição pronta	carne	X	

**Tabela 6.** Lista de amostras (Continuação).

Puré de abobora e arroz biológico	Holle	Refeição pronta	legumes	X	
Puré de mistura de legumes biológico	Holle	Refeição pronta	legumes	X	
Puré de brócolos com arroz integral	Holle	Refeição pronta	legumes	X	
Legumes da horta com frango	Nestlé	Refeição pronta	carne		
Legumes da horta com vitela	Nestlé	Refeição pronta	carne		
Guisado de borrego	Nestlé	Refeição pronta	carne		
Arroz com frango	Nestlé	Refeição pronta	carne		
Legumes e vitela	Blédina	Refeição pronta	carne		
Puré de batata com frango	Blédina	Refeição pronta	carne		
Cenouras com peru	Blédina	Refeição pronta	carne		
Estrufado de cenouras e carminha	Blédina	Refeição pronta	carne		
Legumes da horta com carminha	Blédina	Refeição pronta	carne		
Vitela com legumes	Nutribén	Refeição pronta	carne		
Frango com legumes	Nutribén	Refeição pronta	carne		
Frango com arroz	Nutribén	Refeição pronta	carne		
Frango e vitela com legumes	Nutribén	Refeição pronta	carne		
Legumes da horta com pescada	Nestlé	Refeição pronta	peixe		
Delícia de cenouras (sopa)	Blédina	Refeição pronta	sopa		
Seleção da horta (sopa)	Blédina	Refeição pronta	sopa		
Feijão verde e frango	Baby- Auchan	Refeição pronta	carne	X	
Pequenos legumes e vitela	Baby- Auchan	Refeição pronta	carne	X	
Ameixa maçã	Blédina – Frutapura Tacinha	sobremesa	sobremesa		
Blédi Cremoso pêssego & leite	Blédina	sobremesa	sobremesa		
Tacinha maçã e bolacha	Blédina	sobremesa	sobremesa		
Banana	Nestlé – Yogolino	sobremesa	sobremesa		
Bolacha maria	Nestlé – Yogolino	sobremesa	sobremesa		
Salada de frutas	Nestlé – Iogurtes NaturNEs	sobremesa	sobremesa		
Sobremesa láctea cremoso de morango	Jumbo	sobremesa	sobremesa	X	
Sobremesa láctea cremoso natural açúcarado	Jumbo	sobremesa	sobremesa	X	

## 2.3 Metodologia Analítica

A limpeza e descontaminação do material é de grande importância de forma a garantir que todo o material a usar se encontra livre de contaminações podendo assim enviar o estudo, por este motivo efetuou-se a limpeza dos cadinhos antes de qualquer ensaio (Figura 1). A água utilizada ao longo de todo este processo, seja para limpeza, seja para a preparação das soluções é água ultrapura (Milli-Q).



**Figura 1.** Processo de limpeza dos cadinhos.

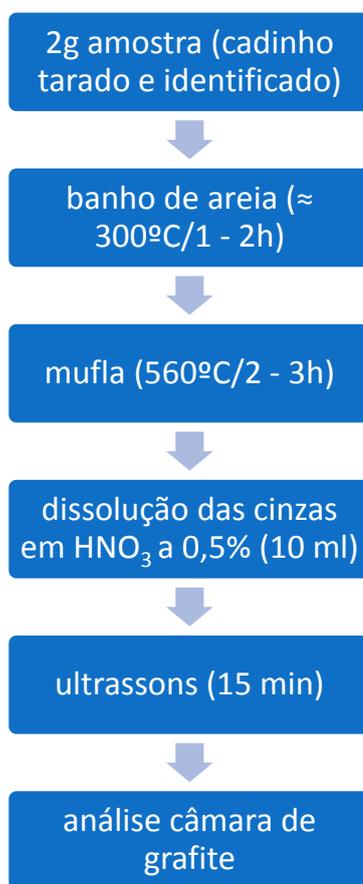
Utilizou-se 2 g de amostra, sendo a pesagem efetuada diretamente no interior de um cadinho, já tarado e identificado. Nas amostras fortificadas adicionou-se a quantidade padrão de níquel correspondente nesta fase. Após a pesagem das amostras, iniciámos o processo de mineralização por incineração, que segundo a revisão bibliográfica, é o processo mais comum para a análise de metais pesados. Neste passo toda a matéria orgânica foi digerida levando a uma completa mineralização. As amostras foram colocadas num banho de areia, a uma temperatura de 300°C, sensivelmente por 1h - 2h, de forma a que a amostra tivesse uma cor visivelmente preta e já não emitisse fumos. Passado este processo, as amostras seguiram para a mufla, a uma temperatura de 560°C durante sensivelmente 2h - 3h, de forma a que no final, a amostra tivesse sido convertida a cinzas brancas. É importante referir que todas as amostras foram realizadas em duplicado, de forma a comparar os resultados obtidos.

No final deste processo, seguiu-se a dissolução das cinzas obtidas em HNO<sub>3</sub> a 0,5% num balão volumétrico de 10 ml. O processo de dissolução é feito de forma gradual, de forma a

que todo o conteúdo presente no cadinho seja dissolvido e arrastado para o balão volumétrico) (Parreira, 2012).

Procedeu-se ,de seguida, à homogeneização no ultrassom; e cada amostra foi devidamente identificada e guardada no frigorífico, a uma temperatura de 2° - 8°C até a análise.

A amostra devidamente preparada, como descrito anteriormente, é inserida numa pequena cuvete e segue posteriormente para o auto-analisador do equipamento de espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite, sendo injetados 10 µL na câmara de grafite (Figura 2).



**Figura 2.** Preparação da amostra.

Na espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite utilizaram-se temperaturas de secagem de 90°C até 110°C, de pirólise de 1150°C e atomização de 2550°C, sendo que a limpeza foi feita a uma temperatura de 2600°C. Ao longo deste processo, o gás encontra-se desligado na etapa da atomização (Tabela 7).

**Tabela 7.** Temperaturas e tempos das etapas da espectrometria de absorção atômica do método utilizado.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Gás – Árgon</b>
<b>Secagem</b>	90	30.8	Máximo
<b>Secagem</b>	105	25	Máximo
<b>Secagem</b>	110	12.5	Máximo
<b>Pirólise</b>	1150	14.2	Máximo
<b>Atomização</b>	2550	5.8	Stop
<b>Limpeza</b>	2600	4.1	Máximo

## **2.4 Validação da metodologia analítica**

A validação envolve um processo de avaliação de todos os procedimentos de um determinado método utilizado em laboratório, para identificar e quantificar um composto em determinada matriz. O método analítico pode ser adaptado de outro já existente, desenvolvimento de um novo ou até mesmo a implementação de um método já conhecido. Surge com o objetivo de demonstrar que o método analítico que vamos utilizar é o mais adequado para o fim a que se destina, sendo que o método apenas é validado se as suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos.

Todo o processo de validação engloba a avaliação de parâmetros como a seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação (Brito *et al.*, 2003; Ribani *et al.*, 2004).

Para este estudo, a validação foi realizada com recurso a padrões, brancos e fortificações.

### **Ensaio em branco**

Para este trabalho, foram realizados dois ensaios em branco. Um ensaio em branco dos reagentes com o objectivo de avaliar possíveis interferências dos reagentes e outro ensaio em branco da amostra para avaliar possíveis interferências da amostra e efeito matriz.

Este processo funciona como uma ferramenta de controlo de qualidade. Os brancos utilizados para este estudo foram o cadinho vazio e o cadinho apenas com a amostra, sendo submetidos ao método analítico adotado.

Para a validação do método analítico são estudados vários parâmetros:

- Seletividade:

A seletividade é definida como a capacidade de avaliar as substâncias que uma determinada matriz pode conter na sua composição, designadas interferências. Essas substâncias podem ser impurezas, produtos de degradação, entre outros (Tavares, 2010).

Para este estudo o objetivo foi averiguar se há interferentes que possam alterar ou interferir na determinação do níquel.

- Linearidade:

A linearidade apresenta-se pela capacidade que determinado método analítico tem de fornecer resultados proporcionais às concentrações dos analitos na amostra em determinado intervalo de concentrações. Demonstra a proporcionalidade entre as concentrações que estão presentes numa dada amostra e o sinal obtido. A relação é tanto maior quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 1 (Gomes, 2013).

Durante este estudo a avaliação da linearidade foi avaliada em soluções padrão e efeito matriz.

A linearidade foi estudada em soluções padrão com as concentrações de 6 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 60 µg/L, 80µg/L e 100 µg/L. Tendo-se também utilizado níveis de fortificação de 25 µg/Kg, 100 µg/Kg, 200 µg/Kg, 300 µg/Kg e 400 µg/Kg.

- Exatidão e precisão:

A avaliação da exatidão e da precisão da metodologia utilizada foi realizada através de ensaios de fortificação. Estes ensaios foram realizados com um branco e três níveis de fortificações 100 µg/Kg, 200 µg/Kg e 300 µg/Kg. As amostras foram feitas em triplicado e em 3 dias diferentes.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados que vão ser encontrados no nosso estudo e um valor dado como referência aceite como verdadeiro. Daqui, retemos que a recuperação está diretamente relacionada com a exatidão pois traduz-se na quantidade do analito que recuperámos no processo analítico (Tavares, 2010).

A precisão consiste na dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos na mesma amostra, sendo obtida através do desvio padrão dos triplicados de cada fortificação (Gomes, 2013; Tavares, 2010).

Foi determinada a precisão intra-dia e inter-dia. A precisão intra-dia é o desvio padrão relativo dos valores obtidos para os replicados da mesma fortificação no mesmo dia e a inter-dia é o desvio padrão relativo entre as fortificações com a mesma concentração nos 3 dias consecutivos (Costa, 2013).

- Limite de deteção e limite de quantificação:

O limite de deteção é definido como o valor da menor concentração de analito que é possível detetar, não sendo necessariamente quantificado. Significa que, uma leitura inferior ao limite de deteção não expressa que esse analito não se encontre presente, mas que a concentração da substância a analisar é inferior ao limite de deteção (Parreira, 2012).

Quanto ao limite de quantificação, este é definido como a menor concentração de analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis. Os mesmos critérios foram utilizados para estes 2 limites (Gomes, 2013; Tavares, 2010).

O limite de deteção e o limite de quantificação foram calculados com base em parâmetros da curva analítica. Para o limite de deteção utilizou-se:

Limite de deteção =  $3 \times (s/S)$ , onde  $s$  é o desvio padrão das amostras à reta e  $S$  o declive da curva analítica.

Para o limite de quantificação =  $10 \times (s/S)$ , em que  $s$  e  $S$  são os mesmos utilizados no limite de deteção.

## **2.5 Discussão de Resultados**

### **2.5.1 Otimização dos parâmetros do equipamento de espectrometria de absorção atômica**

#### ***2.5.1.1 Temperatura de pirólise e temperatura de atomização***

Este equipamento de espectrometria de absorção atômica tem um “cookbook” onde estão descritos todos os dados necessários para trabalhar com o equipamento e com os diferentes metais, onde vêm descritas as temperaturas de pirólise e de atomização previamente estudadas, podendo ser necessário alguns ajustes consoante o metal em estudo.

Os níveis adotados para as temperaturas basearam-se no comportamento eletrotérmico dos elementos. É ainda de referir que neste estudo não foi aplicado qualquer modificador químico.

Para verificar as melhores condições de determinação de níquel, foram avaliadas diversas temperaturas de pirólise e atomização.

Através de vários ensaios, testaram-se diversas temperaturas variando-se a temperatura de pirólise de 1000°C a 1150°C, com intervalos de 50°C, tendo-se obtido melhores resultados a uma temperatura de 1150°C. Para a atomização foram também avaliadas diversas temperaturas, entre 2150°C a 2550°C, com intervalos de 50°C, fixando-se a temperatura de atomização em 2550°C.

#### ***2.5.1.2 Otimização da extração***

Numa primeira instância foram testadas fortificações idênticas, dissolvidas em diferentes quantidades de HNO<sub>3</sub> a 0,5% (5 ml e 10 ml). Tentou-se ainda a dissolução em H<sub>2</sub>O, na qual se verificou que a mesma não produzia qualquer efeito. No que refere à quantidade de amostra utilizada testou-se a quantidade de amostra de 1 g e 2 g. Foram ainda feitos ensaios onde se fortificou antes e depois da incineração para perceber se haveriam perdas durante o processo de incineração.

As percentagens de recuperação observadas em fortificações idênticas foram mais próximas de 100% para os ensaios onde se redissolveu a amostra em 10 ml e se utilizou 2 g de amostra.

Após estes ensaios definiu-se que as melhores condições seriam:

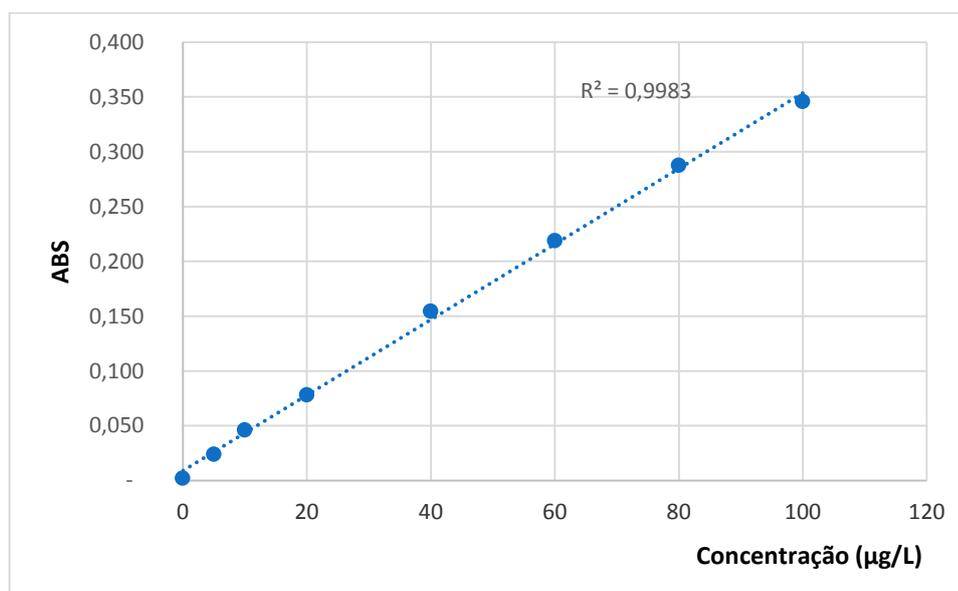
- Dissolução em 10 ml de HNO<sub>3</sub> a 0,5%;

- Utilização de uma quantidade de amostra de 2g.

## 2.5.2 Validação

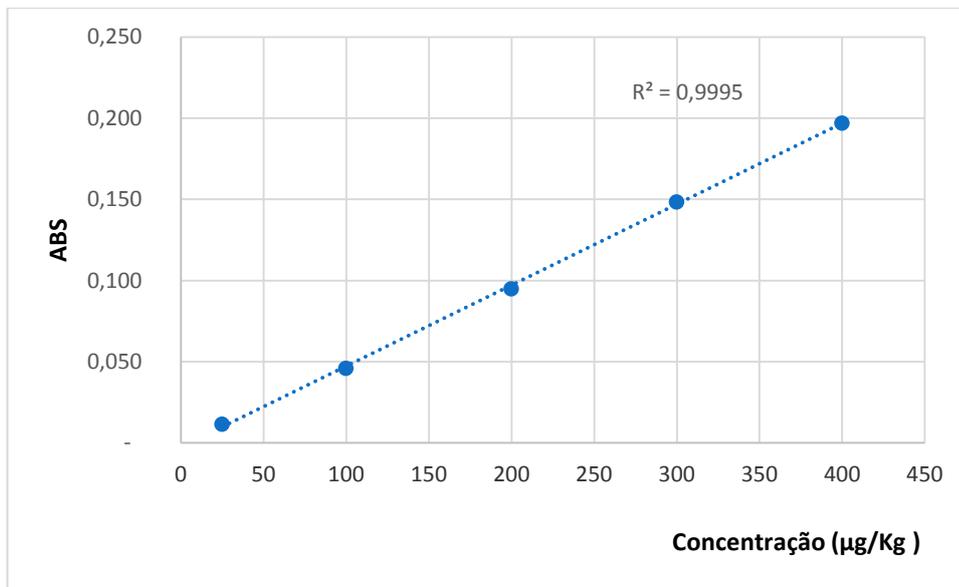
### 2.5.2.1 Linearidade

A avaliação da linearidade foi estudada para as soluções padrão e para as amostras fortificadas. Em soluções padrão obteve-se uma curva com o coeficiente de correlação de 0,9983 o que revela linearidade na gama de concentração de 5 a 100 µg/L (Figura 3).



**Figura 3.** Linearidade em padrão.

Após se verificar a linearidade em soluções padrão verificou-se a linearidade em amostras fortificadas. Verificou-se também que o coeficiente de relação era próximo de 1 (0,9995) (Figura 4).



**Figura 4.** Linearidade para amostras fortificadas.

### **2.5.2.2 Limites de detecção e quantificação**

Como já descrito, o limite de detecção representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detetada, não necessariamente quantificada. O limite de quantificação, representa a menor concentração de substância em análise que pode ser quantificada.

Para esta metodologia analítica, o limite de detecção foi de 12,5 µg/Kg e o de quantificação de 37 µg/Kg.

### **2.5.2.3 Exatidão e Precisão**

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados que vão ser encontrados no nosso estudo e um valor dado como referência, aceite como verdadeiro.

Verificou-se que as percentagens de recuperação obtidas insidiram na ordem dos 80%, que tendo em conta a literatura e os valores que estamos a trabalhar, podem-se considerar boas, sendo que a percentagem de recuperação mais baixa que se verificou foi para o 3º dia de validação com um valor de 73,33%. Para a precisão intra-dia o valor mais elevado foi para o 2º dia de validação, para o nível mais baixo de fortificação, 100 µg/Kg, e com uma percentagem de 23,57%. Na precisão inter-dia os valores obtidos foram de 9,53%, 4,03% e 4,09% para o 1º, 2º e 3º dia, respetivamente (Tabela 8).

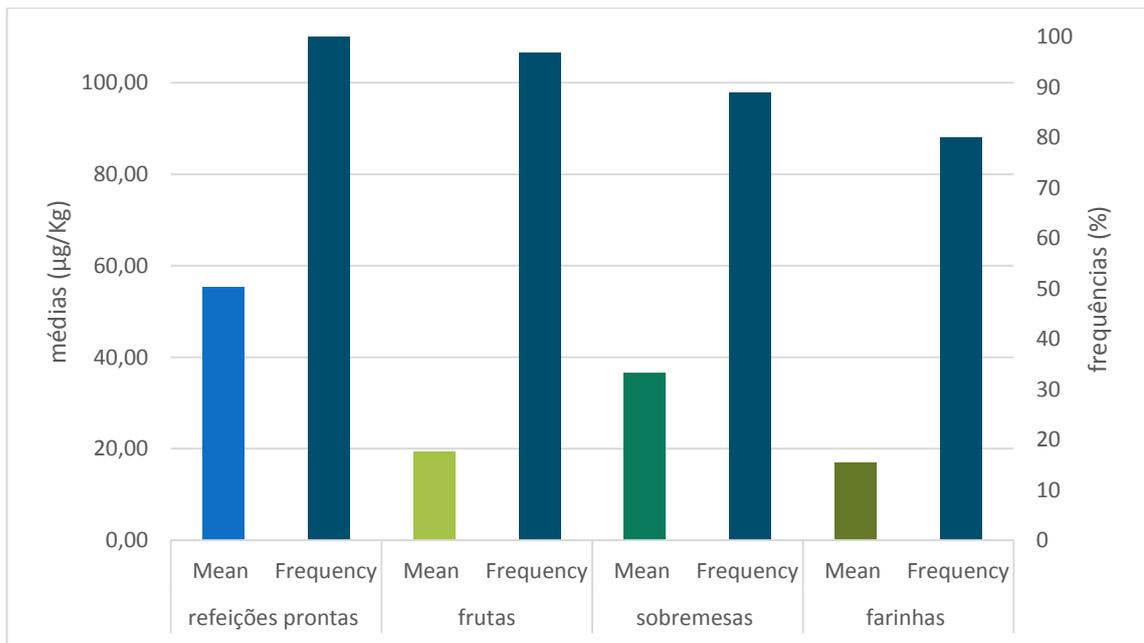
**Tabela 8.** Exatidão e Precisão intra-dia e inter-dia.

<b>Dia</b>	<b>Nível de Fortificação (µg/Kg)</b>	<b>Média de recuperação (%)</b>	<b>Precisão intra-dia (%)</b>	<b>Precisão inter-dia (%)</b>
<b>1° Dia</b>	100	81,84	1,06	9,53
	200	84,87	3,23	
	300	79,58	2,32	
<b>2° Dia</b>	100	100,53	23,57	4,03
	200	80,25	2,00	
	300	81,04	5,18	
<b>3° Dia</b>	100	87,86	11,21	4,09
	200	76,84	2,56	
	300	73,33	3,09	

### **2.5.3 Níveis de níquel nas amostras encontradas**

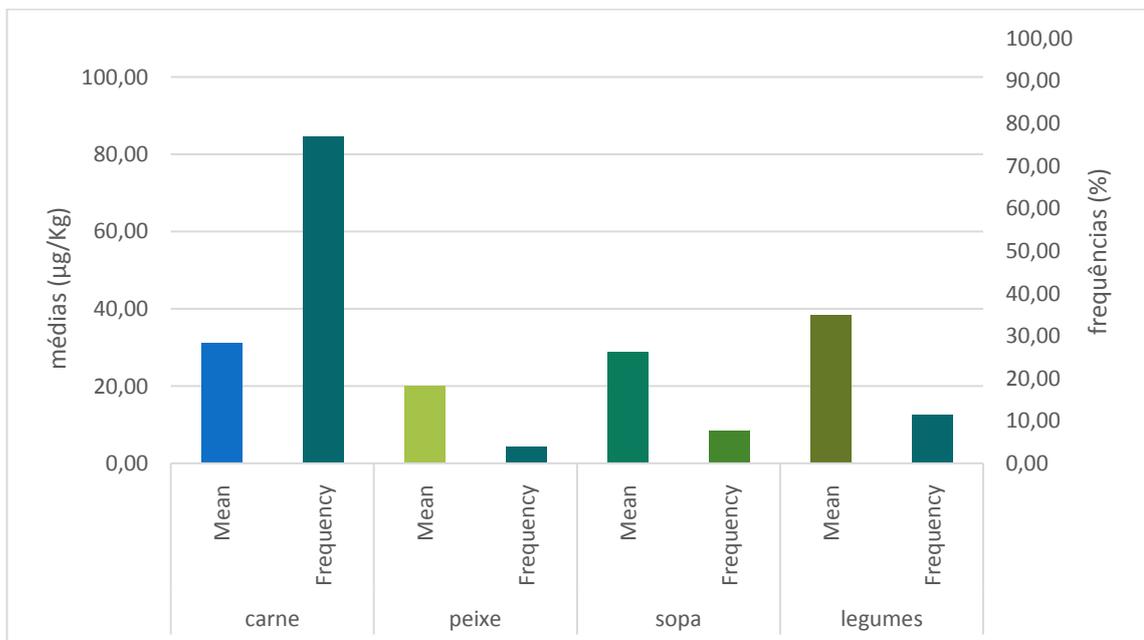
Foram analisadas 85 amostras e podemos constatar que apenas 6 não se encontravam contaminadas. Das 76 (89%) que estão contaminadas, 30 é possível detetar a presença de níquel, mas não quantificar, sendo que nas restantes 46 é possível quantificar o teor que a amostra contém.

No geral, todos os grupos apresentaram amostras contaminadas com frequências de contaminação entre os 80% e 100%. No entanto, o grupo das refeições pronta foi onde se verificou uma maior frequência de contaminação, assim como as amostras com as médias mais elevadas (55 µg/Kg) com um valor máximo de 173,33 µg/Kg. Em termos de valores médios encontrados seguem-se as sobremesas com 37 µg/Kg (com o valor máximo de 184,6 µg/Kg), as frutas com 19 µg/Kg (com o valor máximo de 225,68 µg/Kg) e por fim as farinhas com 17 µg/Kg (com valor máximo de 98,45 µg/Kg) (Figura 5).



**Figura 5.** Médias e frequências gerais.

Dentro do grupo das refeições prontas foram consideradas amostras de carne, embora que na sua composição tivessem outros tipos de alimentos (sobretudo vegetais); peixe, sopa, legumes e apenas legumes (1 ou mais tipos), sendo a maior quantidade de amostras contaminadas observou-se para o grupo das refeições de carne (77%), no entanto são os legumes que apresentam o valor médio mais alto (38 µg/Kg).



**Figura 6.** Médias e frequências do grupo das refeições prontas.

Nas farinhas foram analisadas farinhas lácteas e farinhas não lácteas, em que todas elas estavam contaminadas e os valores médios de contaminação foram aproximadamente, 21,88 µg/Kg para as lácteas e 18,51 µg/Kg para as não lácteas.

A legislação nacional não contempla este metal na alimentação, sendo necessário recorrer a outros estudos a título comparativo. Num estudo feito em Portugal para espécies hortícolas, foi utilizada a gama de frequências entre 1 - 10 mg/Kg para valores de referência (Lopes 2009). No presente estudo, verificou-se que a concentração mais elevada dentro das amostras de apenas legumes foi de 65 µg/Kg para o puré de mistura de legumes. Na sua constituição continha legumes como cenoura, batata, espinafres e alho francês.

Para este estudo torna-se difícil a perceção de qual o tipo de alimentos que poderão estar na origem da contaminação, pois todas as amostras são analisadas como uma mistura de alimentos. No entanto, podemos verificar que, em média, os valores dos alimentos que contêm vegetais é maior, mesmo que incluíam carne, o que vai de encontro à literatura tendo em conta que os vegetais são um dos alimentos mais estudados. Como já referido, isto pode depender da zona de cultivo, ou seja, um cultivo perto de uma zona mais poluída (por exemplo a nível de tráfego automóvel) vai estar mais suscetível a que esse solo esteja mais contaminado do que um de uma zona rural. Este processo funciona através da emissão deste tipo de compostos para a atmosfera e com a precipitação infiltram-se nos solos, levando a que as plantas os absorvam através das suas raízes/folhas (Pacheco, 2015).

Outra questão debatida na literatura é o processo de confeção dos alimentos. Deve ser garantido que os materiais de contato com os alimentos sejam de aço inoxidável de boa qualidade, resistente à corrosão e para que o metal não migre para os alimentos em quantidades que ponham em perigo a saúde humana. Há que ter em conta que hoje em dia muitos dos utensílios são feitos de aço inoxidável, inclusive este é utilizado nos transportes de alimentos (equipamentos e recipientes de processamento de alimentos, barris de cerveja, utensílios de cozinha como tachos, entre outros). Assim sendo, também outros estudos devem ser feitos no sentido de averiguar a capacidade migratória deste elemento neste tipo de materiais (Londoño Franco, Londoño Muñoz, Muñoz Garcia, 2016).

Também é importante a comparação entre alimentos de origem biológica e não biológica, onde os fertilizantes e os pesticidas utilizados poderam promover um aumento da contaminação por níquel. Os resultados não demonstraram diferenças entre estes dois grupos, visto que a frequência é maior nas amostras biológicas (100%), mas com um valor médio de 33,6 µg/Kg, mas por outro lado o valor médio é mais elevado nas amostras de

origem não biológica (34,3 µg/Kg) mas com uma frequência de 92,5%. Desta forma, não se conseguiu confirmar uma maior contaminação nas amostras não biológicas e o respetivo impacto dos pesticidas e fertilizantes na contaminação por níquel nos alimentos.

Outra categoria analisada foi a diferença entre os alimentos de marca e marca branca, onde também não se pode retirar qualquer conclusão tendo em conta que as frequências são de 98% e 80% e as médias de 33,1 e 42,1 µg/Kg, respetivamente.

## 2.6 Avaliação do risco

A quantidade de alimento que o indivíduo deve ingerir é muito variável, sendo que se tem de ter em conta o peso e a idade do mesmo. Nos primeiros tempos de vida a amamentação deve ser feita quando e na quantidade que o bebé quiser pois vai depender das suas necessidades energéticas (Domingos, 2013).

Aos 6 meses é aconselhável a introdução de novos alimentos, contudo até atingirem essa idade, o leite é o único alimento ingerido. Segundo a OMS a quantidade de leite diária recomendada é de 150 ml por Kg de peso, sendo que, aos 4 meses, a criança deve ter aproximadamente 6 Kg e a ingestão de leite deverá ser de 900 ml. Aos 6 meses a criança deverá ter à volta de 7,500 Kg e a ingestão de leite deverá ser de 1125 ml (Tabela 8) (Rocha, 2017).

Foi utilizada uma dose tolerável diária de 2,8 µg/Kg (0,0028 mg/Kg) por peso corporal/dia para determinar possíveis riscos.

**Tabela 9.** Ingestão de alimentos e peso por faixa etária.

<b>Idade</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Quantidade de alimento consumido diariamente (Kg)</b>
<b>6 meses</b>	7,500	1,125 Kg
<b>1 ano</b>	10	1,5 Kg
<b>2 anos</b>	12,500	2 Kg

Aos 6 meses de idade a alimentação do bebé deixa de ser exclusivamente o leite materno, passando para alimentos mais simples. No entanto, em casos excepcionais, algumas mães não conseguem amamentar durante este período sendo que a alimentação da criança se inicia

aos 4 meses. Para este estudo, pressupomos que a alimentação complementar do bebé se inicia aos 6 meses mantendo uma rotina como:

- Pequeno - almoço: leite materno;
- Meio da manhã: puré de frutas;
- Almoço: refeição pronta;
- Meio da tarde: leite materno;
- Jantar: farinha;
- Ceia: leite materno (Zanin, 2018).

Após o primeiro ano de idade, a alimentação da criança está caracterizada pela adaptação à rotina alimentar da família, uma vez que a maioria dos alimentos já foram introduzidos anteriormente em sopas, refeições e papas de frutas. Deste modo foi desenvolvida maturidade para as diferentes texturas, passando assim a ser adaptado à dieta praticada pela família. Assim, para uma criança de um ano considerou-se a rotina de alimentação:

- Pequeno - almoço: leite materno;
- Almoço: refeição pronta + fruta;
- Meio da tarde: farinha;
- Jantar: refeição pronta + fruta;
- Ceia: leite materno (Zanin, 2018).

Aos 2 anos:

- Pequeno - almoço: leite materno;
- Meio da manhã: pão ou bolacha;
- Almoço: Sopa + refeição + fruta;
- Meio da tarde: peça de fruta e/ou farinha;
- Jantar: Sopa + refeição + fruta;
- Ceia: leite materno (Zanin, 2018).

Para avaliar a ingestão de níquel foram seleccionados os grupos já existentes passando a existir o grupo das refeições prontas e das farinhas; e outro grupo das frutas e das sobremesas, calculando-se a ingestão média diária pressupondo que havia apenas ingestão de fruta ou sobremesa. Sendo assim possível o cálculo em média e no pior cenário, dependendo da faixa etária da criança.

Na fase dos 6 meses a criança alimenta-se sobretudo de leite. No entanto os novos alimentos já começam a ser inseridos na alimentação, sendo importante referir que, por exemplo, as farinhas são dissolvidas em água ou leite, tendo em conta que o que nos interessa é averiguar o alimento em sólido. A dose recomendada é de 7 colheres de farinha, nesta faixa etária, e cada uma equivale a aproximadamente 7 g, por refeição consumindo 49 g de alimento sólido. Em todas as faixas etárias utilizou-se em média apenas 49 g de farinha pois a criança vai consumir outros alimentos. Até aos 6 meses consome essencialmente leite materno, assumindo que a mãe consegue proceder à amamentação e depois dos 6 meses começam também a ser inseridos outros alimentos em que o bebé não necessita de grandes quantidades de farinha.

Tendo em conta as rotinas alimentares descritas, aos 6 meses considera-se aproximadamente o consumo de 0,249 Kg farinha/refeições prontas (200 g do almoço + 49 g de farinha) e 0,130 Kg de frutas/sobremesas (130 g do boião de fruta). Para 1 ano de idade considerou-se o consumo de 0,449 Kg de farinhas/refeições prontas (200 g almoço + 200 g jantar + 49 g farinha) e 0,260 Kg de fruta/sobremesas (2 boiões de fruta). Para 2 anos de idade considerou-se o consumo de 0,949 Kg de farinhas/refeições prontas (250 g (sopa) + 200 g almoço + 250 g (sopa) + 200 g jantar + 49 g farinha) e 0,390 Kg de fruta/sobremesas (aproximadamente 3 boiões de fruta).

Aos valores da média e do pior cenário foi multiplicado o valor ingerido consoante o grupo e a faixa etária (valores referidos anteriormente) e no final ainda dividido pelo peso da criança (Tabela 10).

**Tabela 10.** Ingestão de níquel em crianças portuguesas. Valor médio e pior cenário (µg por peso corporal por dia).

Faixa etária		Refeição pronta	Farinha	Fruta (sobremesa)	Total
6 meses	<b>Média</b>	1,47	1,11	0,33 (0,64)	2,91 (3,22)
	<b>Pior cenário</b>	4,62	6,43	3,91 (3,20)	14,96 (14,25)
1 ano	<b>Média</b>	2,2	0,83	0,49 (0,96)	3,52 (3,99)
	<b>Pior cenário</b>	6,93	4,82	5,87 (4,80)	17,62 (16,55)
2 anos	<b>Média</b>	3,96	0,67	0,59 (1,15)	5,22 (5,78)
	<b>Pior cenário</b>	14,48	3,86	7,04 (5,76)	25,38 (24,1)

Assumindo que o valor da dose tolerável diária é de 2,8 µg/Kg por peso corporal/dia, e que até este valor a concentração de níquel é tolerável, podemos concluir que todos os valores ultrapassam esta dose tolerável diária, tanto na média como no pior cenário.

Em média, são os valores das refeições prontas que mais contribuem com a contaminação de níquel, na medida em que a criança consome mais alimentos por Kg de massa corporal. No entanto, nas farinhas, à medida que o peso corporal aumenta e o consumo de farinhas se mantém (tendo em consideração a rotina alimentar apresentada), a média das farinhas tende a diminuir, não contribuindo tão significativamente como as refeições prontas. Analisando os valores das frutas e das sobremesas, são as sobremesas que apresentam os valores mais significativos de contaminação, sendo que para ambos os grupos, a média aumenta à medida que aumenta a faixa etária.

### 3. Conclusão

Para este estudo foi necessário validar uma metodologia analítica para a determinação de níquel nos alimentos, nomeadamente fórmulas infantis para crianças, por espectrometria de absorção atómica em câmara de grafite. De acordo com os resultados pode concluir-se que, o método possui um limite de deteção de 12,5 µg/Kg e um limite de quantificação de 37 µg/Kg (sendo concordante com a literatura analisada); a linearidade foi verificada entre as concentrações de 25 a 400 µg/Kg; a exatidão foi determinada pelos testes de recuperação, realizados através da fortificação em 3 concentrações distintas dentro da gama já identificada, e tendo em conta que o critério de aceitação é entre 80% e 120% confirmou-se a exatidão do método.

Os resultados deste estudo mostram que os produtos destinados a lactentes e crianças apresentam níveis de contaminação, que vão de encontro aos verificados na literatura, sendo que não se pode atribuir a presença a um alimento em específico, visto que a maior parte das amostras são uma mistura de vários alimentos. Pode-se assim concluir que existe uma contaminação generalizada das amostras, uma vez que todos os grupos de alimentos se encontram contaminados. No entanto, é de referir que a faixa etária dos 2 anos é a que se encontra mais exposta ao risco, na medida em que deixam de consumir o leite materno, passando a consumir mais refeições completas, que por sua vez são as que estão mais contaminadas. Uma criança de 2 anos consome mais alimento por Kg de massa corporal, o que a torna mais vulnerável à contaminação.

O grupo das refeições prontas foi onde se verificou a maior frequência de contaminação, assim como os valores médios mais altos. Este resultado vai de encontro ao apresentado na literatura científica, visto que os vegetais são considerados um dos grupos mais contaminados, o que se pode verificar na elevada média referente ao grupo dos legumes. Em relação às amostras biológicas e não biológicas, assim como às marcas e marcas brancas não verificaram diferenças entre os grupos.

Pela avaliação do risco pode-se concluir que as crianças estão fortemente expostas ao níquel, sendo que num futuro próximo podem desenvolver problemas saúde.

Os metais podem constituir uma grande ameaça à saúde pública caso se encontrem em grandes concentrações e ingeridos em quantidades elevadas por um longo período de

tempo. O seu potencial bioacumulável e a especificidade das crianças, em particular, são parâmetros a ter em conta.

Neste estudo, conclui-se que os metais constituem um risco para as crianças das diferentes faixas etárias analisadas, na medida em que a dose tolerável diária é superior à de 2,8 µg/Kg por peso corporal/dia, representando assim um grave problema de saúde pública que necessita de intervenção urgente.

Tendo em conta que este metal pode surgir de diversas fontes - naturalmente presente nos alimentos ou por contaminação posterior - é necessário um programa mais intensivo de monitorização, de forma a acompanhar o alimento e todo o processo que este sofre, como objectivo de perceber como é que a contaminação externa é feita e como pode ser minimizada. Outra medida necessária, é o estabelecimento de limites para que as medidas de vigilância se tornem mais apertadas, garantindo assim, o bem - estar e a saúde do consumidor.

#### 4. Referências Bibliográficas

- Associação Nacional da Indústria de Alimentação Infantil e Nutrição Especial. «Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição». <http://www.anid.pt/formulas-para-lactentes-e-formulas-de-transicao.html> (30 de maio de 2018).
- Brito, Natilene Mesquita, Ozelito De Possidônio Amarante Junior, Luciana Polese, e MARIA LÚCIA RIBEIRO. 2003. «Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão». *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente* 13: 129–46.
- Campos, Ellen Mariany Ferraz de et al. 2010. «Quantificação de minerais em sucos industrializados». *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR* 14(1): 11–16.
- Carrapatoso, Isabel, Graça Loureiro, Carlos Loureiro, e Emília Faria. 2004. «Dermatite endógena induzida pela ingestão de níquel . A propósito de dois casos clínicos». *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* XXII: 261–70.
- Castro, Neemias de. 2002. «Cádmio, chumbo, cromo, mercúrio e níquel nos rios do estado de São Paulo e em peixes do Rio Sorocaba (São Paulo, Brasil)». *Aleph*: xi, 107 f.: il., . <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/122191>.
- Comissão Europeia. 2015. «RECOMENDAÇÃO (UE) 2016/1110 DA COMISSÃO». *EFSA Journal* 13(4): 2015–16. <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2015.4074>.
- Costa, Sandra. 2013. «Espectrofotometria de Absorção Atômica». *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*: 147.
- Domingos, Cristina Pestana. 2013. «Importância do estado nutricional da grávida no decurso da gestação». Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
- EFSA. 2015. «Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water». *EFSA Journal*. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4002>.
- Elpo, Eliane Rose Serpe, e Reanto João Sossela de Freitas. 1995. «Avaliação dos teores de cádmio, chumbo, cromo, níquel nos alimentos das cesta básica». 2 13: 71–84.
- Eurofins. «Analysis of Babyfood». <https://www.eurofins.de/food-analysis/industries/babyfood/> (31 de maio de 2018).

- European Food Safety Authority. 2015. «Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water». *EFSA Journal* I EUROPEAN(2): 1–202. <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2015.4002>.
- Figueiredo, Ana. 2007. «Avaliação da contaminação metálica de cogumelos das regiões da Beira Interior e Trás-os-Montes». : 164.
- Filho, Dalmo Lima, e Fernando B Mainier. «Avaliação Crítica de Possíveis Contaminações por Metais Tóxicos em Leite em Pó Durante o Processo Produtivo».
- Gomes, Ana Rute Martins Costa. 2013. «Determinação de Fluoroquinolonas em Tecido Muscular de Aves». Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra.
- Ikem, Abua et al. 2002. «Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES». *Food Chemistry* 77(4): 439–47.
- International Agency for Research on Cancer. 2012. «Nickel and nickel Compounds».
- Lima, Veridiana Silveira. 2011. «Confiabilidade analítica e garantia da qualidade da análise de níquel em tecido vegetal». : 32.
- Londoño Franco, Luis Fernando, Paula Tatiana Londoño Muñoz, e Fabián Gerardo Muñoz Garcia. 2016. «Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal». *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14(2): 145. <http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/view/1707>.
- Lopes, A. 2009. «Avaliação da contaminação em metais pesados no pescado: Análise da situação do pescado comercializado em Portugal e dos alertas emitidos pelo sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)». Universidade Nova de Lisboa.
- Lopes, Henda Gonçalves António. 2014. «Avaliação do estado nutricional e do teor em metais pesados de plantas cultivadas nas hortas sociais do Instituto Politécnico de Bragança». Escola Superior Agrária de Bragança.
- Martins, Carla Teles, Ana Mercês, e Paula Alvito. 2009. «Ocorrência de cádmio em produtos à base de cereias, de origem convencional e biológica, destinados à alimentação infantil». *Saúde e Tecnologia* 3(July 2015): 10–14.

- Mesquita, Glenda Máris. 2014. «Metodologias de preparo de amostras e quantificação de metais pesados em sedimentos do Ribeirão Samambaia, Catalão-GO, empregando Espectrometria de Absorção Atômica». universidade Federal de Goiás. <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4128>.
- Miceli, Tatiane de Macedo. 2015. «Determinação de cádmio e chumbo em Cereais por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite após combustão iniciada por micro-ondas». Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Ministério da Saúde. 2009. 23 Cadernos de Atenção Básica SAÚDE DA CRIANÇA: *Nutrição Infantil: aleitamento materno e alimentação complementar*. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_crianca\\_nutricao\\_aleitamento\\_alimentacao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_nutricao_aleitamento_alimentacao.pdf).
- Monte, Cristina M. G., e Elsa R. J. Giugliani. 2004. «Recomendações para alimentação complementar da criança em aleitamento materno». *Jornal de pediatria* 80(5 Suppl): 131–41.
- Nunes, Juliana Andrade. 2009. «Desenvolvimento de método para determinação de Ag, AS, Cd, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino». : 94.
- Organização Mundial de Saúde. 1981. «Código Internacional de Marketing de Substitutos do Leite Materno». : 16.
- Pacheco, João. 2015. «Concentração de metais pesados em espécies hortícolas em agricultura urbana». Universidade de Lisboa.
- Parlamento Europeu e do Conselho. 2013. «Regulamento (UE) n.º 609/2013 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de». *Jornal Oficial da União Europeia* 181: 35–56. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:181:0035:0056:PT:PDF>.
- Parreira, Ana Rita Barroso. 2012. «Estudo comparativo do teor de metais contaminantes em amostras de chás provenientes de agricultura tradicional e biológica». Universidade de Lisboa. <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/11315>.
- Pina, Zeila Cristina Neves Évora de. 2011. «Contaminantes Em Alimentos Para Crianças - Simulação in Vitro Do Contaminantes Em Alimentos Para Crianças - Simulação in Vitro

Do». Universidade de Lisboa.

Pires, Pedro Alexandre Valente. 2017. «Implementação e validação da determinação de níquel em alimentos por absorção atómica de chama». Universidade Nova de Lisboa.

Reilly, Conor. 1980. *Metal Contamination of Food*. 1.<sup>a</sup> ed. ed. Elsevier Science. 1980. [https://books.google.pt/books?hl=ptPT&lr=&id=6eWpWlYpldUC&oi=fnd&pg=PR5&dq=lisk+reilly+metal+contamination+of+food&ots=3VAHLekIJU&sig=vf2c6PjyuXYSFtk2OIya23b6SPg&redir\\_esc=y#v=onepage&q=lisk reilly metal contamination of food&f=false](https://books.google.pt/books?hl=ptPT&lr=&id=6eWpWlYpldUC&oi=fnd&pg=PR5&dq=lisk+reilly+metal+contamination+of+food&ots=3VAHLekIJU&sig=vf2c6PjyuXYSFtk2OIya23b6SPg&redir_esc=y#v=onepage&q=lisk%20reilly%20metal%20contamination%20of%20food&f=false).

Ribani, Marcelo et al. 2004. «Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos». *Quimica Nova* 27(5): 771–80.

Rocha, Adriano Ferreira Da. 2009. «Cádmio, chumbo, mercúrio: a problemática destes metais pesados na Saúde Pública». Universidade do Porto. <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/54676>.

Rocha, Ângela Fiúza da. 2017. «Que quantidade de leite dar a um bebé?» <http://www.vidaativa.pt/a/quantidade-de-leite/> (26 de junho de 2018).

Rodak, Bruna Wurr et al. 2015. «Adubação com níquel na soja: teores nos grãos e produtividade.» Em *XXXV Congresso BRasileiro de Ciência do solo*, , 8–11.

Rodrigues, Ana Pimenta. 2017. «Práticas de alimentação complementar e estado nutricional de crianças dos 6 aos 23 meses do distrito de Caué, em São Tomé e Príncipe.» Universidade do Porto.

Sá, Soraia Vieira Mendes de. 2014. «Implementação e Validação de Métodos para Determinação de Metais (Cd, Cu, Fe, Pb e Zn) em Amostras de Lamas de ETAR por Digestão Ácida seguida de Espectrofotometria de Absorção Atómica». Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Santos, Lisia Maria Gobbo dos. 2009. «Estudo De Diferentes Técnicas Da Espectrometria De Absorção Atômica Na Determinação De Elementos Inorgânicos Em Matrizes De Interesse Sanitário». Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Siqueira, Marianna Pozzatti Martins de. 2017. «Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de metais traço em vegetais da família Solanaceae por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite por

análise direta de sólidos». Universidade Federal do rio Grande do Sul.

Soares, Aline Rodrigues. 2012. «Desenvolvimento de Métodos para Determinação de Chumbo e Níquel em Produtos Cosméticos e Cabelo por GF AAS». Universidade Federal de Minas Gerais.

Tavares, Adriano Duarte. 2010. «Determinação de Cádmio e Chumbo em Alimentos e Bebidas Industrializados por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica». universidade Federal da Paraíba.

Ventura, Marta et al. 2016. «Ocorrência de níquel em alimentos consumidos em Portugal : resultados preliminares do projeto-piloto Total Diet Study». *INSA - Boletim Epidemiológico Observações* 5(17): 10–13.

Viñas, P., M. Pardo-Martinez, e M. Hernández-Córdoba. 2000. «Determination of copper, cobalt, nickel, and manganese in baby food slurries using electrothermal atomic absorption spectrometry». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(12): 5789–94.

Virga, Rhp, Lp Geraldo, e Fh Santos. 2007. «Assessment of heavy metal contamination in blue crab specimens». *Ciência e Tecnologia de ...* 27(4): 779–85. [http://publicacoes.unigranrio.br/index.php/sare/article/viewFile/1229/752%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000400017&script=sci\\_arttext&tlng=e!n](http://publicacoes.unigranrio.br/index.php/sare/article/viewFile/1229/752%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000400017&script=sci_arttext&tlng=e!n)

Zand, Nazanin et al. 2012. «Elemental content of commercial “ready to-feed” poultry and fish based infant foods in the UK». *Food Chemistry* 135(4): 2796–2801. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.034>.

Zanin, Tatiana. 2018. «Alimentação do bebê aos 6 meses». *Tua Saúde*. <https://www.tuasaude.com/alimentacao-do-bebe-aos-6-mes>

## 5. Anexos

<u>Refeições prontas</u>	<u>Tipo de Refeição</u>	<u>Especificações</u>	<u>biológica/não-biológica</u>	<u>Marca</u>	<u>marca/marca branca</u>	<u>Conc corrigidas</u>	<u>Conc corrigidas</u>	<u>média</u>
Purê Fruta Banana / Laranja / Bolacha Maria	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Continente - Purés de Fruta	marca branca	168,5	58,65	184,6
logurte e 8 cereais	Farinha	não láctea	não biológica	Nestlé - Cerelec	marca	18,98	45,82	123,77
Purê de mistura de legumes biológico	Refeição pronta	legumes	biológica	Holle	Marca	18,98	64,35	113,57
Maçã Banana e Morango	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Nestlé – NaturNes - saqueta	Marca	6,25	89,85	110,37
Delícia de cenouras (sopa)	Refeição pronta	sopa	não biológica	Blédina	Marca	18,98	83,2	67,85
Legumes da Horta com Vitela	Refeição pronta	carne	não biológica	Nestlé	Marca	43,98	18,98	65
Pera williams	Boião/Saqueta Fruta	fruta	biológica	Baby bio	marca branca	101,55	119,2	64,98
Cerelec	Farinha	não láctea	não biológica	Nestlé - Cerelec	marca	6,25	39,03	61,90
Legumes e Vitela	Refeição pronta	carne	não biológica	Blédina	Marca	18,98	74,25	59,89
100% pera	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Blédina Frutapura Boião	Marca	49,08	68,65	59,43
Seleção da Horta (sopa)	Refeição pronta	sopa	não biológica	Blédina	Marca	6,25	64,4	55,6
Guisado de Borrego	Refeição pronta	carne	não biológica	Nestlé	Marca	66,6	18,98	54,29

I <sup>a</sup> papa multifrutos	Farinha	láctica	não biológica	Nestlé - Cerelac	marca	18,98	52,85		45,42
Puré de fruta multifrutas	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Contigente - Purés de Fruta	Marca branca	6,25	45,66		43,81
Salada de frutas	sobremesa	sobremesa	não biológica	Nestlé - logurtes NaturNEs (copinho)	marca	18,98	47,21		41,66
Legumes da Horta com Pescada	Refeição pronta	peixe	não biológica	Nestlé	Marca	6,25	51,15		39,14
Muesli	Farinha	láctica/não, láctea	biológica	Holle	marca	72,9	45,96		36,24
Maçã Morango Banana e Cereja	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Blédina – Saqueta	Marca	18,98	43,47		35,91
Cenouras com peru	Refeição pronta	carne	não biológica	Blédina	Marca	130,75	116,8		34,64
Aveia	Farinha	láctica/não, láctea	biológica	Holle	marca	192,9	176,3		33,09
7 cereais e banana	Farinha	não láctea	não biológica	Blédina	marca	47,59	40,03		31,96
Legumes da horta com carminha	Refeição pronta	carne	não biológica	Blédina	Marca	41,01	82,8		31,82
Frango e Vitela com Legumes	Refeição pronta	carne	não biológica	Nutribén	Marca	6,25	18,98		31,22
Seleção de Banana e Maçã 130 g	Boião/Saqueta Fruta	fruta	biológica	Nutribén – bio boiões	Marca	55,45	74,55		30,84
Legumes da Horta com Frango	Refeição pronta	carne	não biológica	Nestlé	Marca	18,98	18,98	detetado	30,79
8 cereais e 4 frutas	Farinha	láctica	não biológica	Nutribén	marca	18,98	38,49		29,63
Multifrutas com Cereais 200 g	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Nutribén	Marca	18,98	50,2		29,20
Frutas Variadas Seleccionadas 250 g	Boião/Saqueta Fruta	fruta	biológica	Nutribén – bio boiões	Marca	18,98	42,61		28,73
Banana Morango	Boião/Saqueta	fruta	não biológica	Nestlé -	Marca	46,76	18,98		28,65

Estufado de Cenouras e Carninha	Fruta	carne	não biológica	Yogolino	Marca	44,07	46,77		27,77
Puré de Abobora e arroz biológico	Refeição pronta	legumes	biológica	Holle	Marca	47,57	82,4		25,95
Maçã e banana	Boião/Saqueta Fruta	fruta	biológica	Baby bio	marca branca	44,17	49,99		25,7
Frango Gourmet com Arroz 250 g	Refeição pronta	carne	biológica	Nutribén (Bio boiões)	Marca	18,98	44,29		23,86
Banana, Morango e logurte Natural	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Fruta & GO	Marca	209,35	242		22,64
Pequenos legumes e vitela	Refeição pronta	carne	não biológica	Baby-Auchan	marca branca	60,75	54,45		22,13
Maçã e pera	Boião/Saqueta Fruta	fruta	biológica	Holle (Boião)	marca	18,98	89,6		21,67
Banana Laranja Bolacha	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Nestlé - NaturNes - saqueta	Marca	18,98	50,3		20,86
Maçã Banana e Aveia	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Nestlé - NaturNes - saqueta	Marca	22,27	33,27	detetado	18,98
Frutas variadas	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Nestlé	Marca	32,03	31,61	detetado	18,98
Seleção de Banana e Maçã 200 g	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Fruta & GO	Marca	23,31	24,41	detetado	18,98
Melancia melão	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Pingo Doce	marca branca	10,37	19,03	detetado	18,98
Pera e maçã	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Pingo doce	marca branca	24,76	19,51	detetado	18,98
Pera, banana e cenoura	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Hero baby	marca branca	11,02	30,69	detetado	18,98
Maçã Verde	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Hero Baby	marca branca	12,73	25,55	detetado	18,98

Pêssego manga maçã	Boião/Saqueta Fruta	fruta	não biológica	Humana	marca branca	28,34	33,91	detetado	18,98
1ª papa milho e arroz	Farinha	lática	não biológica	Blédina	marca	35,61	22,8	detetado	18,98
Papa Láctea	Farinha	lática	não biológica	Milfarin	marca	18,88	12,80	detetado	18,98
Farinha láctea maçã	Farinha	lática	não biológica	Continente	marca branca	4,19	21,76	detetado	18,98
Farinha láctea 5 frutos	Farinha	lática	não biológica	Intermaché	marca branca	5,96	37,38	detetado	18,98
Cereal e mel	Farinha	não láctea	não biológica	Continente	marca branca	16,24	0,40	detetado	18,98
Farinha não láctea bolacha Maria (250 g)	Farinha	não láctea	não biológica	Intermaché	marca branca	35,77	-1,46	detetado	18,98
Farinha de trigo	Farinha	não láctea	não biológica	Pingo Doce	marca branca	15,89	10,08	detetado	18,98
Legumes da Horta com Peru 200 g	Refeição pronta	carne	biológica	Nutribén (Bio boiões)	Marca	19,56	32,29	detetado	18,98
Puré de Cenoura, batata e carne vaca biológica	Refeição pronta	carne	biológica	Holle	Marca	13,08	26,84	detetado	18,98
Puré de Carne de frango biológico	Refeição pronta	carne	biológica	Holle	Marca	14,29	20,39	detetado	18,98
Puré de abobora, arroz integral e carne frango biológico	Refeição pronta	carne	biológica	holle	Marca	20,91	30,49	detetado	18,98
Puré de brócolos com arroz integral	Refeição pronta	legumes	biológica	Holle	Marca	15,06	21,66	detetado	18,98
Arroz com frango	Refeição pronta	carne	não biológica	Nestlé	Marca	10,47	18,98	detetado	18,98
Puré de batata com frango	Refeição pronta	carne	não biológica	Blédina	Marca	18,98	18,98	detetado	18,98
Vitela com legumes	Refeição pronta	carne	não biológica	Nutribén	Marca	35,62	28,29	detetado	18,98
Frango com legumes	Refeição pronta	carne	não biológica	Nutribén	Marca	18,98	21,73	detetado	18,98
Frango com arroz	Refeição	carne	não biológica	Nutriben	Marca	23,58	35,68	detetado	18,98

Ameixa Maçã	pronta	sobremesa	sobremesa	não biológica	Blédina - Frutapura Tacinha	marca	15,82	22,02	detetado	18,98
Tacinha maçã e Bolacha	sobremesa	sobremesa	sobremesa	não biológica	Blédina	marca	15,5	11,17	detectado	18,98
Banana	sobremesa	sobremesa	sobremesa	não biológica	Nestlé - yogolino	marca	18,99	10,17	detectado	18,98
Bolacha Maria	sobremesa	sobremesa	sobremesa	não biológica	Nestlé - yogolino	marca	53,5	18,98		18,98
Sobremesa Láctea Cremoso De Morango	sobremesa	sobremesa	sobremesa	não biológica	jumbo	marca branca	35,07	-1,09	detectado	18,98
Maça banana	Boião/Saqueta Fruta	fruta	fruta	não biológica	humana	marca branca	38,32	18,98		17,34
Muesli e frutos biológicos	Boião/Saqueta Fruta	fruta	fruta	biológica	Holle boião	marca	57,05	78,65		17,15
Multicereais	Farinha	não láctea		biológica	Hero Baby	marca branca	92,95	103,95		16,98
Maçã e manga	Boião/Saqueta Fruta	fruta	fruta	não biológica	Continente - Smoothie	marca branca	73,1	110,05		15,84
Sobremesa Láctea Cremoso Natural Açucarado	sobremesa	sobremesa	sobremesa	não biológica		marca branca	18,98	74,25		14,72
Feijão verde e frango	Refeição pronta	carne		não biológica	Baby-Auchan	marca branca	181,1	165,55		14,70
Pera, maçã e espinafres	Boião/Saqueta Fruta	fruta	fruta	biológica	Holle saqueta	marca	57,55	53,65		12,98
Primeira papa s/glúten (milho aveia)	Farinha	láctea		não biológica	Nutribén	marca	42,71	18,98		12,61
Puré de maçã e mirtilo biológico	Boião/Saqueta Fruta	fruta	fruta	biológica	Holle (boião)	marca	99	20,78		8,32
Pera, banana e kiwi bio	Boião/Saqueta Fruta	fruta	fruta	biológica	Holle	marca	18,98	59,3		7,26
Cenoura e frutos	Boião/Saqueta Fruta	fruta	fruta	biológica	Holle saqueta	marca	105,05	56,45		1,61
Pera, pêssego, framboesas e trigo	Boião/Saqueta	fruta	fruta	biológica	Holle	marca	77,6	71		-5,66

