



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Patrícia Alexandra Albino Leal

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE NÍQUEL  
EM ALIMENTAÇÃO DE CONFEÇÃO CASEIRA  
PARA CRIANÇAS E AVALIAÇÃO DO RISCO

Dissertação no âmbito do 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.

Fevereiro de 2021



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Patrícia Alexandra Albino Leal

**DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE NÍQUEL EM ALIMENTAÇÃO DE  
CONFEÇÃO CASEIRA PARA CRIANÇAS E AVALIAÇÃO DO RISCO**

Dissertação no âmbito do 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.

Fevereiro de 2021

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação só foi possível devido ao apoio e acompanhamento de pessoas pelas quais nutro um enorme respeito e admiração. Por isso, gostava de deixar algumas palavras de forma a demonstrar o meu apreço e gratidão:

O primeiro agradecimento é dirigido à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por promover uma formação académica rica e sólida, inculcando nos alunos o interesse no desenvolvimento de investigação científica credível, e por proporcionar os recursos e as condições necessárias ao desenvolvimento do trabalho.

À primeira pessoa que me acolheu com firmeza neste projeto, a Professora Doutora Angelina Pena, agradeço o desafio proposto na sugestão do tema, permitindo-me sair da zona de conforto.

Ao Professor Doutor André Pereira pelo apoio e orientação técnico-científica, bem como pela inteira disponibilidade demonstrada ao longo da realização da dissertação, mas também por todos os seus ensinamentos e otimismo.

Ao Doutor Rui Manadas (UCQFarma) pelas incansáveis horas no Laboratório de Apoio à Comunidade da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade demonstrada e pela boa disposição.

À colega Célia Laranjeiro, Mestre em Segurança Alimentar, pela receção e integração no Laboratório de Bromatologia, Hidrologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo tempo generosamente despendido durante a atividade experimental, pelos conhecimentos partilhados e companheirismo.

Às entidades colaboradoras na colheita das amostras de alimentos, nas pessoas da Dra. Eunice Ferreira e Dra. Fátima Duarte, pelo interesse demonstrado ao tema, tornando rapidamente viável a recolha das mesmas, as quais foram fundamentais à realização deste estudo.

Aos restantes colaboradores das entidades, Dra. Carla Margarido, Zélia Lopes, Vanda Gil, Rodrigo Ezequiel, Maria da Conceição Marques, Maria Gertrudes Pereira, Ana Rita Dias, Adelaide Sá, Celeste Marques, Maria do Céu Reis e Marisa Gomes, com os quais trabalhei diretamente na recolha das amostras, agradeço pela disponibilidade sempre demonstrada, pela cooperação, incentivo e amizade.

Agradeço aos meus pais, Silvana Leal e Paulo Leal, pelo apoio e ajuda constantes, pela força e ensinamentos transmitidos, sem os quais não teria sido possível chegar até aqui. A motivação

que insistentemente me transmitiam foi imprescindível, tanto durante este trabalho como ao longo de toda a minha vida.

Agradeço ao meu noivo João Figueiredo, pelo companheirismo e amizade, por todas as palavras de incentivo, por acreditar em mim e naquilo que faço, pela paciência e por ter feito esta caminhada comigo apesar de todas as dificuldades.

Às amigas e colegas de Mestrado Inês Pedro, Joana Azenha e Catarina Ferreira, agradeço a amizade, a boa disposição e o apoio nas horas de estudo. Especialmente a ti Inês e restante Família, agradeço terem-me recebido sempre tão bem na vossa casa, fazendo-me sentir como se estivesse na minha. Obrigada por tudo!

Aos restantes familiares e amigos um enorme obrigado por acreditarem em mim, pelos ensinamentos de vida e pela força e incentivo prestados ao longo desta jornada.

Um sincero OBRIGADA a todos!

## **Abstract**

Nickel (Ni) is an element that is naturally present in the earth's crust and its emission to the atmosphere originates from natural or anthropogenic causes. Food is one of the main sources of exposure to this metal. Due to its accumulation in the body it can cause harmful health effects such as carcinogenesis and induced dermatitis. Therefore, through scientific evidence, Ni has been classified by the International Agency of the World Health Organization for Cancer Research (IARC) as human carcinogens.

Children are the most vulnerable population group, which is justified by the increased food intake by body weight, by the incomplete development of some organs and tissues and by the immature state of the metabolic pathways, in the first years of life, which hinder metabolism and excretion pollutants, which tend to accumulate in the body.

The main objective of this work was to assess the risk in relation to the presence of Ni in homemade food, establishing a comparison with commercial infant feeding. The analytical methodology used for the determination of Ni was dry ashing followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). 146 samples of homemade food were analyzed, including soups, second course meals, fruits and non-commercial porridge, of which 121 were contaminated. It was found that the group of non-commercial porridge was the one with the highest average concentrations (134.2 µg/Kg) and the maximum content of 350 µg/Kg, with the lowest concentrations found in soups with an average value of 32.19 µg/Kg. These results were similar to those similar for commercial infant feeding, showing the possible absence of the risk promoted by Ni in homemade baby food.

Using average results and the worst case scenario, the tolerable daily intake proposed by EFSA (13 µg/kg) was not exceeded for the different age groups.

**Keywords:** Nickel, baby food, human nickel exposure, graphite furnace atomic absorption spectrometry, risk assessment.

## Resumo

O Níquel (Ni) é um elemento que está naturalmente presente na crosta terrestre e a sua emissão para a atmosfera tem origem em causas naturais ou antropogênicas. A alimentação é uma das principais fontes de exposição a este metal. Devido à sua acumulação no organismo pode causar efeitos nocivos para a saúde como a carcinogênese e a dermatite induzida. Por isso, através da evidência científica, a Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Cancro (IARC) classifica o Ni como carcinogénico para o Homem.

As crianças constituem o grupo populacional mais vulnerável, sendo esta justificada pela maior ingestão de alimentos por peso corporal, pelo desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos e pelo estado imaturo das vias metabólicas, nos primeiros anos de vida, que dificultam a metabolização e a excreção de poluentes, que tendem a acumular-se no organismo.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o risco em relação à presença de níquel em alimentos de confeção caseira, estabelecendo uma comparação com a alimentação infantil comercial. A metodologia escolhida para a quantificação deste contaminante foi a espectrometria de absorção atômica em câmara de grafite (GFAAS). Foram analisadas 146 amostras de alimentos de confeção caseira, desde sopas, refeições de segundo prato, frutas e papas não comerciais, das quais 121 se encontravam contaminadas. Verificou-se que o grupo das papas não comerciais foi o que apresentou concentrações médias mais elevadas (134,2 µg/Kg) e o teor máximo de 350 µg/Kg, sendo as concentrações mais baixas encontradas nas sopas com um valor médio de 32,19 µg/Kg. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos para a alimentação infantil comercial, evidenciando a possível ausência do risco promovido pelo Ni em alimentos de confeção caseira para bebés.

Utilizando os resultados médios e o pior cenário, conclui-se que a ingestão diária tolerável (13 µg/kg) não foi ultrapassada para as diferentes faixas etárias.

**Palavras-chave:** Níquel, alimentação infantil, exposição humana ao níquel, espectrometria de absorção atômica em câmara de grafite, avaliação do risco.

## Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Abstract .....	iii
Resumo .....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas .....	ix
Objetivos .....	xi
Parte I - Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. Introdução .....	2
1.2. Alimentação para crianças .....	4
1.2.1. Alimentação láctea exclusiva.....	4
1.2.2. Diversificação alimentar e alimentação nos 2º e 3º anos de vida.....	5
1.2.3. Alimentação e necessidades nutricionais .....	7
1.2.4. Segurança dos alimentos fornecidos .....	9
1.3. Metais pesados.....	9
1.3.1. Níquel.....	10
1.3.1.1. Caracterização .....	10
1.3.1.2. Ocorrência .....	11
1.3.1.3. Exposição ao níquel .....	12
1.3.1.4. Toxicidade .....	13
1.4. Legislação .....	14
1.5. Metodologias analíticas para a determinação de metais .....	15
1.5.1. Espectrometria de absorção atômica em câmara de grafite.....	16
1.6. Metodologias analíticas para a determinação de Níquel em alimentos .....	19
1.7. Ocorrência de níquel em alimentos .....	22
Parte II - Parte Experimental.....	28
2.1. Material e Métodos Analíticos .....	29
2.1.1. Amostragem .....	29
2.1.2. Reagentes e material.....	30
2.1.3. Soluções.....	30
2.1.4. Equipamentos .....	30
2.2. Procedimento experimental .....	31
2.2.1. Pesagem / Mineralização por incineração .....	31
2.2.2. Deteção e Quantificação .....	32

2.2.3. Validação da metodologia analítica .....	33
2.2.3.1. Ensaio em branco .....	33
2.2.3.2. Linearidade .....	33
2.2.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação .....	34
2.2.4. Análise Estatística .....	34
2.2.5. Cálculo da ingestão diária estimada.....	35
2.3. Resultados e Discussão .....	36
2.3.1. Desempenho analítico .....	36
2.3.2. Ocorrência de Ni em alimentos de confeitaria .....	37
2.3.2.1 Discussão dos resultados e comparação com outros estudos.....	43
2.4. Avaliação do Risco.....	47
3. Conclusão .....	50
4. Referências bibliográficas.....	51
5. Anexo .....	57



## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema de um equipamento de GFAAS (Adaptado de Vandervoet e Riddle, 1993) .....	18
<b>Figura 2:</b> Atomizador de câmara de grafite (Adaptado de Csuros e CSuros, 2002) .....	19
<b>Figura 3:</b> Técnica utilizada na preparação da amostra .....	32
<b>Figura 4:</b> Linearidade em padrão .....	36
<b>Figura 5:</b> Linearidade em amostras fortificadas .....	37
<b>Figura 6:</b> Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nos grupos gerais de alimentos. ....	38
<b>Figura 7:</b> Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni em sopas.....	39
<b>Figura 8:</b> Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nos subgrupos dos purés de legumes. ....	40
<b>Figura 9:</b> Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nas refeições principais. ....	41
<b>Figura 10:</b> Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nos subgrupos das refeições principais.....	42
<b>Figura 11:</b> Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nas refeições principais, independentemente da idade. ....	42
<b>Figura 12:</b> Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nas sobremesas. ....	43

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Recomendações energéticas para crianças aos seis meses, primeiro e segundo anos de vida (Rêgo <i>et al.</i> , 2019).....	8
<b>Tabela 2:</b> Alimentos com alto teor em níquel ou que podem agravar a dermatite induzida pela ingestão de níquel (Carrapatoso <i>et al.</i> , 2004) .....	13
<b>Tabela 3:</b> Métodos analíticos para a determinação de metais em alimentos .....	20
<b>Tabela 4:</b> Frequência e teores ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) de Ni em diferentes tipos de alimentos em vários países .....	23
<b>Tabela 5:</b> Total de amostras analisadas por faixa etária e refeição.....	29
<b>Tabela 6:</b> Programa de temperatura da câmara de grafite .....	33
<b>Tabela 7:</b> Ingestão alimentar diária de acordo com a faixa etária (Direção-Geral da Saúde, 2006; Rêgo <i>et al.</i> , 2019).....	35
<b>Tabela 8:</b> Consumo diário estimado de níquel (EDI) e avaliação de risco para as diferentes faixas etárias usando concentrações médias e o pior cenário .....	47

## Lista de Abreviaturas

Al – Alumínio

As – Arsénio

Ba – Bário

Cd – Cádmió

Co – Cobalto

Cr – Crómio

Cu – Cobre

DGS – Direção-Geral da Saúde

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EDI – *Estimated Daily Intake* (Ingestão Diária Estimada)

EFSA – *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)

ESPGHAN – *European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* (Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição)

FAO – *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)

Fe – Ferro

FAAS – *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atómica com chama)

GFAAS – *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atómica com câmara de grafite)

Hg – Mercúrio

HGAAS – *Hydride Generator Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atómica com gerador de hidretos)

HNO<sub>3</sub> – Ácido Nítrico

IARC – *International Agency of the World Health Organization for Cancer Research* (Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Cancro)

ICP-AES – *Inductively Coupled Plasma-Emission Spectrometry* (Espectrometria de Emissão com plasma indutivo acoplado)

ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (Espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado)

LMS – Limite Máximo de Resíduo

LOD – *Limit of detection* (Limite de Deteção)

LOQ – *Limit of quantification* (Limite de Quantificação)

ml – Mililitros

Mn – Manganésio

Mo – Molibdénio

Na – Sódio

Ni – Níquel

Pb – Chumbo

Sb – Antimónio

Se – Selénio

SPE – Extração em fase sólida

Sn – Estanho

TDI – *Tolerable Daily Intake* (Ingestão Diária Tolerável)

UE – União Europeia

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

Zn – Zinco

µg – Micrograma

## **Objetivos**

O presente estudo tem como objetivo determinar os teores de níquel em alimentos de confecção caseira e estabelecer uma comparação com os resultados obtidos num estudo que analisou alimentos infantis comerciais, de forma a averiguar possíveis fatores de contaminação.

Pretende-se também verificar a existência de diferenças entre os grupos de alimentos analisados, bem como avaliar o risco de exposição, calculando o consumo diário estimado para crianças até aos dois anos de idade, comparando os valores encontrados com a ingestão diária tolerável.

## **Parte I - Revisão Bibliográfica**

## **1.1. Introdução**

A poluição industrial, tecnológica, agrícola e mineira, bem como a utilização indiscriminada de diversos fertilizantes químicos no solo tem impacto negativo ao nível das águas, plantas, animais e alimentos, na alteração na sustentabilidade da cadeia trófica e consequente potenciação de problemas de saúde graves no Homem e nos animais (Londoño-Franco e Londoño-Muñoz, Muñoz-García, 2016).

De acordo com o Regulamento (CEE) N° 315/93 do Conselho de 8 Fevereiro de 1993, que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios, entende-se por contaminante «qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada a um género alimentício mas nele esteja presente como resíduo da produção (incluindo os tratamentos aplicados às culturas e ao gado e na prática da medicina veterinária), fabrico, processamento, preparação, tratamento, acondicionamento, embalagem, transporte ou armazenagem do referido alimento ou em resultado de contaminação ambiental.» Os contaminantes nocivos para a saúde humana e animal incluem uma série de compostos, de como são exemplo, os metais, as micotoxinas, os nitratos, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ou as dioxinas e policlorobifenilos (PCB) (Reg. n°1881/2006; Vragović, 2005).

As doenças transmitidas por alimentos continuam a ser um problema real tanto nos países desenvolvidos, como nos em desenvolvimento, com consequências na saúde e economia. Estima-se que até um terço da população dos países desenvolvidos possa ser afetada por doenças transmitidas por alimentos a cada ano e que o problema seja provavelmente mais acentuado nos países em desenvolvimento, onde doenças diarreicas transmitidas por alimentos e água matam cerca de 2,2 milhões de pessoas a cada ano, na sua maioria crianças (Vragović, 2005). A presença de contaminantes nos alimentos e água pode causar doenças agudas ou efeitos adversos a longo prazo na saúde. No caso particular dos metais, estes também são de grande preocupação ambiental devido à sua toxicidade e comportamento cumulativo (Yusuf, Arowolo e Bamgbose, 2003). No que refere à suscetibilidade dos grupos, as crianças são mais suscetíveis à exposição a contaminantes do que os adultos devido à maior ingestão de alimento por peso corporal (Paiva, Morgano e Arisseto-Bragotto, 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma nutrição adequada durante a infância é essencial para garantir o crescimento, a saúde e o desenvolvimento das crianças em todo o seu potencial. As recomendações globais para a alimentação infantil ideal incluem amamentação exclusiva até aos seis meses e alimentação complementar nutricionalmente adequada e segura a partir dos seis meses de idade, com amamentação contínua até aos dois

anos de idade. As fórmulas lácteas são geralmente recomendadas como substitutos do leite humano quando ocorrem problemas na amamentação (Paiva, Morgano e Arisseto-Bragotto, 2019).

Aquando da diversificação alimentar, sabe-se que as matérias-primas utilizadas na preparação de alimentos destinados a bebés e crianças pequenas, como leite, vegetais, frutas e cereais, podem conter uma série de elementos químicos com propriedades tóxicas. Além disso, contaminantes inorgânicos resultantes da produção e do processamento e confeção podem contribuir para um acréscimo dos teores e, conseqüentemente comprometer a segurança dos alimentos para bebés (Paiva, Morgano e Arisseto-Bragotto, 2019; Ventura *et al.*, 2016). Estes incluem elementos comumente conhecidos como 'metais pesados', nomeadamente cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) e outros como alumínio (Al), cobre (Cu), zinco (Zn) e níquel (Ni) (Paiva, Morgano e Arisseto-Bragotto, 2019). Os potenciais efeitos tóxicos dos elementos acima mencionados em bebés e crianças pequenas estão bem documentados na literatura e incluem diminuição do quociente de inteligência e deficiências no desenvolvimento dos sistemas nervoso, reprodutivo, digestivo, respiratório e imunológico (Paiva, Morgano e Arisseto-Bragotto, 2019).

O Ni é um metal de ocorrência natural, amplamente distribuído no meio ambiente, podendo ser encontrado no ar, na água e no solo, sob várias formas minerais. Este metal é também utilizado numa vasta variedade de processos metalúrgicos, como a galvanoplastia e produção de ligas e está presente numa ampla gama de produtos de consumo. Assim sendo, as concentrações ambientais de Ni têm origem em causas naturais e antropogénicas, estimando-se que a taxa de emissão antropogénica seja 1,4 a 1,8 vezes superior à taxa de emissão natural (EFSA, 2015).

O Ni é um micronutriente essencial para plantas superiores e algumas espécies animais, mas não existem dados que comprovem que seja essencial para o Homem (EFSA, 2015).

Comparativamente a outros metais, a toxicidade do Ni depende da exposição e da solubilidade do composto. O trato respiratório e a pele são as principais vias de exposição para a toxicidade induzida por Ni na população. Os compostos de Ni são cancerígenos para os humanos após inalação, causando cancro do pulmão, cavidade nasal e seios paranasais (IARC, 2012). A dermatite de contacto alérgica é o efeito mais prevalente do Ni na população em geral (EFSA, 2015).

Os alimentos e a água constituem as principais fontes de exposição para a população em geral não fumadora (Ventura *et al.*, 2016). No Homem, a absorção de Ni pelo trato gastrointestinal



pode variar entre 1% a 40%, dependendo da forma química e composição da dieta (EFSA, 2015). De acordo com a literatura, o consumo de alimentos ricos em Ni pode provocar reações eczematosas na pele em indivíduos sensibilizados (Carrapatoso *et al.*, 2004; EFSA, 2015; Ventura *et al.*, 2016).

O Ni é capaz de atravessar a placenta e a exposição oral a compostos solúveis de Ni está associada a efeitos tóxicos no desenvolvimento do embrião ou feto de animais experimentais, no entanto, não se verificou a existência de tumores em animais que tenham recebido compostos solúveis de Ni por via oral (EFSA, 2015).

Segundo a evidência científica, a Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Cancro classifica alguns compostos de Ni como agentes carcinogénicos para a saúde humana (Grupo I) (IARC, 2012). Atuando o Ni mais como um promotor do que como indutor da carcinogénese, mecanismos da interação dos compostos de Ni com o Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e as proteínas celulares ainda não estão completamente esclarecidos (Ventura *et al.*, 2016).

Atualmente existe regulamentação da UE em relação aos níveis máximos de Ni em alimentos, que é de 13 µg/kg de peso corporal (Schrenk *et al.*, 2020). Para a água potável, a Diretiva 98/83/ CE do Conselho estabelece um valor paramétrico de 20 µg/ L na água destinada ao consumo humano (EFSA, 2015).

A crescente contaminação do ambiente, alimentos e água por metais, nomeadamente o Ni, constitui uma séria ameaça a todo o ecossistema incluindo à saúde humana, tornando-se de extrema importância a continuidade dos estudos no que concerne a esta temática.

## **1.2. Alimentação para crianças**

### **1.2.1. Alimentação láctea exclusiva**

Nos primeiros meses de vida a velocidade de crescimento do lactente é muito elevada, o que implica que as necessidades nutricionais por kg de peso sejam também maiores. Sendo um correto suprimento destas necessidades fundamental para maximizar o seu potencial de crescimento (Rêgo *et al.*, 2019).

O leite materno é o alimento ideal para suprir as necessidades nutricionais do lactente, sendo recomendado o aleitamento materno em exclusivo durante o primeiro semestre de vida (Aggett, 2010; ESPGHAN Committee *et al.*, 2009; World Health Organization (WHO), 2001). A partir dos 6 meses de vida, o leite materno em exclusivo não consegue suprir adequadamente as necessidades nutricionais do lactente, tornando-se necessária a introdução progressiva de outros alimentos, enquanto se mantém o leite materno (Rêgo *et al.*, 2019).

Por parte das comissões de nutrição (ESPGHAN, 2017; Comissão de Nutrição da SPP, 2012) e pela OMS (WHO, 2009) é unânime que o lactente pode ser exclusivamente amamentado durante os primeiros 6 meses de idade, devendo a amamentação manter-se a par da diversificação alimentar e durante a introdução na dieta familiar, ou seja, até aos 12-24 meses (Rêgo *et al.*, 2019). Durante o primeiro semestre de vida, caso o leite materno se torne insuficiente, a alimentação deve continuar a ser exclusivamente láctea, devendo utilizar-se fórmulas infantis, com composição similar à do leite humano, em complementaridade ou em alternativa (Hojsak *et al.*, 2018).

No entanto, para garantir um crescimento e desenvolvimento ótimos, alguns lactentes poderão necessitar de introduzir outros alimentos antes dos 6 meses, como complemento do leite. Ao período durante o qual decorre a introdução de outros alimentos na dieta do lactente, para além do leite (materno ou fórmula infantil), em simultâneo com a redução gradual do aporte lácteo e até à introdução no modelo da dieta familiar, denomina-se “diversificação alimentar” (EFSA, 2009; Rêgo *et al.*, 2019; World Health Organization (WHO), 2002). Assim, a introdução de outros alimentos, para além do leite, constitui um período importante para o treino de paladares, texturas e modulação comportamental (Rêgo *et al.*, 2019).

### **1.2.2. Diversificação alimentar e alimentação nos 2º e 3º anos de vida**

O segundo semestre de vida é caracterizado por uma redução da velocidade de crescimento e um aumento da atividade física espontânea, que resultam na necessidade de redistribuir os macronutrientes (proteína, hidratos de carbono e gordura) da dieta, no sentido de um aumento da percentagem de hidratos de carbono e uma redução das necessidades em proteína. Assim sendo, e como referido anteriormente, uma alimentação exclusivamente láctea não supre, por si só, as necessidades energéticas e em alguns micronutrientes (ferro (Fe), zinco (Zn), vitaminas do complexo B entre outros), tornando-se necessária a diversificação alimentar. Esta etapa constitui um momento importante no crescimento de uma criança, quer numa perspetiva de família quer da própria criança, e pode desempenhar um papel determinante na saúde futura (Alvisi *et al.*, 2015).

A Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) recomenda que a introdução de outros alimentos se inicie entre a décima sétima e a vigésima sexta semanas, ou seja, entre os 4 meses e 1 semana e os 6 meses e 1 semana, devendo,

dentro de certos limites, respeitar as tradições e as características culturais do agregado familiar (Rêgo *et al.*, 2019).

A oferta alimentar durante esta fase deve ser de qualidade e variada, com alimentos que integram a “Roda dos Alimentos”, não devendo ser oferecidos alimentos processados (ex: bolachas) nem com adição de açúcar (ex: sumos, sobremesas, bolos, doces) ou sal (ex: enchidos), sendo estes dois aditivos (sal e açúcar) proibidos durante o 1º ano de vida (Rêgo *et al.*, 2019).

O 1º grupo de alimentos a ser introduzido será o dos hortofrutícolas ou o dos cereais, ou seja, o creme de legumes ou a papa ou ainda a fruta. A introdução do creme de legumes em primeiro lugar parece constituir, tendo em conta a literatura, uma boa opção, dado o baixo valor calórico e a riqueza em vitaminas, minerais e fibra, tornando-se também uma alternativa vantajosa no treino do paladar para um alimento não-doce e não lácteo (Rêgo *et al.*, 2019; Silva e Aguiar, 2011; SPP, 2012).

Em contrapartida, a papa apresenta um valor calórico superior, sendo fonte de hidratos de carbono, proteína vegetal e fornecedor de vitaminas e minerais, nomeadamente o Fe, através do seu enriquecimento. Por este motivo, e de forma a reduzir o risco de ferropenia ou anemia ferropriva prevalentes nesta fase do crescimento, a oferta em exclusivo de papas de cereais biológicas, não enriquecidas em vitaminas e minerais, ou de papas caseiras (preparadas com mistura livre de cereais, com ou sem fruta adicionada, e não quantificada sob o ponto de vista nutricional) não se torna benéfica, pela insegurança nutricional associada à não quantificação dos macronutrientes e dos micronutrientes. No que respeita à introdução do glúten, tendo em conta as atuais recomendações ESPGHAN, este deve ser introduzido a partir dos 4 meses e antes dos 7 meses, com porções crescentes até aos 12 meses (Rêgo *et al.*, 2019; Silva e Aguiar, 2011; SPP, 2012).

No que diz respeito à fruta, esta deve ser utilizada como sobremesa das refeições principais ou integrada num lanche, complementando-o. Frutas como a maçã, a pera e a banana podem ser as primeiras a serem introduzidas, devendo ser oferecidas moídas e preferencialmente cruas, de forma a preservar as vitaminas termolábeis. Progressivamente, todas podem ser oferecidas, excetuando, pelo menos durante o primeiro ano de vida, o kiwi, o morango e o maracujá, por possuírem grânulos libertadores de histamina e poderem mais facilmente estar associados a reação alérgica (SPP, 2012).

A proteína animal (não láctea) deve ser introduzida ao 6º mês, iniciando-se com carnes de aves (frango, peru, avestruz) ou de coelho, menos ricas em Fe do que as carnes de bovino,

mas também com menor teor de gordura saturada. Relativamente ao peixe, inicia-se a oferta com peixes magros, tais como pescada, linguado, solha ou faneca, sendo recomendada mais tardiamente a introdução do salmão, que devido ao seu elevado teor de gordura poderá determinar intolerância digestiva, e do bacalhau, pela textura fibrosa e teor de sal (Rêgo *et al.*, 2019; SPP, 2012).

As leguminosas (feijão, grão, fava, lentilha e ervilha) poderão ser introduzidas aos 8-9 meses, de acordo com tolerância, assim como o ovo. Atendendo ao risco de alergenicidade do ovo, a sua introdução pode ser gradual, iniciando-se com a oferta da gema e posteriormente o ovo inteiro, sempre em vez da carne ou do peixe (Rêgo *et al.*, 2019; Silva e Aguiar, 2011).

O iogurte poderá ser introduzido a partir dos 8-9 meses, como alternativa a incluir num lanche e deverá ser natural, sem aromas e sem adição de açúcar (Rêgo *et al.*, 2019; Silva e Aguiar, 2011).

Após o primeiro ano de vida e terminada a introdução gradual de todos os alimentos, as crianças devem integrar a dieta familiar, com uma oferta alimentar mais variada, de forma a promover a familiarização com o máximo de sabores e texturas (Rêgo *et al.*, 2019).

O 2º e 3º anos de vida são caracterizados por uma desaceleração da velocidade de crescimento acompanhada de menores necessidades nutricionais e, conseqüentemente, menos apetite. Por este último motivo, será mais fácil satisfazer as necessidades dos diferentes nutrientes e garantir o equilíbrio nutricional, conjugando alimentos diferentes (Rêgo *et al.*, 2019).

### **1.2.3. Alimentação e necessidades nutricionais**

Por definição, as “necessidades nutricionais” correspondem ao aporte suficiente de nutrientes para suprir as necessidades fisiológicas, ou seja, a quantidade de nutrientes necessários para assegurar o melhor crescimento e composição corporal, por grupo etário, tendo em conta a atividade física e social (Rêgo *et al.*, 2019). Assim, o excesso ou o déficit do aporte calórico, associado ou não a desequilíbrios dos nutrientes fornecidos, que se traduz pelo incumprimento das necessidades nutricionais, pode, a curto prazo, comprometer o crescimento e o desenvolvimento, mas também a longo prazo comprometer a saúde (EFSA, 2009; Rêgo *et al.*, 2019).

As recomendações nutricionais são um conjunto de valores de referência para a energia e os nutrientes estimados para populações de indivíduos saudáveis. A literatura recente indica que as recomendações da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) são as mais

atuais e as que mais se adequam à população pediátrica portuguesa (EFSA, 2009; Rêgo *et al.*, 2019). Na Tabela I são apresentadas as necessidades médias em energia para crianças nos primeiros seis meses de vida e nos primeiro e segundo anos (Rêgo *et al.*, 2019).

**Tabela I:** Recomendações energéticas para crianças aos seis meses, primeiro e segundo anos de vida (Rêgo *et al.*, 2019)

Idade	Ingestão calórica (Kcal/ dia)	
	Masculino	Feminino
6 meses	636	573
1 ano	777	712
2 anos	1028	946

Como mencionado anteriormente, a ESPGHAN recomenda que a diversificação alimentar se inicie entre os 4 e os 6 meses, existindo, nesse momento, a substituição de uma refeição à base de leite por um caldo ou puré de legumes de três ou quatro hortícolas, com inclusão de batata e sem adição de sal. Simultaneamente ao puré de legumes inclui-se a fruta como sobremesa, nomeadamente maçã ou pera, previamente cozidas e reduzidas a puré, ou banana triturada. A partir dos 5 meses, para além do puré de legumes e da sobremesa de fruta, inclui-se uma refeição de papa de cereais preparada com o leite materno/fórmula infantil (papas não lácteas) ou com água (papas lácteas) (ESPGHAN Committee *et al.*, 2009; Rêgo *et al.*, 2019; Silva e Aguiar, 2011).

Aos 6 meses inicia-se a introdução das carnes de aves (frango, peru), coelho e borrego, numa quantidade de cerca de 30 g/dia, no final da cozedura da sopa, terminando a refeição com a fruta. O peixe, inicialmente magro (ex.: pescada, linguado, abrótea), também pode ser oferecido a partir do 7º mês. Entre os 8 e os 9 meses pode incluir-se o iogurte, que deve ser natural, sem aroma e sem natas, em substituição de uma refeição de leite ou papa. Nesta altura já é recomendada a oferta de duas refeições (almoço e jantar) constituídas por puré de legumes com carne ou peixe e sobremesa de fruta e uma terceira refeição constituída por papa de cereais e/ou iogurte, sendo que as restantes são constituídas por leite materno ou transição. No que respeita ao ovo, recomenda-se a oferta de uma gema por semana, a partir dos 9 meses, em substituição da carne ou do peixe numa refeição, progredindo para um ovo inteiro.

Entre os 9 e os 10 meses pode iniciar-se a oferta, ao almoço e jantar, do primeiro e segundo prato, sendo recomendado retirar a carne, o peixe ou o ovo da sopa (EFSA, 2009; Rêgo *et al.*, 2019; Silva e Aguiar, 2011; SPP, 2012).

Após o primeiro ano de vida recomenda-se a integração da criança na alimentação familiar, sendo que esta deve manter os pressupostos de uma alimentação saudável, equilibrada e variada. O recurso ao sal deve ser minimizado e o açúcar evitado até aos 2 anos de vida (EFSA, 2009; Rêgo *et al.*, 2019; Silva e Aguiar, 2011; SPP, 2012).

#### **1.2.4. Segurança dos alimentos fornecidos**

As crianças e lactentes, através da dieta, estão sujeitos a uma maior exposição a contaminantes, quando comparados com outros grupos etários (Ikem *et al.*, 2002; Kazi *et al.*, 2010; Pandelova *et al.*, 2012). Por este motivo, os alimentos oferecidos devem ser preparados e disponibilizados de forma segura, de modo a minimizar o risco de contaminação (Rêgo *et al.*, 2019).

Ao longo do crescimento e desenvolvimento no primeiro ano de vida, as necessidades energéticas e o consumo de alimentos por parte das crianças e lactentes relativamente ao peso corporal são, em média, mais elevados que nos adultos, a par da maior vulnerabilidade fisiológica que apresentam face aos efeitos provocados pela ingestão de alimentos contaminados (Ikem *et al.*, 2002; Kazi *et al.*, 2010; Pandelova *et al.*, 2012). A vulnerabilidade das crianças e adolescentes é justificada pelo desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos e pelo estado imaturo das vias metabólicas, nos primeiros anos de vida, que dificultam a metabolização e a excreção de contaminantes, que tendem a acumular-se no organismo. A maior quantidade de alimento ingerido por peso corporal também contribui para uma maior exposição aos contaminantes. Por este motivo, uma alimentação pouco segura pode provocar danos irreversíveis na sua saúde (Ikem *et al.*, 2002; Kazi *et al.*, 2010; Pandelova *et al.*, 2012).

Desta forma, a ingestão de alimentos é uma importante via de exposição a contaminantes, nomeadamente os metais pesados, não só por estes serem componentes naturalmente presentes nos alimentos, mas também devido à contaminação ambiental e à que decorre da sua produção e processamento (Martins *et al.*, 2009).

### **1.3. Metais pesados**

Os metais pesados são quimicamente definidos como um grupo de elementos situados entre o Cu e o Pb na tabela periódica, encontram-se naturalmente na crosta terrestre em

concentrações que tendem a permanecer baixas com uma densidade igual ou superior a 5 g/cm<sup>3</sup> ou cujo número atómico é superior a 20 (Hu *et al.*, 2018). Estes metais são quimicamente muito reativos e bioacumulam, ou seja, o organismo não é capaz de eliminá-los de uma forma rápida e eficaz (Peterson *et al.*, 2003).

As atividades antropogénicas, como são exemplo a indústria, agropecuária, utilização de fertilizantes e pesticidas, entre outros, constituem as formas mais comuns de contaminação do ambiente por metais pesados, que incorporam nos solos, ar, água e, conseqüentemente chegam à cadeia trófica atingindo o Homem através da inalação de poeiras e do consumo de água e alimentos contaminados (Pereira *et al.*, 2020). Por este motivo, a presença e concentração de metais tende a ser mais significativa em zonas urbanas, comparativamente a zonas rurais, onde o tráfego rodoviário é mais diminuído e não existe um grande número de indústrias (Pereira *et al.*, 2020; Yusuf, Arowolo e Bamgbose, 2003).

No que se refere ao efeito dos metais pesados, nem todos desempenham um papel prejudicial aos organismos vivos, desde microrganismos aos seres humanos, existindo determinados elementos que são essenciais para os sistemas biológicos. Assim, de acordo com Avila-Campos, pode fazer-se a seguinte classificação dos metais pesados: (i) micro-contaminantes ambientais: Pb, Cd, Hg, Al, titânio (Ti), estanho (Sn) e tungsténio (W); (ii) elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes: crómio (Cr), Zn, Fe, cobalto (Co) e Ni (Nakano e Avila-Campos, [s.d.]).

A toxicidade dos metais pesados pode causar impacto grave em vários órgãos e sistemas do corpo humano, como provocar danos no sistema nervoso central e afetar os tecidos dos pulmões, fígado e de outros órgãos vitais. Pode ainda despoletar hipersensibilidade e alergias, sendo que uma exposição frequente e prolongada no tempo a alguns metais está associada ao desenvolvimento de alguns tipos de cancro (EFSA, 2015).

Aproximadamente 90% da exposição humana a metais e outros contaminantes é feita através do consumo de alimentos contaminados (EFSA, 2015).

### **1.3.1. Níquel**

#### **1.3.1.1. Caracterização**

O Ni é um elemento químico, com o símbolo químico Ni e o 28º elemento na tabela periódica (Duda-Chodak e Błaszczuk, 2008). É um metal branco-prateado encontrado em vários estados de oxidação, sendo o 2º elemento mais abundante da Terra (Duda-Chodak e Błaszczuk, 2008; EFSA, 2015; Rehman *et al.*, 2018). Este metal existe na natureza em compostos de Ni solúveis

em água, como o acetato, cloreto e sulfato de Ni, ou em partículas insolúveis, em fumos e poeiras, como sulfitos, óxidos e silicatos de Ni. Os compostos de Ni solúveis e insolúveis também são encontrados nos solos e nas águas (Merian, 1984).

As propriedades físicas e químicas do Ni, como a baixa condutividade térmica e elétrica, alta resistência à corrosão e oxidação, excelente resistência e dureza em temperaturas elevadas e capacidade de magnetização, permitem a sua utilização numa ampla variedade de processos metalúrgicos, como galvanoplastia e produção de ligas, fabricação de aço inoxidável e de baterias (baterias de níquel-cádmio), produtos de petróleo, placas elétricas, entre outros produtos de consumo (EFSA, 2015).

O Ni é um micronutriente essencial para várias espécies animais, microrganismos e plantas, no entanto, a ausência de dados acerca da sua função biológica não permite comprovar que seja essencial para seres humanos (Cempel e Nickel, 2006; EFSA, 2015; Schnell *et al.*, 2009).

### **1.3.1.2. Ocorrência**

O Ni está amplamente distribuído na natureza, formando cerca de 0,008% da crosta terrestre e pode estar presente na água, no solo e no ar, constituindo cerca de 3% da Terra (Cempel e Nickel, 2006; EFSA, 2015; Rehman *et al.*, 2018).

O aumento dos níveis de Ni no meio ambiente tem origem em causas naturais, como poeiras provenientes de erupções vulcânicas e incêndios florestais e erosão de rochas e solos, ou antropogénicas, como a mineração, fundição, indústria, combustão de combustíveis fósseis e incineração de resíduos (EFSA, 2015; Rehman *et al.*, 2018).

Na água, o Ni deriva de ciclos biológicos e solubilização de compostos de Ni dos solos, bem como da sedimentação de Ni da atmosfera. A água não contaminada geralmente contém cerca de 300 ng/m<sup>3</sup> de Ni. Os solos agrícolas contêm aproximadamente 3-1000 mg de Ni por kg de solo, mas a concentração de Ni pode atingir até 24.000-53.000 mg/kg de Ni em solo próximo a refinarias de metal e em lodo seco, respetivamente. Com um pH inferior a 6,5 os compostos de Ni no solo são relativamente solúveis e a pH superior a 6,7, a maioria do Ni existe como hidróxidos insolúveis (Duda-Chodak e Błaszczuk, 2008).

A maior parte da produção de Ni é usada, como referido anteriormente, para a criação de aço inoxidável, ligas de Ni e Fe fundido de Ni que fazem parte da constituição de objetos como moedas, equipamentos elétricos, ferramentas, máquinas, armamento, joias e utensílios domésticos. Os compostos de Ni também são usados para galvanoplastia, eletroformação,



baterias alcalinas de níquel-cádmio, corante mordente, catalisadores e equipamentos eletrônicos. As ligas contendo Ni incluem revestimento de Ni de metais não preciosos, aço cirúrgico (0,5-30% Ni), ouro branco (10-15% Ni), prata alemã (10-15% Ni), soldas, revestimento em ouro duro e prata esterlina (Duda-Chodak e Błaszczuk, 2008).

Estima-se que a taxa de emissão antropogénica seja maior (1,4-1,8 vezes), comparativamente à taxa de emissão natural (EFSA, 2015).

A crescente industrialização, especificamente algumas atividades industriais, como fusão e soldagem de metais, bem como incineração de resíduos municipais são processos que contribuem para a liberação de metais pesados no ambiente e desta forma podem constituir um fator perigoso para a saúde humana (Duda-Chodak e Błaszczuk, 2008; Rehman *et al.*, 2018).

### **1.3.1.3. Exposição ao níquel**

A exposição humana ao Ni ocorre principalmente por ingestão, através dos alimentos e, em menor grau, via água potável, por inalação e absorção dérmica (EFSA, 2015; Pereira *et al.*, 2020).

A presença de Ni nos alimentos está habitualmente relacionada com a geoquímica natural dos solos, com a proximidade a áreas industrializadas, e também com o uso de agrotóxicos, fertilizantes e herbicidas. Além das fontes de contaminação ambiental, o processamento e o enlatamento de alimentos podem promover a transferência deste metal para os alimentos, uma vez que esses processos são realizados com recipientes de aço, que contêm Ni (Peeters *et al.*, 2017).

Por outro lado, os metais pesados são móveis e facilmente absorvidos pelas plantas no meio ambiente, sendo a hiperacumulação de Ni por algumas delas a causa da exposição dos herbívoros a este metal, aquando do seu consumo (Peterson *et al.*, 2003; Tuzen *et al.*, 2009). Assim sendo, os principais contribuintes para a exposição humana ao Ni são grãos e produtos à base de grãos, leguminosas, nozes e sementes oleaginosas e vegetais e produtos vegetais, incluindo fungos (EFSA, 2015).

As fontes de alimentos com teores de Ni elevados incluem flocos de aveia (1 mg/Kg), caju torrados (até 5 mg/Kg), cacau (até 12 mg/Kg), chocolate (até 6 mg/Kg), chá preto (5 mg/Kg), avelãs (4 mg/Kg), amêndoas (0,8 mg/Kg), produtos à base de soja (entre 2 a 6 mg/ Kg), legumes (2 mg/Kg) e bivalves, como o mexilhão (até 3 mg/Kg). A ingestão destes alimentos em maiores

quantidades pode contribuir para o aumento da ingestão diária de Ni em até 900 µg (Peeters *et al.*, 2017).

#### 1.3.1.4. Toxicidade

A toxicidade dos metais pesados pode ser discutida em termos de efeitos agudos ou crônicos, sendo que a maioria deles tem uma alta afinidade com o grupo de proteínas sulfidrilas e pode inibir mais de duzentas enzimas no sistema biológico. A exposição a longo prazo induz efeitos adversos em muitos órgãos do corpo humano, como hepatonefrotoxicidade e neurotoxicidade (Paiva, Morgano e Ariseto-Bragotto, 2019).

Quimicamente, os metais na sua forma iônica podem ser muito reativos e interagir amplamente com os sistemas biológicos ou atuar diretamente como centros catalíticos para reações oxidorreduzidas com o oxigênio molecular ou outros oxidantes endógenos, produzindo modificações oxidativas de biomoléculas, como são exemplo as proteínas e o DNA (Paiva, Morgano e Ariseto-Bragotto, 2019).

De acordo com a IARC, o Ni e os compostos de Ni foram classificados como carcinogênicos humanos (Grupo 1), causando cancro do pulmão, cavidade nasal e seios paranasais (EFSA, 2015; International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012). Além disso, o Ni pode causar ou agravar alergias cutâneas (eczema e dermatite) e doenças do sistema cardiovascular (Denkhaus e Salnikow, 2002; Doreswamy, Shrilatha e Rajeshkumar, 2004; Jellesen, Rasmussen e Hilbert, 2006). De acordo com Carrapatoso *et al.* (2004), a ingestão de alimentos contendo teores mais altos de Ni (Tabela 2) conduz à ocorrência de episódios de exacerbação da dermatite.

**Tabela 2:** Alimentos com alto teor em níquel ou que podem agravar a dermatite induzida pela ingestão de níquel (Carrapatoso *et al.*, 2004).

Frutas frescas: Pera, cerejas, pêssigo, banana.

Todos os frutos secos.

Leguminosas: Soja, amendoim, ervilha, feijão.

Verduras/ Hortícolas: Espargo, cebola, alface, couve, espinafres, tomate, salsa, cogumelos.

Todos os cereais.

Produtos lácteos: Soro do leite, queijo, manteiga.

Peixes: Arenque, atum, sardinha, cavala.

Crustáceos: Lagosta, camarão, caranguejo, ostras, mexilhão.

Molhos: *Ketchup*, vinagre, soja.

Bebidas: Café, chá, cacau, sumos de fruta (especialmente frutos ácidos), vinho, cerveja.

Outros alimentos: Fermento em pó, alimentos enlatados, vegetais conservados, todos os alimentos cozinhados em utensílios de níquel.

#### **1.4. Legislação**

O Ni é um metal abundante na superfície da Terra e amplamente utilizado em diversos objetos, que em contacto direto e prolongado com a pele pode causar hipersensibilidade e conduzir a reações alérgicas (EFSA, 2015). Desta forma, o Parlamento Europeu e o Conselho Europeu emitiram, em 30 de junho de 1994, a Diretiva 94/27/CE apelidada de "Diretiva do Níquel" que acrescentou este metal à lista de substâncias perigosas e impôs restrições à sua comercialização e utilização na União Europeia (Oficial *et al.*, 1994).

Mais recentemente, a União Europeia publicou a Recomendação (UE) 2016/1111 da Comissão, de 6 de julho de 2016, para que os Estados-Membros efetuassem a monitorização do Ni nos alimentos, na perspectiva de recolher dados sobre o teor deste metal nos alimentos que espelhasse a realidade dos vários Estados. Com base nesta recomendação os Estados-Membros devem, com a participação ativa dos operadores do setor alimentar e outras partes interessadas, proceder à recolha de dados de monitorização relativos à ocorrência de Ni nos alimentos e na água potável. A Comissão Europeia, para a adoção da recomendação, considerou ainda o Parecer Científico sobre os riscos para a saúde pública relacionados com a presença de Ni nos alimentos e na água potável. Este parecer identificou a toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento como o efeito crítico para a caracterização dos riscos da exposição oral crónica ao Ni e, quanto à exposição oral aguda identificou reações recrudescidas de eczema e agravamento de reações alérgicas (Recomendação (UE) da Comissão 2016/1111, 2016).

Assim sendo, de acordo com a Recomendação (UE) 2016/1111 da Comissão, a monitorização dos teores de Ni deve centrar-se em cereais, produtos à base de cereais, fórmulas para lactentes, fórmulas de transição, alimentos transformados à base de cereais destinados a lactentes e crianças jovens, alimentos para bebés, alimentos para fins medicinais específicos destinados especificamente a lactentes e crianças jovens, suplementos alimentares, leguminosas, frutos de casca rija e sementes oleaginosas. Mas também no leite e produtos lácteos, bebidas alcoólicas e não alcoólicas, açúcar e produtos de confeitaria (incluindo cacau e chocolate), frutas, produtos hortícolas e produtos derivados de produtos hortícolas (incluindo cogumelos), folhas secas de chá, partes secas de outras plantas para infusões de ervas e moluscos bivalves (Recomendação (UE) da Comissão 2016/1111, 2016).

Atualmente, no que respeita aos níveis máximos de Ni nos alimentos não existe regulamentação da UE, assim como também não se verifica limite regulamentar para a

libertação de Ni de materiais de contacto com alimentos. No entanto, o Conselho da Europa publicou recentemente um guia prático sobre metais e ligas utilizados em materiais e artigos para contacto com alimentos, que definiu um limite de libertação específica (SRL) para o Ni de 0,14 mg/kg (EDQM, 2013; EFSA, 2015).

Para a água potável, a Diretiva 98/83/CE do Conselho estabelece um limite máximo de resíduo (LMR) de 20 µg/L (EFSA, 2015a). Para alimentos não existe nenhum LMR estabelecido, no entanto, a OMS sugeriu uma ingestão diária tolerável (TDI) de 11 µg de Ni/kg de peso corporal (WHO, 2007; EFSA, 2015).

Em 2015, a EFSA recomendou um valor de TDI para o Ni de 2,8 µg de Ni/kg de peso corporal, demonstrando que esse valor podia não ser suficientemente protetor para indivíduos que apresentem sensibilidade a este metal e que, com base nos dados de ocorrência disponíveis, a exposição alimentar crónica levantava preocupações de saúde para todos os grupos de idade (EFSA, 2015).

Mais recentemente, a EFSA estabeleceu um novo valor de TDI para o Ni de 13 µg de Ni/kg de peso corporal, quase cinco vezes superior ao anterior. Esta nova TDI, que sugere uma menor toxicidade do Ni, contraria a afirmação de 2015 da mesma agência que afirmava que o valor de 2,8 µg de Ni/kg de peso corporal não seria suficientemente protetor (Schrenk *et al.*, 2020).

De acordo com a opinião do Painel da EFSA sobre contaminantes na cadeia alimentar, tanto os EUA como o Canadá não têm estabelecido um limite regulamentar ou padrão de qualidade para Ni em água potável. Considerando as diretrizes australianas para a água potável, a concentração de Ni não deve exceder 20 µg/L (EFSA, 2015).

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

A literatura existente descreve várias metodologias analíticas utilizadas para a determinação de metais. As técnicas mais comuns são a espectrometria de absorção atómica em câmara de grafite (GFAAS), a espectrometria de absorção atómica por chama (FAAS) espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS) ou espectrometria de emissão com plasma indutivo acoplado (ICP-AES). Alguns autores sugerem ainda, antes das medições, uma etapa de extração em fase sólida (SPE), de forma a promover uma separação e pré-concentração do metal na amostra (EFSA, 2015; Ozdemir, Kilinc e Oner, 2019; Paiva, Morgano e Arisseto-Bragotto, 2019; Tuzen *et al.*, 2009).

A Espectrometria de Absorção Atômica (EAA) é uma das técnicas mais utilizadas para efetuar a detecção qualitativa e a determinação quantitativa de metais, recorrendo à absorção de radiação pelos átomos no seu estado gasoso. A incidência de radiação com um comprimento de onda específico permite que átomos livres, no seu estado fundamental, absorvam essa radiação e transitem para um estado excitado. Através da medição da quantidade de radiação absorvida, que será dependente da concentração, pode-se determinar quantitativamente o elemento presente. Este método, pela elevada sensibilidade e especificidade, torna-se adequado para a análise de metais que se encontrem presentes em concentrações vestigiais (Costa, 2013; Xu *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de um sistema de absorção atômica implica o recurso a uma fonte de radiação, cujo espectro de emissão é de riscas, combinada a sistemas óticos de alta resolução. Em EAA, a fonte de radiação mais comumente utilizada é a lâmpada de cátodo oco que emite seletivamente as radiações de comprimento de onda específico do elemento a ser determinado (Freschi *et al.*, 2000; Slavin, 1988).

Entre as várias metodologias analíticas mencionadas, a técnica analítica de GFAAS é considerada um dos métodos mais sensíveis, simples, rápido e de baixo custo para a quantificação de Ni (Pereira *et al.*, 2020).

Em matriz orgânica a determinação da concentração de Ni por GFAAS requer a preparação prévia da amostra. Esta preparação consiste na dissolução da amostra, através de um processo de oxidação que pode ocorrer mediante combustão (incineração a seco) ou digestão ácida (incineração por via húmida), com o objetivo de mineralizar a matéria orgânica presente na amostra (Paiva, Morgano e Ariseto-Bragotto, 2019).

### **1.5.1. Espectrometria de absorção atômica em câmara de grafite**

A GFAAS é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação quantitativa de metais (Costa, 2013; Freschi *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2020).

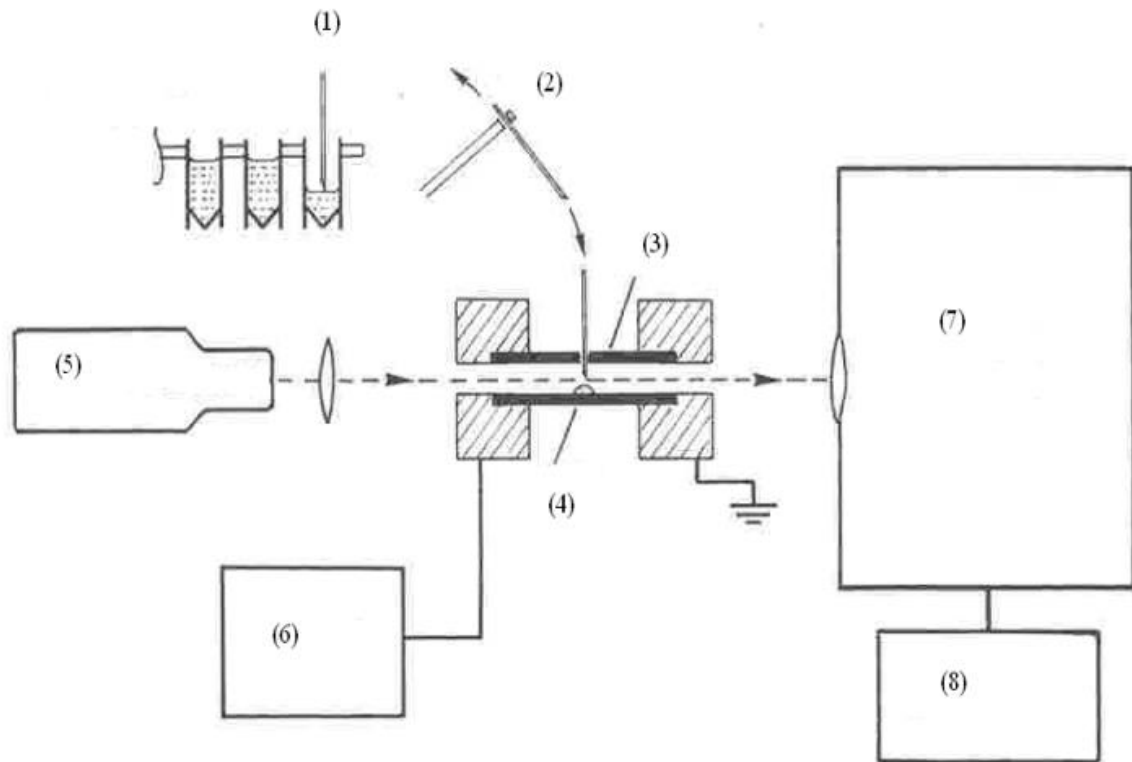
A amostra no estado líquido, suspensão ou sólida, é introduzida na câmara de grafite e sujeita a um aquecimento progressivo previamente programado. Dependendo do elemento em estudo e da matriz da amostra, determina-se, através de vários ensaios, a temperatura ideal a utilizar. A temperatura da câmara sobe à medida que a diferença de potencial aplicada nos seus extremos também aumenta. A precisão e exatidão dos resultados obtidos por esta técnica estão relacionados com o tempo e temperatura programados (Costa, 2013).

O desenvolvimento do método de análise por absorção atômica em câmara de grafite inclui um programa típico de temperaturas que compreende quatro etapas distintas, nomeadamente, secagem, pirólise, atomização e limpeza. A etapa de secagem da amostra tem como objetivo a evaporação do solvente, que ocorre através da passagem de um fluxo de gás inerte, o argon, no interior da câmara. Este procedimento deve ser realizado de modo suave, garantindo a não existência de projeções de amostra e, conseqüente, perda de conteúdo. Na fase de pirólise procede-se à mineralização dos componentes da matriz, com recurso a temperaturas altas e controladas, de forma a evitar a perda do elemento a analisar. Tal como na primeira fase, o fluxo de gás inerte mantém-se a funcionar para eliminar vapores de constituintes da matriz ou fumos. Na atomização, a produção do vapor atômico deve ser feita à temperatura mais baixa que corresponda à máxima atomização do elemento a analisar. Nesta fase o fluxo de gás inerte é interrompido, dado que o fluxo reduziria o tempo de residência dos átomos na câmara de grafite, e conseqüentemente a sensibilidade do método. Por fim, a etapa de limpeza tem como finalidade a eliminação de vapores para se proceder à próxima análise sem contaminações (Costa, 2013).

Dependendo das características do elemento em estudo pode tornar-se útil a utilização de modificadores de matriz, que são substâncias que têm como função alterar as propriedades seja do analito, seja da matriz, com o objetivo de estabilizar o analito, tornando-o menos volátil e assim efetuar a etapa da pirólise a temperaturas mais elevadas, reduzindo a probabilidade de ocorrência de interferências (Costa, 2013).

A introdução da amostra na câmara de grafite pode ser efetuada de forma manual, com recurso a uma micropipeta ou utilizando um sistema de amostragem automático, introduzindo uma quantidade de amostra que varia entre 1 e 100 $\mu$ L (Costa, 2013).

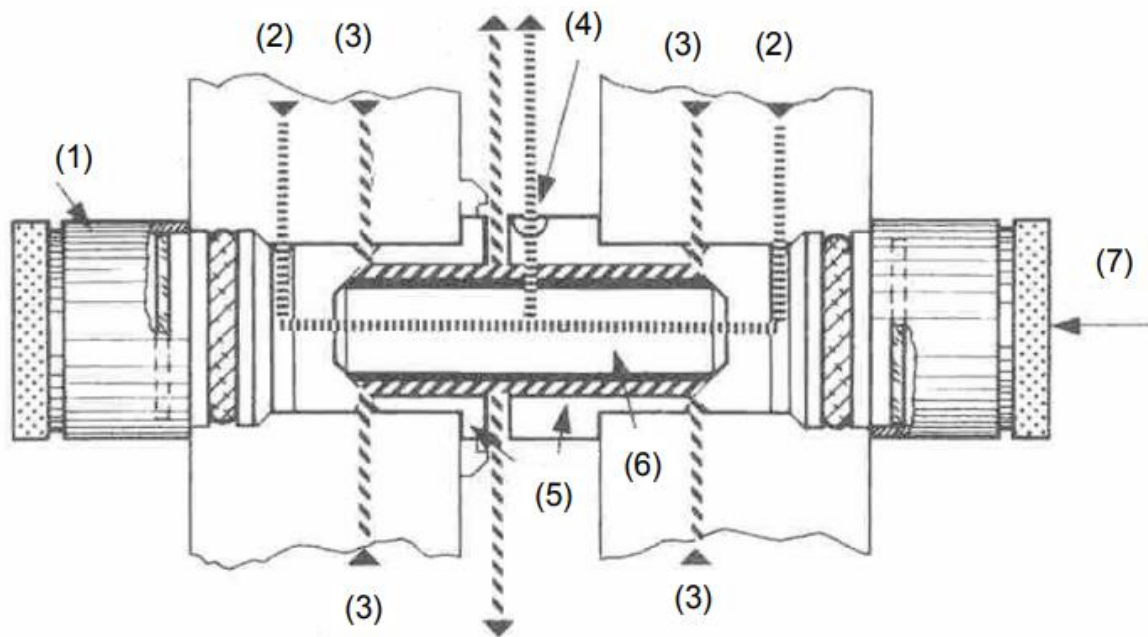
O esquema de instrumentação de GFAAS é representado na Figura 1, em que (1) corresponde ao amostrador automático, (2) capilar com amostra, (3) tubo de grafite/câmara, (4) amostra, (5) fonte de radiação: lâmpada de cátodo oco, (6) potência de abastecimento da câmara, (7) monocromador e (8) detetor (Vandervoet e Riddle, 1993).



**Figura 1:** Esquema de um equipamento de GFAAS (Adaptado de Vandervoet e Riddle, 1993).

A amostra é introduzida, com o auxílio de um capilar, na câmara de grafite, sendo submetida a um aquecimento progressivo (Vandervoet e Riddle, 1993).

O atomizador de câmara de grafite encontra-se representado na Figura 2, sendo composto pelos seguintes elementos: janela (1), fluxo de gás interno (2), fluxo de gás externo (3), local de injeção da amostra (4), contactos de grafite (5), tubo de grafite (6) e feixe de luz (7) (CSuros e CSuros, 2002).



**Figura 2:** Atomizador de câmara de grafite (Adaptado de Csuros e CSuros, 2002).

Os componentes de grafite encontram-se revestidos interna e externamente por um fluxo de gás, o argon, que minimiza a oxidação da câmara de grafite e previne a formação de óxidos metálicos. O fluxo de gás também elimina os vapores gerados pela matriz das amostras (Csuros e CSuros, 2002; Viets e O'Leary, 1992).

### **1.6. Metodologias analíticas para a determinação de Níquel em alimentos**

De acordo com a literatura recente, as metodologias analíticas mais frequentemente utilizadas na detecção e quantificação de Ni em alimentos são a FAAS (Campos *et al.*, 2010; Yebra, Cancela e Cespón, 2008) ou a GFAAS (Dobrowolski e Otto, 2012; Imyim, Daorattanachai e Unob, 2013; Kazi *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2020; Škrbić *et al.*, 2017) ou ainda ICP-MS (Cubadda e Raggi, 2005; Ozdemir, Kilinc e Oner, 2019; Zand *et al.*, 2012). Uma visão geral dos principais métodos analíticos usados em estudos recentes para a determinação de metais em alimentos é mostrada na Tabela 3.



**Tabela 3:** Métodos analíticos para a determinação de metais em alimentos.

<b>Matriz</b>	<b>Deteção e Quantificação</b>	<b>Contaminante</b>	<b>R (%)</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>	<b>Referências bibliográficas</b>
Peixe						
Moluscos bivalves						
Carne	FAAS	Ni	n.d.	120 µg/ kg	n.d.	(Yebra, Cancela e Cespón, 2008)
Leguminosas						
Cereais						
Sumos de fruta	FAAS	Zn, Ni, Pb, Fe, Cu, Cr, Na	95-102	200 µg/L	n.d	(Campos et al., 2010)
Papas e cereais infantis						
Purés de fruta	GFAAS	Ni	80	12,5 µg/ Kg	37 µg/ Kg	(Pereira et al., 2020)
Refeições prontas						
Fórmulas infantis						
Fórmulas de transição	GFAAS	As, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Sn	64-112	40 µg/ Kg	90 µg/ Kg	(Škrbić et al., 2017)
Papas						
Vegetais	GFAAS	Ni, Co	n.d.	20 µg/ kg	60 µg/ kg	(Dobrowolski e Otto, 2012)
Peixe (Robalo asiático)	GFAAS	Cd, Ni, Pb	81,9	n.d.	44,7	(Imyim, Daorattanachai e Unob, 2013)
Papas infantis	GFAAS	Al, Cd, Ni, Pb	97,1	0,2 µg/L	n.d.	(Kazi et al., 2010)
Cereais	ICP-MS	Cd, Cr, Fe, Ni, Pb	98	0,099 µg/L	n.d.	(Cubadda e Raggi, 2005)
Frutas	ICP-MS	Cu, Ni, Pb	n.d.	0,016 µg/L	0,055 µg/L	(Ozdemir, Kilinc e Oner, 2019)
Bolachas						
Alimentação comercial infantil	ICP-MS	As, Ba, Ni, Cd, Al, Hg, Se, Cr, Co, Cu, Mo, Mn, Pb, Sb	92	n.d.	80 µg/kg	(Zand et al., 2012)

n. d. – não disponível

Dependendo do método selecionado, verifica-se a existência de uma grande variação entre os valores obtidos para o limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Yebra, Cancela e Cespón (2008) determinaram, através de FAAS, a presença de Ni em amostras de peixe, moluscos bivalves, carne, leguminosas e cereais tendo obtido um LOD de 120 µg/Kg. Por outro lado, Campos *et al.* (2010), recorrendo também ao método FAAS, analisou sumos de fruta tendo determinado para o Ni um LOD de 200 µg/L, valor esse superior ao descrito no estudo anterior. Ambos os estudos não definiram valores para o LOQ. Škrbić *et al.* (2017), através do método GAAFS, determinaram a presença de Ni em fórmulas infantis, fórmulas de transição e papas, com valores de LOD e LOQ de 40 µg/Kg e 90 µg/Kg, respetivamente. No estudo de Pereira *et al.* (2020), onde foram analisadas papas e cereais infantis, purés de fruta e refeições comerciais prontas, obtiveram-se valores de 12,5 µg/Kg e 37 µg/Kg para o LOD e LOQ, respetivamente. Dobrowolski e Otto (2012), que analisaram vegetais, alcançaram para o LOD um valor de 20 µg/Kg e para o LOQ um valor de 60µg/Kg. Imyim, Daorattanachai e Unob (2013), determinaram um LOQ de 44,7 µg/Kg, para amostras de peixe, não tendo definido um valor para o LOD. Por último, kazi *et al.* (2010), que analisaram papas infantis, obtiveram um valor de LOD de 0,2 µg/L, não tendo definido um valor de LOQ. Como descrito anteriormente, os estudos que recorreram ao método GAAFS apresentaram valores de LOD que variaram de 0,2 µg/L a 40 µg/Kg e valores de LOQ que variaram entre 37 µg/Kg e 90 µg/Kg. Comparando os valores de LOD dos vários estudos mencionados, conclui-se que estes são inferiores quando se utiliza o método GAAFS. Estes resultados corroboram a maior sensibilidade deste método comparativamente ao FAAS (Costa, 2013). Cubadda e Raggi (2005), através do método ICP-MS, determinaram a presença de Ni em cereais, com um valor de LOD de 0,099 µg/L. Ozdemir, Kilinc e Oner (2019) que utilizaram ICP-MS para determinar a presença de Ni em frutas e bolachas obtiveram valores de 0,016 µg/L e 0,055 µg/L para o LOD e LOQ, respetivamente. Zand *et al.* (2012), analisaram alimentação comercial infantil e obtiveram, também através de ICP-MS, um valor de LOQ de 80 µg/Kg. Verificou-se que, com recurso ao ICP-MS, os valores do LOD variaram entre 0,016 µg/L e 0,099 µg/L, sendo estes resultados inferiores aos já mencionados. Quanto ao valor de LOQ, Zand *et al.* (2012) obteve um valor semelhante aos estudos que utilizaram o GAAFS.

No que respeita à percentagem de recuperação, o valor mais baixo é de 64% e o mais alto de 112%, tendo a maioria dos estudos percentagens acima dos 90% (Campos *et al.*, 2010; Cubadda e Raggi, 2005; Imyim, Daorattanachai e Unob, 2013; Kazi *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2020; Škrbić *et al.*, 2017; Zand *et al.*, 2012).

Em resumo, a literatura evidencia que existem vários métodos disponíveis e adequados a utilizar na determinação do Ni em alimentos, nomeadamente FAAS, GAAFS e ICP-MS (Recomendação (EU) 2016/1111, 2016; EFSA, 2015).

### **1.7. Ocorrência de níquel em alimentos**

Os alimentos são a principal fonte de ingestão de Ni pelo homem e, embora o Ni seja um elemento moderadamente tóxico, comparativamente a outros metais pesados sabe-se que pode causar problemas de saúde graves, nomeadamente cancro no sistema respiratório (Yebra, Cancela e Cespón, 2008). Além disso, o Ni pode causar eczema e, no caso de indivíduos mais sensíveis, estes tendem a apresentar sintomas sistémicos (cutâneos e / ou digestivos) relacionados com a ingestão de alimentos com alto teor de Ni (Yebra, Cancela e Cespón, 2008). Portanto, o conhecimento do teor de Ni nos alimentos assume um papel de destaque na garantia da segurança alimentar e saúde pública.

A crescente preocupação com a temática despoleta o interesse para o desenvolvimento de estudos que permitam determinar a ocorrência de Ni em alimentos. Atualmente, os dados constantes na literatura evidenciam a existência de um número crescente de trabalhos neste âmbito.

De acordo com vários estudos, as concentrações médias mais elevadas foram reportadas em cogumelos silvestres comestíveis, cacau e produtos à base de cacau (>10 mg/kg de peso seco), feijão, sementes, nozes e grãos (por exemplo, soja, 5,2 mg/kg; produtos de soja, 5,1 mg/kg; amendoim, 2,8 mg/kg; aveia, 2,3 mg/kg). Determinou-se ainda um conjunto de possíveis fatores que podem influenciar a concentração de Ni nos alimentos, nomeadamente o tipo de alimentos (caso se trate, por exemplo, de grãos, vegetais ou frutas), as condições de crescimento, especificamente o tipo de solo de cultivo, ou as técnicas de preparação de alimentos, onde se recorre a utensílios de cozinha que contêm Ni (EFSA, 2015).

Os dados de ocorrência de Ni em alimentos verificam-se não apenas na Europa, mas também na Índia, Nigéria e Paquistão (Tabela 4).

**Tabela 4:** Frequência e teores (µg/Kg) de Ni em diferentes tipos de alimentos em vários países.

País (Ano)	Tipo de alimento	Frequência (%)	Teores (µg/ kg)			Referências bibliográficas
			Min. – Máx.	Média		
Espanha (2012)	Alimentação comercial infantil	0	<LOD	<LOD		(Škrbić et al., 2017)
Espanha (n.d.)	Peixe			500-550 (p.s.)		
	Moluscos bivalves			430-970 (p.s.)		
	Carne	n.d.	n.d.	630-920 (p.s.)		(Yebra, Cancela e Cespón, 2008)
	Leguminosas			490-860 (p.s.)		
	Cereais			410-950 (p.s.)		
Espanha (n.d.)	Alimentação infantil					
	- Frango com arroz			10,3		(Viñas, Pardo-Martinez e Hernández-Córdoba, 2000)
	- Pescada com arroz	n.d.	n.d.	11,5		
	- Vegetais mistos			92,0		
	- Frutas mistas			35,7		
Espanha (n.d.)	Carne		n.d.-1790	310 (p.s)		
	Peixe		n.d.-1530	286 (p.s.)		(Mir-Marqués et al., 2015)
	Vegetais	n.d.	150-2240	1210 (p.s.)		
	Fruta		n.d.-560	300 (p.s.)		
Índia (2000-2001)	Vegetais		0,2-1040	360		(Roychowdhury, Tokunaga e Ando, 2003)
	Cereais		0,2-1820	870		
Itália (n.d.)	Cereais					
	- Farinha de trigo duro	n.d.	n.d.	173 (p.s.)		(Cubadda e Raggi, 2005)
	- Farinha integral			361 (p.s.)		
	- Semolina			93-225 (p.s.)		

	Vegetais			800-9200	2700 (p.s.)	
	Frutas			230-3650	1630 (p.s.)	
	Leguminosas			3470-7000	4900 (p.s.)	
Nigéria (n.d.)	Carne	n.d.		50-3800	1700 (p.s.)	(Onianwa et al., 2000)
	Peixe			1800-3730	3110 (p.s.)	
	Cereais e produtos à base de cereais			1000-1890	1470 (p.s.)	
	Tubérculos			930-1790	1430 (p.s.)	
	Laticínios			1270-1680	1460 (p.s.)	
Nigéria (n.d.)	Vegetais	n.d.	-	-	480-2060 (p.s.)	(Yusuf, Arowolo e Bamgbose, 2003)
Paquistão (2005-2006)	Papas comerciais infantis	n.d.	-	-	124-332 (p.s.)	(Kazi et al., 2010)
	Pratos à base de carne, pescado ou mistos			23,4-250	91,6	
	Sopas			32,9-57,5	45,5	
	Frutas			26,8-146	54,5	
	Carne			-	n.q.	
	- Branca			-	59,2	
	- Vermelha			52,3-72		
	Pescado			46,3-101	74,4	(Ventura et al., 2016)
Portugal (n.d.)	- Magro	n.d.		-	n.q.	
	- Gordo			-	1050	
	- Bivalves			-	161	
	- Crustáceos			230-510	357	
	Leguminosas (grãos)			-	n.q.	
	Laticínios (iogurtes)			-	84,9	
	Cereais e derivados (arroz)			-	38,7	
	Tubérculos (batata confeccionada)			36,3-41,4		

	Refeições prontas	100	-	40,2	
Portugal (2018)	Frutas	96,8	n.d. – 225,7	50,1	(Pereira et al., 2020)
	Sobremesas	87,5	-	23,5	
	Papas	75,0	-	32,4	
Sérvia (2012)	Alimentação comercial infantil	4	<LOD-210	<LOD	(Škrbić et al., 2017)
Turquia (n.d)	Frutas	n.d.	n.d.	70,1	(Ozdemir, Kilinc e Oner, 2019)
	Bolachas	n.d.	n.d.	n.d.	

n.d. - não disponível; p.s. - peso seco; n.q. - não quantificado

Onianwa *et al.*, (2000) determinou a presença de Ni em alimentos nigerianos e reportou concentrações médias mais elevadas em leguminosas (4900 µg/Kg), peixe (3110 µg/Kg e vegetais (2700 µg/Kg), sendo que o valor máximo obtido foi de 9200 µg/Kg e o valor mínimo de 50 µg/Kg, encontrados em vegetais e carne, respetivamente. Yusuf *et al.* (2003) analisaram vários tipos de vegetais cultivados em solos de áreas industriais e residenciais na Nigéria, obtendo concentrações médias que variaram entre 480 µg/Kg e 2060 µg/Kg. Roychowdhury *et al.* (2003) determinaram a presença de Ni em cereais e vegetais indianos tendo obtido concentrações médias de 870 µg/Kg e 360 µg/Kg, respetivamente. Verifica-se que, a concentração média, bem como o teor máximo de Ni, reportados para vegetais na Índia é inferior aos valores obtidos na Nigéria. No Paquistão avaliou-se a presença de Ni em papas comerciais infantis, tendo-se obtido concentrações médias mais baixas, a variar entre 124 µg/Kg e 332 µg/Kg (Kazi *et al.*, 2010).

Mir-Marqués *et al.* (2015) determinaram a presença de Ni em alimentos espanhóis e obteve uma concentração média (1210 µg/Kg) e um teor máximo (2240 µg/Kg) mais elevados em vegetais. Num estudo mais antigo, também desenvolvido em Espanha, os vegetais foram o grupo de alimentos que apresentou uma concentração média mais elevada (92 µg/Kg), sendo até mais alta, comparativamente a refeições compostas, mas inferior quando comparada à média obtida por Mir-Marqués *et al.* (2015) (Viñas, Pardo-Martinez e Hernández-Córdoba, 2000). Yebra, Cancela e Cespón (2008) também analisaram alimentos espanhóis tendo obtido concentrações médias mais elevadas em mexilhão (moluscos bivalves), farinha de milho (cereais) e bezerro (carne), com valores de 970 µg/Kg, 950 µg/Kg e 920 µg/Kg, respetivamente. Cubadda e Raggi (2005) determinaram a presença de Ni em grãos de trigo e derivados italianos, tendo obtido uma concentração média mais elevada na farinha de trigo integral (361 µg/Kg). Škrbić *et al.* (2017) analisaram alimentação comercial infantil, tendo verificado teores de Ni abaixo do LOD em todas as amostras, nos dois países, com exceção para duas amostras de puré de fruta na Sérvia, cujo teor máximo foi de 210 µg/Kg. Ventura *et al.* (2016) analisaram alimentos portugueses tendo reportado concentrações médias mais elevadas para pratos à base de carne, pescado ou mistos (91,6 µg/Kg), seguindo-se as frutas (54,5 µg/Kg), dentro do grupo de pescado e à semelhança do observado noutros estudos, os moluscos bivalves apresentam valores médios mais elevados (1050 µg/Kg). Pereira *et al.* (2020) também analisaram alimentos portugueses, mas comercialmente preparados, tendo obtido concentrações médias mais elevadas para purés de fruta (50,1 µg/Kg), seguindo-se as refeições prontas (40,2 µg/Kg), tendo estas últimas uma frequência de deteção de 100%. Ozdemir *et al.*

(2019) que analisaram bolachas e frutas turcas obtiveram para as frutas uma concentração média de 70,1 µg/Kg.

De acordo com os estudos apresentados, conclui-se que matrizes alimentares como moluscos bivalves, cereais, leguminosas e vegetais apresentam valores consistentemente superiores aos restantes tipos de alimentos. Verificou-se que estes valores foram superiores aos observados na alimentação infantil pré-preparada estudada (Mir-Marqués *et al.*, 2015; Onianwa *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2020; Roychowdhury, Tokunaga e Ando, 2003; Ventura *et al.*, 2016; Viñas, Pardo-Martinez e Hernández-Córdoba, 2000; Yebra, Cancela e Cespón, 2008; Yusuf, Arowolo e Bamgbose, 2003). Sabe-se que os moluscos bivalves são filtradores que tendem a acumular contaminantes e que, para outros tipos de alimentos, como vegetais, a geoquímica natural dos solos também pode contribuir para os resultados encontrados. Para além disso, cereais, frutas e vegetais são mais suscetíveis ao uso de pesticidas, fertilizantes, herbicidas e outros produtos químicos que podem conter Ni na sua constituição (Onianwa *et al.*, 2000). Outros fatores também podem influenciar a concentração de Ni nos alimentos, como por exemplo os vegetais produzidos em áreas industriais tendem a ser mais propensos à ocorrência de Ni do que os produzidos em áreas residenciais (Yusuf, Arowolo e Bamgbose, 2003). O processamento de alimentos, geralmente com recipientes de ferro e aço e enlatados também pode contribuir para o aumento da presença de Ni nos alimentos (Jellesen, Rasmussen e Hilbert, 2006; Onianwa *et al.*, 2000).



## **Parte II - Parte Experimental**

## 2.1. Material e Métodos Analíticos

### 2.1.1. Amostragem

Efetuuou-se a colheita de 146 amostras de alimentos confeccionados de forma caseira, fornecidos por duas Instituições Particulares de Solidariedade Social, com resposta social de Creche, localizadas no Concelho de Ourém, Distrito de Santarém. A amostragem realizou-se ao longo de quatro meses, entre o mês de outubro do ano de 2019 e o mês de fevereiro do ano de 2020.

A amostragem teve em consideração as opções alimentares incluídas nas diferentes faixas etárias, designadamente, dos quatro aos seis meses, o puré de legumes, dos seis aos nove meses, o puré de legumes com carne ou com peixe, dos nove aos doze meses, as refeições de carne ou de peixe, para as três faixas etárias anteriores, o puré de fruta como sobremesa, para os maiores de doze meses e até aos três anos de idade, sopa de legumes/canja, refeições de carne, de peixe ou ovolactovegetarianas, fruta como sobremesa e papa como refeição de lanche (Tabela 5).

**Tabela 5:** Total de amostras analisadas por faixa etária e refeição.

Faixa etária	Refeição	Total de amostras analisadas (%)
4-6 Meses/ 9-12 Meses	Puré de legumes	14 (9,6%)
6-9 Meses	Puré de legumes com carne	35 (24,0%)
	Puré de legumes com peixe	23 (15,8%)
9-12 Meses	Refeições de carne	11 (7,5%)
	Refeições de peixe	5 (3,4%)
4-12 Meses	Puré de fruta (sobremesa)	3 (3,4%)
>12 Meses- 3 Anos	Sopa de legumes/canja	17 (11,6%)
	Refeições de carne	13 (8,9%)
	Refeições de peixe	6 (4,1%)
	Refeições ovolactovegetarianas	6 (4,1%)
	Fruta crua (sobremesa)	10 (5,5%)
	Papas (lanche)	3 (2,1%)

Após a colheita, as amostras foram devidamente identificadas com o local e respetiva data de recolha, o tipo de refeição e a faixa etária a que se destinava, seguindo-se o acondicionamento em sacos de congelação armazenados no congelador. As amostras permaneceram congeladas até à sua análise em laboratório, sendo que no caso particular das amostras sólidas foi necessário triturá-las antes de proceder à congelação.

### **2.1.2. Reagentes e material**

O padrão analítico de Ni, com concentração de 1000 mg/L, foi obtido a partir da Merk (Darmstadt, Alemanha).

O solvente utilizado, o ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 68% - superpure, foi adquirido da Carlo Erba (Milão, Itália). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida a partir de um sistema de filtração Milli-Q da Millipore® (Bedford, MA, USA).

Para a preparação das soluções foram utilizados balões volumétricos de 5 ml, 10 ml, 100 ml e 2000 ml e pipetas de 5 ml e 10 ml. Durante a pesagem das amostras foram usados cadinhos e espátula.

Após o processo de mineralização por incineração das amostras, a dissolução das cinzas obtidas fez-se no interior do cadinho de porcelana, com recurso a copos de precipitação e pipeta de 5 ml, tendo todo o conteúdo sido transferido para tubos de ensaio. Foi ainda usada película PARAFILM® para vedar a amostra.

Na análise das amostras, de modo a traçar a curva de calibração foi usado o solvente já mencionado atrás, bem como a solução padrão de Ni. As amostras foram transferidas para recipientes de amostra de poliestireno e posicionadas no espectrofotómetro.

### **2.1.3. Soluções**

A solução de  $\text{HNO}_3$  a 0,5% foi preparada através da dissolução de 14,71 ml de  $\text{HNO}_3$  68% num balão volumétrico de 2000 ml, perfazendo com água ultrapura.

A solução padrão *stock* de Ni foi preparada a 10 000  $\mu\text{g/L}$ , a partir da concentração inicial de 1 000 000  $\mu\text{g/L}$ , num balão volumétrico de 100 ml. Para a dissolução retirou-se 1 ml da solução inicial e perfez-se o volume com  $\text{HNO}_3$  a 0,5% num balão de 100 ml.

A solução padrão de Ni foi preparada com uma concentração de 100  $\mu\text{g/L}$  a partir da concentração de 10 000  $\mu\text{g/L}$ . Para a dissolução, retirou-se 1 ml da solução de 10 000  $\mu\text{g/L}$  e perfez-se o volume com  $\text{HNO}_3$  a 0,5% num balão de 100 ml. As soluções padrão para a curva de calibração foram preparados entre 10 e 80  $\mu\text{g/L}$  (10, 20, 40, 60 e 80  $\mu\text{g/L}$ ).

### **2.1.4. Equipamentos**

A pesagem das amostras foi desenvolvida com recurso à Balança analítica Mettler Toledo modelo PB 303-S/ Fact (Columbus, Ohio, EUA).

Para o processo de mineralização por incineração das amostras foi utilizado o Banho de areia Falc BS70 (Treviglio, Itália), seguido da Mufla Selecta (Barcelona, Espanha).

De modo a proceder à homogeneização das amostras recorreu-se ao Aparelho de ultrassonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha).

Para a deteção e quantificação de Ni utilizou-se o Espectrómetro de Absorção Atómica com Câmara de Grafite, da marca Analytikjena, modelo ZEE nit 700 MPE 60 e com Hallow Cathode Lamp para o Ni, número de série HEIO429 (Jena, Alemanha).

## **2.2. Procedimento experimental**

### **2.2.1. Pesagem / Mineralização por incineração**

A realização deste trabalho envolveu a utilização de uma técnica analítica previamente validada e otimizada por Pereira *et al.* (2020), que identificou e quantificou o teor de Ni em produtos alimentares comerciais para crianças.

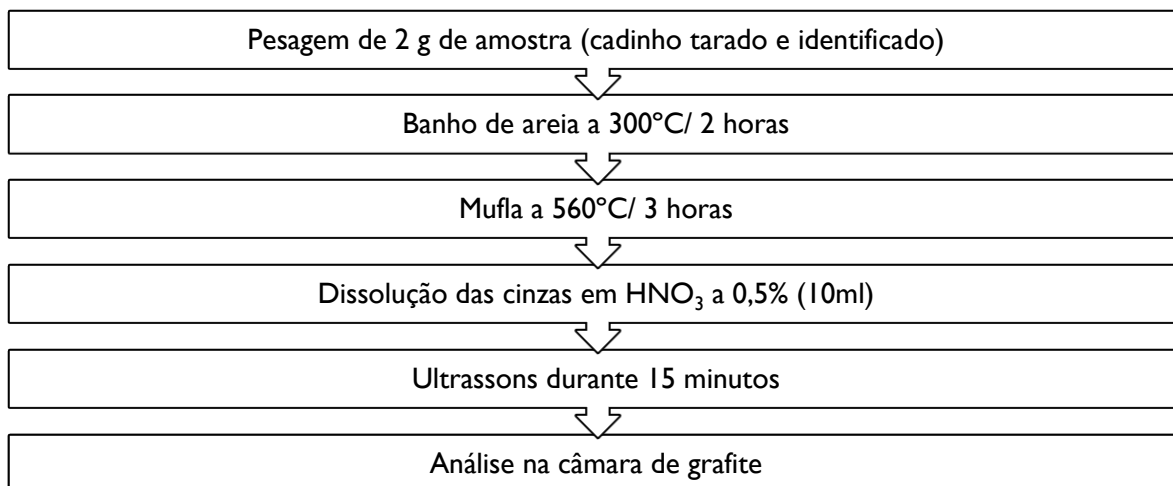
A amostra foi colocada no interior de um cadinho, devidamente identificado, efetuando-se, após tara, a pesagem de cerca de 2 g de alimento.

Na fase seguinte, procedeu-se à mineralização por incineração, para que a toda a matéria orgânica fosse digerida. As amostras foram colocadas num banho de areia, a uma temperatura de 300°C, durante sensivelmente 2 horas, garantindo que as mesmas adquirissem uma coloração preta, sem emissão de fumos. Transato este processo, as amostras seguiram para a mufla, a uma temperatura de 560°C, durante sensivelmente 3 horas, até conversão em cinzas brancas.

Após o processo anterior, fez-se a dissolução das cinzas em 10 ml de HNO<sub>3</sub> a 0,5%, que foi transferida para um tubo de ensaio, devidamente identificado. De forma a assegurar a dissolução de todo o conteúdo presente no cadinho e o conseqüente arraste para o tubo de ensaio, este processo deve ser feito de modo gradual.

Seguiu-se o acondicionamento das amostras, previamente vedadas com película PARAFILM®, no frigorífico, a uma temperatura entre 2°C e 8°C, até à homogeneização. A etapa de homogeneização das amostras foi desenvolvida no ultrassom, durante 15 minutos, antes do encaminhamento, em cuvete, para o auto-analisador do equipamento de espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite (Figura 3).

Como forma de evitar a contaminação do material e salvaguardar a veracidade dos resultados obtidos, sem enviesamento do estudo, a limpeza e a consequente descontaminação do material é de extrema importância. Pelo exposto efetuou-se a limpeza dos cadinhos e tubos de ensaio antes da sua utilização. A água utilizada ao longo desta etapa, como em todo o restante processo é a água ultrapura e o solvente é o  $\text{HNO}_3$  a 0,5%. Após a lavagem, o material foi colocado na estufa a secar.



**Figura 3:** Técnica utilizada na preparação da amostra.

### 2.2.2. Detecção e Quantificação

A deteção e quantificação de Ni foram realizadas por GFAAS com recurso ao espectrómetro descrito em 2.1.4. O espectrómetro operou com temperaturas de secagem na ordem dos 90°C e até 110°C, temperaturas de pirólise de 1150°C e de atomização de 2550°C, sendo que a limpeza foi efetuada a uma temperatura de 2600°C. O gás inerte usado foi o argon, que se manteve ligado ao longo das etapas de secagem, pirólise e limpeza, sendo a sua passagem interrompida durante a atomização. O programa de temperatura da câmara de grafite e as alíquotas seguem as recomendações e especificações do fabricante do equipamento para o tipo de metal e matriz, sendo o mesmo apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6:** Programa de temperatura da câmara de grafite.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Rampa (°C.s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo de permanência (s)</b>	<b>Gás (Árgon)</b>
Secagem 1	90	5	20	Máximo
Secagem 2	105	3	20	Máximo
Secagem 3	110	2	10	Máximo
Pirólise	1150	250	10	Máximo
Atomização	2550		5	Stop
Limpeza	2600	500	4	Máximo

O volume de injeção na câmara de grafite foi de 10 µL e a cada dez amostras analisadas foi efetuado um ajuste à curva de calibração em padrão. A determinação foi realizada utilizando um comprimento de onda de 232,0 nm, fenda de 0,2 nm e corrente da lâmpada de 5 mA, não sendo necessária a utilização de um modificador químico de matriz.

A identificação de Ni foi efetuada comparando as áreas dos picos da amostra com as do padrão. Para a quantificação de Ni foram construídas retas de calibração a partir das soluções padrão, que por comparação com a área média de 3 injeções, permitiram quantificar a concentração de Ni em cada amostra.

### **2.2.3. Validação da metodologia analítica**

A metodologia analítica foi revalidada envolvendo a determinação da linearidade, limite de deteção e limite de quantificação, exatidão, precisão.

#### **2.2.3.1. Ensaio em branco**

O ensaio em branco funciona como uma ferramenta que tem como objetivo o controlo da qualidade da análise. No presente trabalho, o branco utilizado foi um cadinho apenas com a amostra devidamente pesada e submetida ao método analítico descrito em **2.2.1. e 2.2.2.**

#### **2.2.3.2. Linearidade**

A linearidade atesta a proporcionalidade entre a área obtida pelo pico e as concentrações existentes numa dada amostra, sendo esta relação tanto maior quanto mais próximo de 1,0 for o valor do coeficiente de correlação ( $r^2$ ). Para a respetiva avaliação foram construídas duas

curvas de calibração, uma em soluções padrão (10 - 80 µg/L) e outra em amostras fortificadas (25 - 400 µg/Kg). Para as amostras fortificadas foram utilizadas soluções padrão com concentrações de 100 µg/L e 1000 µg/L que foram adicionadas a 2 g de alimento por forma a obter níveis de fortificação de 25, 50, 100, 200, 300 e 400 µg/L.

### **2.2.3.3. Limite de deteção e limite de quantificação**

O LOD corresponde à menor concentração de analito que pode ser detetada numa amostra e diferenciada do sinal do branco, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito a medir, podendo apenas ser afirmado que a concentração do componente em causa é inferior a um dado valor (European Medicines Agency, 2011).

O LOQ é definido como a concentração mínima a partir do qual é possível determinar quantitativamente o analito numa amostra com um nível aceitável de precisão e exatidão (European Medicines Agency, 2011).

O cálculo dos referidos limites foi efetuado a partir da curva de calibração em amostras fortificadas através das seguintes equações:

$$\text{LOD} = 3,3 \times (S_{y/x} \div b) \quad \text{LOQ} = 10 \times (S_{y/x} \div b)$$

Em que o  $S_{y/x}$  corresponde ao desvio padrão residual da função linear e  $b$  o declive da curva de calibração (European Medicines Agency, 2011).

### **2.2.4. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com recurso ao GraphPad Prism (8.4.3, GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA).

Para testar se os conjuntos de dados eram de distribuição normal, foi utilizado o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Uma vez que os conjuntos de dados não apresentaram distribuição normal, com variações não homogéneas, foram aplicados testes não paramétricos.

Para a comparação entre os vários grupos de alimentos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney. O nível com significado estatístico foi definido como  $P < 0,05$ .

Para efeitos de análise estatística, se a concentração das amostras se encontrava abaixo do LOD foi atribuído 50% desse limite, já para as amostras com concentrações situadas entre o LOD e o LOQ foi atribuído 50% do LOQ.

### 2.2.5. Cálculo da ingestão diária estimada

O cálculo da ingestão diária estimada (EDI) foi realizado para os 6 meses de idade, 1 ano e 2 anos considerando uma dieta composta por alimentos de confeção caseira.

Assumiu-se que as crianças têm uma capacidade gástrica de aproximadamente 30 g/ Kg e com 6 meses, 1 ano e 2 anos de idade, deveriam pesar 8 kg, 10 kg e 12 kg e ingerir 605, 745 e 987 kcal por dia, respetivamente (Direção-Geral da Saúde, 2006; Rêgo *et al.*, 2019). Com base nesses valores, foi realizada uma dieta alimentar para cada faixa etária (Tabela 7).

**Tabela 7:** Ingestão alimentar diária de acordo com a faixa etária (Direção-Geral da Saúde, 2006; Rêgo *et al.*, 2019).

	Almoço	Lanche	Jantar
6 Meses	Puré de legumes com carne ou peixe (165 g) Puré de fruta (80 g)	Puré de fruta (80 g)	
1 Ano	Puré de legumes (100 g) Refeição de carne ou peixe (155 g) Fruta (120 g)	Papa com fruta (100 g)	Puré de legumes (100 g) Refeição de carne ou peixe (155 g) Fruta (120 g)
2 Anos	Sopa de legumes (110 g) Refeição de carne ou peixe ou ovolactovegetarianas (185 g) Fruta (120 g)	Papa com fruta (169g)	Sopa de legumes (110 g) Refeição de carne ou peixe ou ovolactovegetarianas (185 g) Fruta (120 g)

A EDI para cada faixa etária foi calculada por meio de um método determinístico (Aggett, 2010; Pereira *et al.*, 2020; Vragović, 2005), utilizando a seguinte equação:

$$EDI = (\sum c) \cdot (CN^{-1} K^{-1})$$

Em que  $\sum c$  é a soma do Ni nas amostras analisadas, C é a ingestão média diária estimada por pessoa (kg), N é o número total de amostras analisadas e K é o peso corporal (kg). Essa avaliação foi realizada para cada tipo de alimento (Aggett, 2010; Pereira *et al.*, 2020; Vragović, 2005).



A EDI foi calculada para todas as populações usando a média e as concentrações de Ni mais elevadas detetadas em cada grupo de alimentos, definindo o pior cenário.

## 2.3. Resultados e Discussão

### 2.3.1. Desempenho analítico

A avaliação da linearidade do método foi efetuada recorrendo ao traçado de curvas de calibração. Estas foram obtidas utilizando o procedimento de regressão linear de mínimos quadrados da área do pico em função da concentração. A linearidade em soluções padrão foi avaliada com cinco níveis de concentração, entre 10 e 80 µg/L. O resultado da avaliação da linearidade foi apropriado, como evidencia o coeficiente de correlação ( $r^2 = 0,9974$ ) (Figura 4).

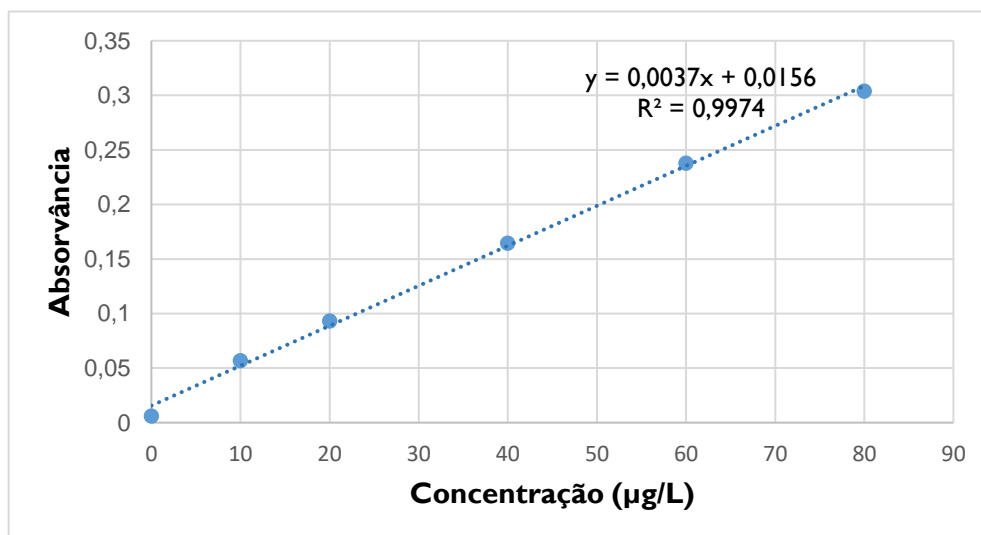
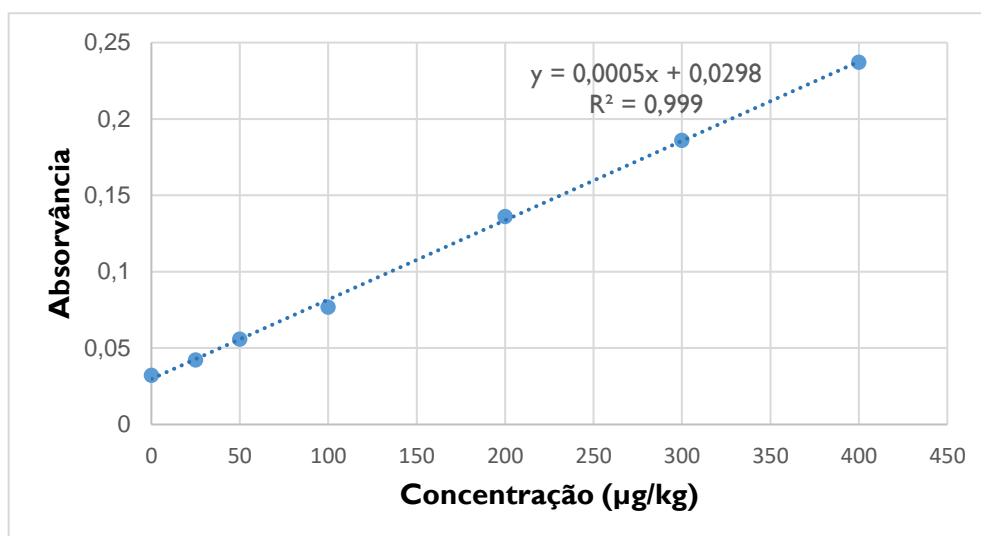


Figura 4: Linearidade em padrão.

A curva de calibração preparada com as amostras fortificadas foi obtida com diferentes concentrações de Ni, preparadas entre 25 e 400 µg/Kg, sendo o resultado da avaliação da linearidade adequado, como evidenciado pelo coeficiente de correlação ( $r^2 = 0,999$ ) (Figura 5).



**Figura 5:** Linearidade em amostras fortificadas.

O LOD e LOQ, calculados através da curva de calibração como  $3,3 \times (S_y/x/b)$  e  $10 \times (S_y/x/b)$ , respetivamente, onde  $b$  é o declive e  $S_y/x$  é o desvio padrão residual da função linear, foram 17,35 e 52,59 µg/Kg, respetivamente.

Os LODs descritos na literatura, relativamente à ocorrência de Ni em alimentos, variam entre 12,5 µg/Kg e 40 µg/Kg, nomeadamente para o método de GAAF utilizado neste trabalho. Por outro lado, os valores de LOQ descritos na literatura variam entre 37 µg/Kg e 90 µg/Kg (Dobrowolski e Otto, 2012; Pereira *et al.*, 2020; Škrbić *et al.*, 2017). Neste contexto, os valores de LOD e LOQ obtidos com a metodologia analítica aplicada é consistente com os valores encontrados na literatura científica e adequado à determinação de Ni em alimentos.

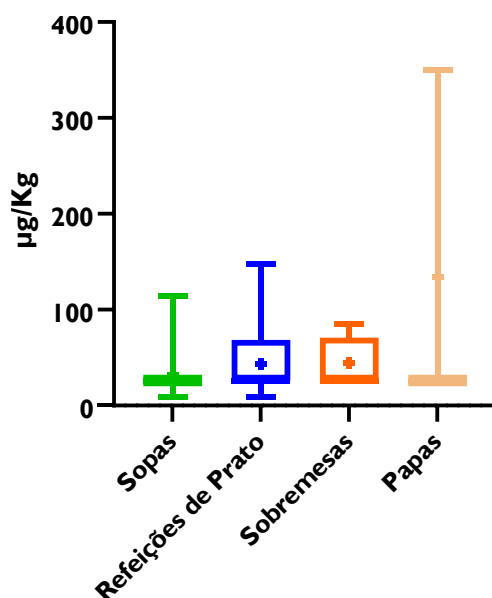
### 2.3.2. Ocorrência de Ni em alimentos de confeção caseira

A ocorrência de Ni em alimentos vem sendo estudada e relatada, embora os dados sejam limitados, pelo que foi oportuno quantificar o nível de contaminação nesta matriz.

No presente estudo, diferentes amostras de alimentos confeccionados de forma caseira, de duas Instituições Particulares de Solidariedade Social, com resposta social de Creche, localizadas no Concelho de Ourém, Distrito de Santarém, foram alvo de análise com vista a detetar e quantificar Ni nas mesmas. Foi avaliado o conteúdo de Ni em 146 amostras, sendo que 121 (82,9%) destas se encontravam contaminadas, com teores que oscilaram entre o LOD e 350 µg/Kg e com teores médios de 38,71 µg/Kg (Anexo I).

No geral, todos os grupos de alimentos estudados apresentaram amostras contaminadas com frequências de deteção que oscilaram entre os 64% e 100%. Verificou-se que o grupo das

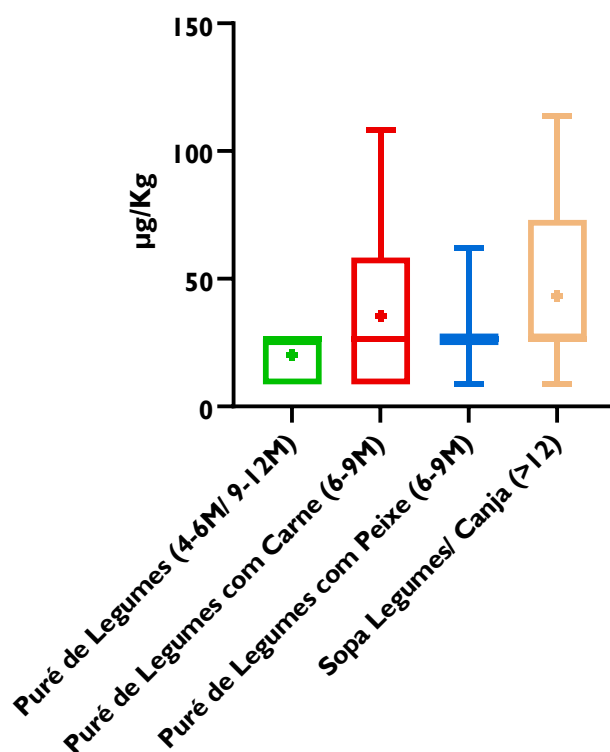
papas foi o que apresentou concentrações médias mais elevadas (134,2  $\mu\text{g/Kg}$ ) e o teor máximo de 350  $\mu\text{g/Kg}$ , resultados que poderão estar associados à utilização simultânea de ingredientes com teores de Ni mais elevados, nomeadamente, cereais (aveia) e fruta, como mencionado na literatura. Por outro lado, este resultado também se deve a uma única amostra, com um valor mais elevado comparativamente às restantes, pelo que teria sido interessante ter um número alargado de amostras neste grupo. Em termos de valores médios encontrados seguem-se as sobremesas (fruta cozida ou fresca) com 44,61  $\mu\text{g/Kg}$  (com valor máximo de 85,55  $\mu\text{g/Kg}$ ), os pratos principais com 43,99  $\mu\text{g/Kg}$  (com valor máximo de 147,8  $\mu\text{g/Kg}$ ) e por fim as sopas com 32,19  $\mu\text{g/Kg}$  (com valor máximo de 113,8  $\mu\text{g/Kg}$ ) (Figura 6).



**Figura 6:** Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nos grupos gerais de alimentos, com representação do valor da média através do símbolo “•”.

Dentro do grupo das sopas, tendo em conta a faixa etária a que se destina a refeição, verificou-se que o puré de legumes, fornecido dos 4 aos 6 meses de idade, apresenta uma concentração média (20,01  $\mu\text{g/Kg}$ ) e uma frequência de deteção (64%), mais baixas comparativamente ao puré de legumes com carne (71%) ou com peixe (83%), fornecido a partir dos 6 meses e até aos 9 meses de idade. No caso dos purés de legumes com carne o valor médio é de 35,61  $\mu\text{g/Kg}$  (com valor máximo de 108,5  $\mu\text{g/Kg}$ ) e nos purés de legumes com peixe é de 26,10  $\mu\text{g/Kg}$  (com valor máximo de 61,95  $\mu\text{g/Kg}$ ), embora a frequência de deteção seja superior neste último grupo. No entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Figura 7).

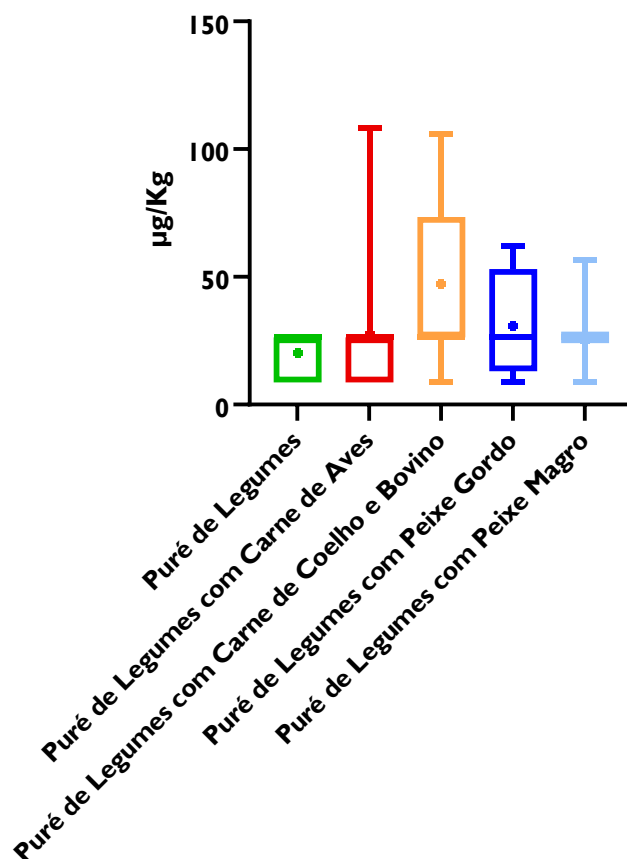
Na faixa etária dos maiores de 12 meses, verificou-se uma frequência de deteção de 88% para as sopas de legumes/canja, com uma concentração média de 43,44  $\mu\text{g/Kg}$  e um teor máximo de 113,8  $\mu\text{g/Kg}$  (Figura 7).



**Figura 7:** Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni em sopas, com representação do valor da média através do símbolo “•”.

Na faixa etária dos 6 aos 9 meses, estabelecendo subgrupos dos purés de legumes com carne de acordo com o tipo de carne, nomeadamente puré de legumes com carne de aves (frango, peru, pato) e puré de legumes com carne de coelho e bovino, observam-se diferenças estatisticamente significativas ( $P=0,0370$ ) entre o puré de legumes e o puré de legumes com carne de coelho e bovino. A alimentação fornecida aos animais pode ser um dos fatores determinantes para a obtenção destes resultados.

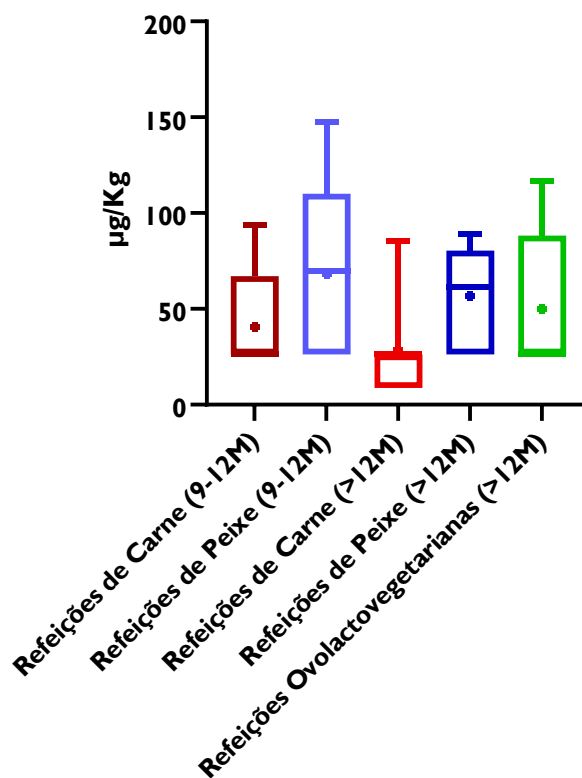
Para os subgrupos dos purés de legumes com peixe, nomeadamente puré de legumes com peixe gordo (cavala e salmão) e peixe magro (robalo, linguado, pescada, etc.) não se observaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 8).



**Figura 8:** Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nos subgrupos dos purés de legumes, com representação do valor da média através do símbolo “•”.

No grupo das refeições principais, fornecidas dos 9 aos 12 meses, verificou-se uma frequência de detecção de 100%, tanto para as refeições compostas por carne como por peixe. A concentração média mais elevada ( $68,44 \mu\text{g/Kg}$ ), bem como o teor máximo ( $147,8 \mu\text{g/Kg}$ ) observaram-se nas refeições compostas por peixe (Figura 9). No entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

Na faixa etária dos maiores de 12 meses, as refeições de peixe apresentaram uma frequência de detecção (100%) superior às de carne (69,2%). Verificou-se que tanto a concentração média ( $56,93 \mu\text{g/Kg}$ ), como o teor máximo ( $89,00 \mu\text{g/Kg}$ ) foram obtidos nas refeições de peixe, mas as diferenças não são estatisticamente significativas. Para a mesma faixa etária, as refeições ovolactovegetarianas apresentaram uma frequência de detecção igual às refeições de peixe, com um teor máximo ( $116,8 \mu\text{g/Kg}$ ) superior mas concentração média ( $50,13 \mu\text{g/Kg}$ ) mais baixa (Figura 9).



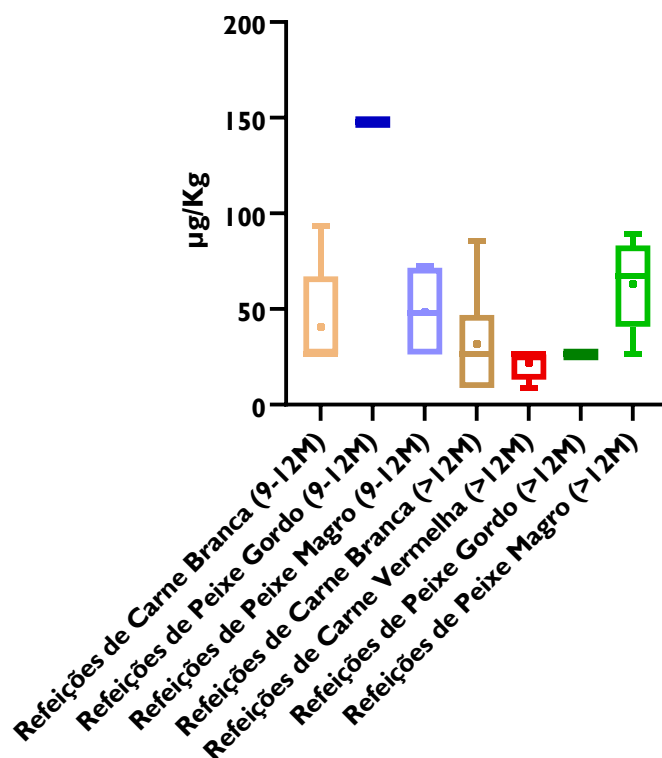
**Figura 9:** Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nas refeições principais, com representação do valor da média através do símbolo “•”.

Na faixa etária dos 9 aos 12 meses, as refeições constituídas por peixe gordo correspondem à concentração máxima obtida ( $147,80 \mu\text{g/Kg}$ ), seguindo-se as refeições constituídas por carnes brancas, com uma concentração máxima de  $93,90 \mu\text{g/Kg}$ , mas com um teor médio mais baixo, comparativamente às refeições constituídas por peixe magro,  $40,65 \mu\text{g/Kg}$  e  $48,60 \mu\text{g/Kg}$ , respetivamente (Figura 10).

Na faixa etária dos maiores de 12 meses, verificou-se que a concentração média é superior nas refeições constituídas por carnes brancas ( $31,60 \mu\text{g/Kg}$ ), comparativamente às constituídas por carnes vermelhas ( $21,90 \mu\text{g/Kg}$ ). Nas refeições de peixe, a concentração média é superior nas constituídas por peixe magro ( $63,06 \mu\text{g/Kg}$ ), comparativamente às constituídas por peixe gordo ( $26,30 \mu\text{g/Kg}$ ) (Figura 10). O resultado obtido nesta faixa etária é oposto ao das refeições fornecidas dos 9 aos 12 meses, podendo ser justificado pelo facto de apenas terem sido analisadas duas amostras constituídas por peixe gordo, uma em cada faixa etária. Desta forma, a concentração máxima, corresponde ao valor da média, sendo este de  $26,30 \mu\text{g/Kg}$  e  $147,80 \mu\text{g/Kg}$ , respetivamente.

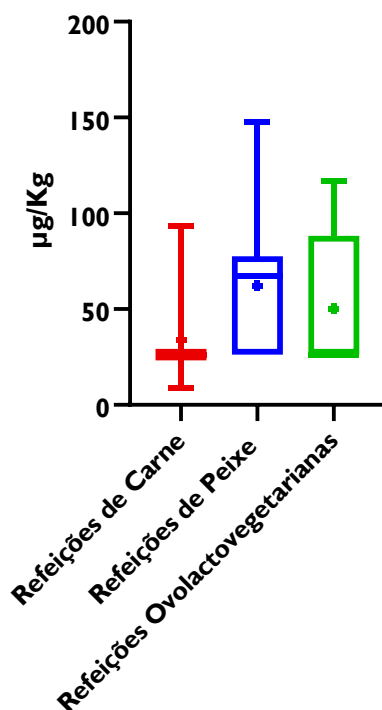
As refeições fornecidas dos 9 aos 12 meses apresentaram concentrações médias superiores, comparativamente às refeições fornecidas aos maiores de 12 meses, exceto no caso das

refeições de peixe magro. No entanto, as diferenças encontradas não são estatisticamente significativas (Figura 10).



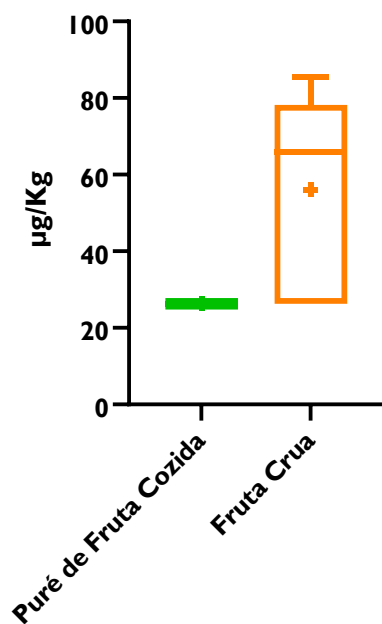
**Figura 10:** Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nos subgrupos das refeições principais, com representação do valor da média através do símbolo “•”.

Por outro lado, verifica-se que, independentemente da faixa etária, existem diferenças estatisticamente significativas ( $P=0,0380$ ) entre as refeições de carne e as de peixe (Figura 11).



**Figura 11:** Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nas refeições principais, independentemente da idade, com representação do valor da média através do símbolo “•”.

No grupo das sobremesas verificou-se uma frequência de deteção de 100%, tendo-se observado uma concentração média (56,06  $\mu\text{g/Kg}$ ) e um teor máximo (85,55  $\mu\text{g/Kg}$ ) mais elevados na fruta fresca, fornecida às crianças maiores de 12 meses. Na faixa etária dos 4 aos 12 meses, a fruta cozida apresentou concentrações médias mais baixas, bem como teores máximos inferiores. No entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre a fruta cozida e a fruta crua (Figura 12).



**Figura 12:** Diagrama de caixa das concentrações ( $\mu\text{g/Kg}$ ) de Ni nas sobremesas, com representação do valor da média através do símbolo “+”.

### 2.3.2.1 Discussão dos resultados e comparação com outros estudos

Em estudos análogos tem sido detetada a ocorrência de Ni em concentrações variáveis, na ordem dos  $\mu\text{g/Kg}$ , com teores mínimos a oscilar entre 0,2 e 23,4  $\mu\text{g/Kg}$  e teores máximos a oscilar entre 41,4 e 9200  $\mu\text{g/Kg}$  (Mir-Marqués *et al.*, 2015; Onianwa *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2020; Roychowdhury, Tokunaga e Ando, 2003; Ventura *et al.*, 2016; Yusuf, Arowolo e Bamgbose, 2003). No que respeita a concentrações médias os teores variaram entre 10,3  $\mu\text{g/Kg}$  e 4900  $\mu\text{g/Kg}$  (Cubadda e Raggi, 2005; Kazi *et al.*, 2010; Mir-Marqués *et al.*, 2015; Onianwa *et al.*, 2000; Ozdemir, Kilinc e Oner, 2019; Pereira *et al.*, 2020; Roychowdhury, Tokunaga e Ando, 2003; Ventura *et al.*, 2016; Viñas, Pardo-Martinez e Hernández-Córdoba, 2000; Yebra, Cancela e Cespón, 2008; Yusuf, Arowolo e Bamgbose, 2003) (Tabela 4).



No presente estudo os teores mínimos situaram-se abaixo do LOD (17,35 µg/Kg) e os teores máximos oscilaram entre 61,95 e 350,00 µg/Kg. Em termos de concentrações médias os valores oscilaram entre 20,01 e 147,80 µg/Kg.

A maioria dos teores de Ni encontrados nos alimentos neste estudo apresentam semelhanças nos valores detetados por Ventura *et al.* (2016), verificando-se que as concentrações médias obtidas para as sopas, pratos principais e frutas são inferiores. No entanto, considerando apenas o valor obtido para as frutas frescas, o presente estudo demonstra um valor médio de 56,1 µg/Kg, semelhante ao valor de 54,5 µg/Kg obtido por Ventura *et al.* (2016).

Nas sopas de legumes fornecidas aos maiores de 12 meses constata-se concentrações médias (43,4 µg/Kg) e teores máximos (113,8 µg/Kg) mais elevados comparativamente aos purés de legumes fornecidos dos 4 aos 12 meses. Este resultado pode ser justificado pela presença conjunta de maior diversidade de vegetais na base da sopa e de leguminosas, cuja introdução nas sopas só ocorre a partir do primeiro ano. De acordo com a literatura, o grupo dos vegetais e das leguminosas tende a apresentar teores mais elevados de Ni (Onianwa *et al.*, 2000).

Nos purés de legumes com carne ou peixe verifica-se que a concentração média (35,6 µg/Kg), bem como o teor máximo de Ni (108,5 µg/Kg) é obtido nos purés de legumes com carne, sendo que no subgrupo dos purés de legumes com coelho e bovino o valor médio obtido é superior ao valor obtido no puré de legumes com carne de aves. Estes resultados vão ao encontro do descrito na literatura que evidencia concentrações de Ni superiores na carne (Mir-Marqués *et al.*, 2015; Yebra, Cancela e Cespón, 2008). Este resultado poderá estar associado ao facto de nesta faixa etária o consumo de carne ser mais frequente e, portanto o número de amostras de purés de legumes com peixe ser reduzido, não permitindo uma correta avaliação dos resultados.

Nas refeições de prato fornecidas dos 9 aos 12 meses, as que são constituídas por peixe apresentam concentrações médias e teores máximos mais elevados, comparativamente às de carne, sendo os valores mais altos obtidos nas refeições com peixe gordo (cavala e salmão). Estes resultados coincidem com o também descrito na literatura, que destaca o peixe como um dos alimentos com alto teor em Ni (Carrapatoso *et al.*, 2004; Onianwa *et al.*, 2000). As refeições compostas por peixe fornecidas aos maiores de 12 meses também apresentam concentrações médias mais elevadas, comparativamente às refeições de carne e refeições ovolactovegetarianas. No entanto, obteve-se para as refeições constituídas por peixe magro (pescada, maruca, perca, etc.), concentrações médias superiores (63,1 µg/Kg)

comparativamente ao peixe gordo (26,3 µg/Kg). Este resultado, como mencionado anteriormente, poderá estar associado ao facto de em ambas as faixas etárias ter sido recolhida uma única amostra constituída por peixe gordo, com concentrações máximas e valores médios díspares, não permitindo uma boa avaliação e interpretação dos resultados acima mencionados.

Para a faixa etária dos maiores de 12 meses, o teor máximo foi obtido nas refeições ovolactovegetarianas (116,8 µg/Kg), pela conjugação de alimentos com concentrações de Ni tendencialmente mais elevadas como são os cereais, vegetais e as leguminosas (Carrapatoso *et al.*, 2004; Mir-Marqués *et al.*, 2015; Onianwa *et al.*, 2000).

Nos estudos que avaliaram as concentrações médias de Ni em diversos alimentos observou-se que para o peixe, os valores obtidos por Mir-Marqués *et al.* (2015) e Yebra, Cancela e Cespón (2008) são semelhantes e, em ambos, os valores obtidos para a carne são superiores. Onianwa *et al.* (2000) apresentou valores superiores para a carne e para o peixe, sendo a concentração média superior para o peixe. No presente estudo as concentrações de Ni obtidas são consistentemente mais elevadas na presença de opções com maior variedade de vegetais e inclusão simultânea de leguminosas. No que refere à inclusão de carne ou peixe, nas sopas as concentrações superiores são obtidas na presença de carne, já nas refeições de prato, obtêm-se concentrações mais elevadas quando é incluído o peixe. Os resultados obtidos podem ser justificados pelo método de confeção utilizado e o respetivo tempo de confeção, bem como pelos utensílios domésticos envolvidos (Škrbić *et al.*, 2017). As carnes brancas apresentam teores superiores aos obtidos para as carnes vermelhas, sendo esse valor superior na carne de coelho e borrego, resultado que poderá estar associado à alimentação fornecida ao animal, aos utensílios utilizados e ao tempo necessário para confeção, bem como à conjugação de vários alimentos com teores tendencialmente mais elevados de Ni na sua constituição.

Em Espanha, um estudo que avaliou alimentação comercial infantil obteve concentrações médias a variar entre 10,3 e 92 µg/ Kg, estando os valores superiores associados ao grupo dos vegetais e das frutas (Viñas, Pardo-Martinez e Hernández-Córdoba, 2000). Um outro estudo também desenvolvido em Espanha, obteve concentrações médias mais elevadas, a variar entre 51,2 e 216,6 µg/ Kg (peso húmido calculado usando a humidade média), tendo os valores superiores sido obtidos em vegetais e carnes (Mir-Marqués *et al.*, 2015). Em Portugal, para a alimentação comercial infantil obtiveram-se concentrações médias semelhantes aos dados de Espanha, a variar entre 23,5 e 50,1 µg/ Kg, sendo o valor superior correspondente à fruta (Pereira *et al.*, 2020).

Comparando as concentrações médias obtidas para a alimentação comercial infantil (Mir-Marqués *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2020; Viñas, Pardo-Martinez e Hernández-Córdoba, 2000) e as concentrações médias obtidas neste estudo, observam-se semelhanças nos resultados, sendo que algumas das concentrações médias mais elevadas são encontradas em alimentos de confeção caseira.

Pereira *et al.* (2020) obteve para as refeições prontas (que incluem sopas e refeições de prato) concentrações médias superiores, comparativamente ao presente estudo. No que respeita à fruta, comparando os boiões comerciais com os purés caseiros, a concentração média mais elevada foi obtida nos primeiros, 50,1 µg/ Kg e 26,3 µg/ Kg, respetivamente. No entanto, o resultado obtido para a fruta fresca (56,1 µg/ Kg) é superior ao dos boiões. As papas caseiras apresentaram valores médios superiores perante os valores obtidos nas papas comerciais, 134,2 µg/ Kg e 32,4 µg/ Kg, respetivamente.

O resultado obtido para a fruta fresca assemelha-se ao relatado para os vegetais, isto é, dependendo da zona de cultivo a fruta poderá estar mais ou menos propensa à ocorrência de Ni. O cultivo de árvores de fruto em zonas mais poluídas, com maior tráfego automóvel por exemplo, tende a ser mais suscetível pela contaminação dos solos, comparativamente ao cultivo em zonas rurais (Pereira *et al.*, 2020). Adicionalmente, a utilização de produtos químicos que possam conter na sua constituição Ni também pode contribuir para os valores mais elevados observados na fruta fresca, principalmente se esta for consumida com casca, a camada exterior mais exposta a este metal. Assim, nesta perspetiva, o processamento industrial ou a confeção são vantajosos para a redução da concentração de Ni nos alimentos. No caso específico das papas, as vendidas comercialmente tratando-se de um alimento específico para alimentação infantil, têm de obedecer a um conjunto criterioso de aspetos, no que aos teores máximos de determinados contaminantes diz respeito. No caso particular do Ni, os dados são ainda reduzidos, insuficientes e não representativos, não existindo níveis máximos determinados para alimentos o que dificultará este controlo. Todavia observa-se, nas papas caseiras, teores bastante superiores, comparativamente às papas comerciais, resultado que pode estar associado a um controlo mais reduzido que se verifica nos cereais destinados à população em geral, comparativamente à alimentação infantil. À semelhança das frutas, também nos cereais o uso de pesticidas, fertilizantes, herbicidas e outros produtos químicos pode contribuir para o aumento das concentrações de Ni nos alimentos, a par da ausência de critérios mais rigorosos no que respeita à presença de contaminantes, nomeadamente o Ni. O tipo de cereal utilizado também poderá ser determinante para os teores de Ni, na medida

em que os cereais integrais apresentam maior concentração de metais nas camadas mais superficiais.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que, aparentemente, não são os recipientes onde são armazenados os alimentos comerciais que transmitem o Ni aos alimentos e evidenciam a importância de aprofundar o estudo e, conseqüentemente o conhecimento, no que refere ao impacto da complexidade do processo culinário, nomeadamente o tipo de método e o tempo de confecção despendido, bem como os utensílios utilizados, nos teores de Ni presentes nos alimentos.

## 2.4. Avaliação do Risco

A crescente contaminação do ambiente, alimentos e água por metais, nomeadamente o Ni, constitui uma séria ameaça ao sistema ecológico e à saúde humana. As crianças constituem um grupo populacional particularmente mais vulnerável, em relação à massa corporal e ao consumo alimentar. Por este motivo, realizou-se a caracterização do risco do Ni.

Para esta avaliação foram utilizados os resultados da ocorrência de Ni em alimentos de confecção caseira, padrões de consumo e pesos médios das diferentes faixas etárias.

A ingestão diária estimada foi calculada para cada grupo de amostras, nomeadamente sopas, refeições de prato, sobremesas (frutas) e papas. A EDI total foi calculada somando os valores obtidos para os pratos prontos, sobremesas e papas (Tabela 8).

**Tabela 8:** Consumo diário estimado de níquel (EDI) e avaliação de risco para as diferentes faixas etárias usando concentrações médias e o pior cenário.

		<b>EDI Sopas</b> (µg/kg de peso corporal)	<b>EDI Refeições de prato</b> (µg/kg de peso corporal)	<b>EDI Sobremesas</b> (µg/kg de peso corporal)	<b>EDI Papas</b> (µg/kg de peso corporal)	<b>Avaliação do risco</b> (EDI/TDI) × 100 (%)
<b>6 Meses</b>	Média	0,636	0	0,263	0,263	8,9
	Pior cenário	1,757	0	0,263	0,263	17,6
<b>1 Ano</b>	Média	0,200	0,846	0,315	1,342	20,8
	Pior cenário	0,263	1,874	0,315	3,5	45,8
<b>2 Anos</b>	Média	0,398	0,697	0,561	1,890	27,3
	Pior cenário	1,043	1,497	0,856	4,929	64,0

A EDI para as diferentes faixas etárias utilizando as concentrações médias variou entre 0,200 µg/Kg e 1,890 µg/Kg e, para o pior cenário variou entre 0,263 µg/Kg e 4,929 µg/Kg.

Analisando a Tabela 8, as exposições estimadas, em relação às frutas, servidas à sobremesa, e as papas, servidas ao lanche, aumentaram com as faixas etárias devido ao consumo de quantidades superiores desse tipo de alimentos ao longo do tempo. Quanto às sopas verifica-se um decréscimo na exposição estimada pela diminuição da quantidade de alimento consumido, associada a um aumento do peso corporal. No caso das refeições de prato, embora a quantidade de alimento ingerido seja superior do 1º para o 2º ano de idade, o peso corporal também aumenta, motivo pelo qual a exposição estimada também diminui.

Efetuada a avaliação de risco, através do cálculo do percentual de EDI em relação à TDI atual (13 µg/Kg de peso corporal) pode observar-se a obtenção de valores inferiores a 100%, o que sugere a ausência de risco associado à ingestão de Ni por intermédio de alimentação caseira. Verificou-se que apenas para a faixa etária dos dois anos e, utilizando o pior cenário, se obteve um valor superior a 50%. Estes resultados evidenciam a possibilidade de se estar a subestimar o risco, especialmente para as faixas etárias mais vulneráveis. Utilizando a TDI preconizada pela EFSA em 2015 (2,8 µg/Kg de peso corporal), os resultados ultrapassariam os 100% para as faixas etárias de um e dois anos ao utilizar o pior cenário, com valores até 297,3%. Além disso, para a faixa etária de 2 anos, mesmo utilizando as concentrações médias, foram observados valores até 126,6%.

Os resultados obtidos para o EDI referentes aos alimentos de confeção caseira estão em concordância com os referidos para alimentos pré-preparados. Em Portugal, observou-se um EDI, para concentrações médias, a variar entre 0,95 µg/Kg e 3,13 µg/Kg e, para o pior cenário variou entre 3,75 µg/Kg e 13,90 µg/Kg (Pereira *et al.*, 2020).

Na literatura, a utilização do valor de TDI de 2,8 µg/Kg evidencia a obtenção de valores superiores a 100%, transversal a todas as faixas etárias para o pior cenário com valores até 497%. (Pereira *et al.*, 2020). Para bebés não amamentados de 0 a 9 meses de idade, de quatro países europeus, foi obtido um EDI de até 20 µg/ Kg associado a alimentos do mercado da UE (Pandelova *et al.*, 2012). Na Europa, para bebés e crianças, em comparação com os adultos, apresentaram a maior exposição crónica ao Ni na dieta, com ingestão de 13,1 e 20,1 µg/kg, para o EDI médio e máximo, respetivamente (EFSA, 2015). No Paquistão, observou-se um EDI entre 1,77 e 4,03 µg/kg, pela ingestão de alimentos pré-preparados para bebés (Kazi *et al.*, 2010).

Os dados acima evidenciados demonstram que a ingestão de alimentos de confeção caseira resulta numa exposição ao Ni semelhante comparativamente a alimentos pré-preparados, sugerindo que o risco não se deve apenas ao consumo destes últimos.

Em síntese, os resultados obtidos neste trabalho evidenciam mais uma vez que a complexidade do processo culinário, nomeadamente o tipo de método e o tempo de confeção despendido, bem como os utensílios utilizados, a par da conjugação de alimentos com teores mais elevados de Ni, tendem a aumentar a exposição a este metal e o consequente risco para as crianças, demonstrando assim a importância em estabelecer LMR.

### 3. Conclusão

Este estudo demonstra que existe uma presença generalizada de Ni em alimentos de confeitaria caseira, resultado que já se verificava em alimentos infantis pré-fabricados comercialmente.

Do total de amostras analisadas, 82,9% destas encontravam-se contaminadas, com frequências de detecção que oscilaram entre os 64% e 100% e uma concentração média de 38,71 µg/Kg. Em relação ao tipo de alimentos, as concentrações médias foram, em ordem decrescente, papas (134,2 µg/Kg), frutas cozidas ou frescas (44,61 µg/Kg), pratos principais (43,99 µg/Kg) e sopas (32,19 µg/Kg).

Verificou-se significância estatística entre as refeições compostas por carne e as refeições compostas por peixe, independentemente da faixa etária, com as refeições de peixe a apresentar uma concentração média (62,16 µg/Kg) e máxima (147,8 µg/Kg) superiores. Na faixa etária dos 6 aos 9 meses também se verificou significância estatística entre puré de legumes e o puré de legumes com carne de coelho e bovino, sendo este último o que apresenta concentração média (47,30 µg/Kg) e máxima (106,10 µg/Kg) superior.

Os resultados obtidos neste estudo para a ocorrência de Ni em alimentos de confeitaria caseira para bebés foram semelhantes aos de outros estudos e tendencialmente inferiores quando comparados com alimentos pré-fabricados comercialmente, excetuando-se o caso particular das papas caseiras. A conjugação de alimentos com teores tendencialmente altos de Ni, como são exemplos os vegetais, cereais e as leguminosas, tendem a contribuir para valores gerais superiores.

Realizando a avaliação de risco, as faixas etárias não apresentaram risco (<100%), utilizando quer as concentrações médias, quer o pior cenário. Porém, utilizando o valor para a TDI preconizado pela EFSA em 2015, os resultados obtidos neste estudo apresentariam risco.

Este estudo destaca a possível subestimação do risco para a saúde pública, nomeadamente para as crianças, como grupo particularmente vulnerável, da ingestão de Ni através de alimentos de confeitaria caseira.

Estes resultados vêm demonstrar a importância de aprofundar o conhecimento no que refere ao impacto da complexidade do processo culinário, nomeadamente o tipo de método e o tempo de confeitaria despendido, bem como os utensílios utilizados, a par da implementação de programas de vigilância, garantindo que o novo valor de TDI, que sugere uma menor toxicidade do Ni, não seja suficientemente protetor para os grupos de maior vulnerabilidade, designadamente os bebés e as crianças. Este último ponto deve ser complementado pela implementação de legislação referente ao LMR para o Ni em alimentos.

#### 4. Referências bibliográficas

AGGETT, Peter J. - Population reference intakes and micronutrient bioavailability : 91:2010). doi: 10.3945/ajcn.2010.28674C.2

ALVISI, Patrizia *et al.* - OF PEDIATRICS Recommendations on complementary feeding for healthy , full-term infants. ITALIAN JOURNAL OF PEDIATRICS. . ISSN 2015) 1–9. doi: 10.1186/s13052-015-0143-5

CAMPOS, Ellen Mariany Ferraz De *et al.* - Quantificação de minerais em sucos industrializados. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR. January 2010 (2010).

CARRAPATOSO, Isabel *et al.* - Dermatite endógena induzida pela ingestão de níquel. Revista Portuguesa de Imunoalergologia. (2004). 261–270. Disponível em: <http://rihuc.huc.min-saude.pt/handle/10400.4/1230>

CEMPEL, M.; NIKEL, G. - Nickel : A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. 15:3 (2006) 375–382.

COSTA, Sandra - Espectrofotometria de Absorção Atômica, atual. 2013.

CSUROS, Maria; CSUROS, Csaba - Environmental Sampling and Analysis for Metals. ISBN 156670572X

CUBADDA, Francesco; RAGGI, Andrea - Determination of cadmium, lead, iron, nickel and chromium in selected food matrices by plasma spectrometric techniques. Microchemical Journal. . ISSN 0026265X. 79:1–2 (2005) 91–96. doi: 10.1016/j.microc.2004.10.007

DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. - Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. Critical Reviews in Oncology/Hematology. ISSN 10408428. 42:1 (2002) 35–56. doi: 10.1016/S1040-8428(01)00214-1

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - Consultas de Vigilância de Saúde Infantil e Juvenil ACTUALIZAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO (2006).

DOBROWOLSKI, Ryszard; OTTO, Magdalena - Determination of nickel and cobalt in reference plant materials by carbon slurry sampling GFAAS technique after their simultaneous preconcentration onto modified activated carbon. Journal of Food Composition and Analysis. . ISSN 08891575. 26:1–2 (2012) 58–65. doi: 10.1016/j.jfca.2012.03.00.

DORESWAMY, Kodipura; SHRILATHA, Balakrishna; RAJESHKUMAR, Thimappa - Nickel-Induced Oxidative Stress in Testis of Mice : Evidence of DNA Damage and Genotoxic Effects.



25:6 (2004) 996–1003.

DUDA-CHODAK, Aleksandra; BŁASZCZYK, Urszula - The impact of nickel on human health. *Journal of Elementology*. ISSN 1644-2296. 13:4 (2008) 685–696.

EDQM, European Directorate For The Quality Of Medicines & Health Care - ANNUAL REPORT

EFSA - Scientific Opinion on the appropriate age for introduction of complementary feeding of infants I EFSA Panel on Dietetic Products , Nutrition and Allergies ( NDA ) 2 , 3. 7:2009) 1–38. doi: 10.2903/j.efsa.2009.1423

EFSA - Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. *EFSA Journal*. ISSN 18314732. 13:2 (2015). doi: 10.2903/j.efsa.2015.4002

ESPGHAN COMMITTEE, Espghan *et al.* - Breast-feeding : A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. 3 (2009) 112–125.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY. *Prescrire International*. . ISSN 11677422. 20:121 (2011) 278.

FRESCHI, Gian Paulo Giovanni *et al.* - ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA MULTIELEMENTAR SIMULTÂNEA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE – UMA REVISÃO DA TÉCNICA E APLICAÇÕES. 25:2000).

HOJSAK, Iva *et al.* - Young Child Formula : A Position Paper by the ESPGHAN Committee on Nutrition. 66:1 (2018) 177–185. doi: 10.1097/MPG.0000000000001821

HU, Bifeng *et al.* - Heavy Metal Pollution Delineation Based on Uncertainty in a Coastal Industrial City in the Yangtze River Delta, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. . ISSN 1660-4601. 15:4 (2018) 710. doi: 10.3390/ijerph15040710

IKEM, Abua *et al.* - Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. *Food Chemistry*. ISSN 03088146. 77:4 (2002) 439–447. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00378-8

IMYIM, Apichat; DAORATTANACHAI, Pornlada; UNOB, Fuangfa - Determination of Cadmium, Nickel, Lead, and Zinc in Fish Tissue by Flame and Graphite Furnace Atomic Absorption after Extraction with Pyrrolidine Dithiocarbamate and Activated Carbon. *Analytical Letters*. ISSN 00032719. 46:13 (2013) 2101–2110. doi: 10.1080/00032719.2013.784913

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) - Arsenic, Metals, Fibres and Dusts: Nickel and Nickel Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 100C:2012) 169–218.

JELLESEN, M. S.; RASMUSSEN, A. A.; HILBERT, L. R. - A review of metal release in the food industry. *Materials and Corrosion*. ISSN 09475117. 57:5 (2006) 387–393. doi: 10.1002/maco.200503953

KAZI, Tasneem G. *et al.* - Evaluation of toxic elements in baby foods commercially available in Pakistan. *Food Chemistry*. ISSN 03088146. 119:4 (2010) 1313–1317. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.003

LONDOÑO-FRANCO, Luis Fernando; LONDOÑO-MUÑOZ, PAULA TATIANA MUÑOZ-GARCÍA, Fabián Gerardo - Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. . ISSN 1909-9959. 14:2 (2016) 145. doi: 10.18684/bsaa(14)145–153.

MARTINS, Carla Teles *et al.* - convencional e biológica , destinados à alimentação infantil  
Ocurrence of cadmium in cereal-based baby foods from conventional and organic farming. 2009) 10–14.

MERIAN, Ernest - Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium , nickel , cobalt beryllium , arsenic , cadmium and selenium , and. January 2015 (1984) 37–41. doi: 10.1080/02772248409357038.

MIR-MARQUÉS, Alba *et al.* - Mineral profile of Spanish commercial baby food. *Food Chemistry*. . ISSN 18737072. 172:2015) 238–244. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.074

NAKANO, Viviane; AVILA-CAMPOS, Mário Julio - METAIS PESADOS: UM PERIGO EMINENTE [Consult. 20 mar. 2020]. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~mariojac/links.html>

Directiva 94/27/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Junho de 1994. (94- 1–2.

ONIANWA, P. C. *et al.* - Cadmium and Nickel Composition of Nigerian Foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. . ISSN 08891575. 13:6 (2000) 961–969. doi: 10.1006/jfca.2000.0944

OZDEMIR, Sadin; KILINC, Ersin; ONER, Ebru Toksoy - Preconcentrations and determinations of copper, nickel and lead in baby food samples employing *Coprinus silvaticus* immobilized multi-walled carbon nanotube as solid phase sorbent. *Food Chemistry*. ISSN 18737072.

276:April 2017 (2019) 174–179. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.123

PAIVA, Esther Lima; MORGANO, Marcelo Antônio; ARISSETO-BRAGOTTO, Adriana Pavesi - Occurrence and determination of inorganic contaminants in baby food and infant formula. *Current Opinion in Food Science*. ISSN 22147993. 30:2019) 60–66. doi: 10.1016/j.cofs.2019.05.006

PANDELOVA, Marchela *et al.* - Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for minerals and trace elements. *Journal of Food Composition and Analysis*. . ISSN 08891575. 27:2 (2012) 120–127. doi: 10.1016/j.jfca.2012.04.011

PEETERS, Kelly *et al.* - Nickel speciation in cocoa infusions using monolithic chromatography – Post-column ID-ICP-MS and Q-TOF-MS. *Food Chemistry*. ISSN 18737072. 230:2017) 327–335. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.050

PEREIRA, André M. P. T. *et al.* - Exposure to nickel through commercial premade baby foods: Is there any risk? *Journal of Food Composition and Analysis*. ISSN 08891575. 92:May (2020) 103541. doi: 10.1016/j.jfca.2020.103541

PETERSON, Lynsey R. *et al.* - Spread of metals through an invertebrate food chain as influenced by a plant that hyperaccumulates nickel. *Chemoecology*. ISSN 09377409. 13:2 (2003) 103–108. doi: 10.1007/s00049-003-0234-4

RECOMENDAÇÃO (UE) DA COMISSÃO de 6 de julho de 2016 sobre a monitorização do níquel nos alimentos. 16- 1–2. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016H1111&from=PT>

Regulamento (CE) n° 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os valores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* (06- L 364/5-L 364/24).

RÊGO, Carla *et al.* - Alimentação saudável dos 0 aos 6 anos - Linhas De Orientação Para ProfissionaisEe Educadores. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/alimentacao-saudavel-dos-0-aos-6-anos-linhas-de-orientacao-para-profissionais-e-educadores-pdf.aspx>. ISBN 9789726752929

REHMAN, Kanwal *et al.* - Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*. ISSN 10974644. 119:1 (2018) 157–184. doi: 10.1002/jcb.26234

ROYCHOWDHURY, Tarit; TOKUNAGA, Hiroshi; ANDO, Masanori - Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal, India. *Science of the Total Environment*. ISSN 00489697. 308:1–3 (2003) 15–35. doi: 10.1016/S0048-9697(02)00612-5

SCHNELL, Kerstin *et al.* - Dietary intake of nickel and zinc by young children – Results from food duplicate portion measurements in comparison to data calculated from dietary records and available data on levels in food groups *J u.* 23:2009) 183–194. doi: 10.1016/j.jtemb.2009.03.007

SCHRENK, Dieter *et al.* - Update of the risk assessment of nickel in food and drinking water. *EFSA Journal*. ISSN 18314732. 18:11 (2020). doi: 10.2903/j.efsa.2020.6268

SILVA, Ana Isabel; AGUIAR, Hélder Gabriel - [Diversification in the first year of food life]. *Acta medica portuguesa*. ISSN 1646-0758. 24 Suppl 4:2011) 1035–40. doi: 10.20344/amp.1562

ŠKRBIĆ, Biljana *et al.* - Essential and toxic elements in commercial baby food on the Spanish and Serbian market. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*. ISSN 19393229. 10:1 (2017) 27–38. doi: 10.1080/19393210.2016.1242661

SLAVIN, Walter - [12] ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY 117 [12] Atomic Absorption Spectrometry. 158:1986 (1988) 117–145.

SPP, Comissão De Nutrição Da - Alimentação e nutrição do lactente. *Acta Pediátrica Portuguesa*. 43:5 (2012) S17–S40. ISSN 0873-9781

TUZEN, Mustafa *et al.* - A preconcentration system for determination of copper and nickel in water and food samples employing flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*. ISSN 03043894. 162:2–3 (2009) 1041–1045. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.05.154

VANDERVOET, A. M. M.; RIDDLE, C. - *The Analysis of Geological Materials Volume I: A Practical Guide*. ISBN 0774355867

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

VIETS, J. G.; O'LEARY, R. M. - The role of atomic absorption spectrometry in geochemical exploration. *Journal of Geochemical Exploration*. ISSN 03756742. 44:1–3 (1992) 107–138. doi: 10.1016/0375-6742(92)90049-E

VIÑAS, P.; PARDO-MARTINEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. - Determination of copper, cobalt, nickel, and manganese in baby food slurries using electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 00218561. 48:12 (2000) 5789–5794. doi: 10.1021/jf000479e

VRAGOVIĆ, Natalija - Dietary exposure assessment of chemicals in food. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. May (2005) 1–88.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)-THE OPTIMAL DURATION OF EXCLUSIVE REPORT OF AN EXPERT CONSULTATION (2001). March. Disponible en: [https://www.who.int/nutrition/publications/optimal\\_duration\\_of\\_exc\\_bfeeding\\_report\\_eng.pdf](https://www.who.int/nutrition/publications/optimal_duration_of_exc_bfeeding_report_eng.pdf)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - NUTRIENT ADEQUACY OF EXCLUSIVE FOR THE TERM INFANT DURING THE FIRST SIX MONTHS OF LIFE. (2002). Disponible en: [https://www.who.int/nutrition/publications/nut\\_adequacy\\_of\\_exc\\_bfeeding\\_eng.pdf](https://www.who.int/nutrition/publications/nut_adequacy_of_exc_bfeeding_eng.pdf)

XU, Hongbo *et al.* - Simultaneous preconcentration of cadmium and lead in water samples with silica gel and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Environmental Sciences (China)*. ISSN 10010742. 25:S1 (2013) S45–S49. doi: 10.1016/S1001-0742(14)60624-0

YEBRA, M. C.; CANCELA, S.; CESPÓN, R. M. - Automatic determination of nickel in foods by flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*. ISSN 03088146. 108:2 (2008) 774–778. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.019

YUSUF, A. A.; AROWOLO, T. A.; BAMGBOSE, O. - Cadmium, copper and nickel levels in vegetables from industrial and residential areas of Lagos City, Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*. ISSN 02786915. 41:3 (2003) 375–378. doi: 10.1016/S0278-6915(02)00223-5

ZAND, Nazanin *et al.* - Elemental content of commercial «ready to-feed» poultry and fish based infant foods in the UK. *Food Chemistry*. ISSN 03088146. 135:4 (2012) 2796–2801. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.034

## 5. Anexo

Faixa Etária	Refeição	Nº de Amostras	Frequência de deteção (%)	Min.-Máx. (µg/Kg)	Média (µg/Kg)
4 - 6 Meses/ 9-12 Meses	Puré de legumes	14	64	n.d. - n.q.	20,01
	Puré de legumes com carne	35	71	n.d. - 108,50	35,61
	- Carne de aves	21	57	n.d. - 108,50	27,82
	- Carne de coelho e bovino	14	93	n.d. - 106,10	47,30
6 - 9 Meses	Puré de legumes com peixe	23	83	n.d. - 61,95	26,10
	- Peixe gordo	4	75	n.d. - 61,95	30,81
	- Peixe magro	19	84	n.d. - 56,55	25,11
	Refeições de carne				
	- Carne branca	11	100	n.q. - 93,90	40,65
9 - 12 Meses	Refeições de peixe	5		n.q. - 147,80	68,44
	- Peixe gordo	1	100	147,80	147,80
	- Peixe magro	4		n.q. - 72,30	48,60
4 - 12 Meses	Puré de fruta	3	100	n.q.	26,30
	Sopa de legumes/ Canja	17	88	n.d. - 113,8	43,44
	Refeições de carne	13	69	n.d. - 85,60	28,61
	- Carne branca	9	67	n.d. - 85,60	31,60
	- Carne vermelha	4	75	n.q. - n.q.	21,90
	Refeições de peixe	6		n.q. - 89,00	56,93
	- Peixe gordo	1	100	n.q.	26,30
	- Peixe magro	5		n.q. - 89,00	63,06
>12 Meses	Refeições ovolactovegetarianas	6	100	n.q. - 116,8	50,13
	Fruta crua	10	100	n.q. - 85,55	56,05
	Papas	3	100	n.q. - 350,00	134,20

n.d. - não detetado; n.q. - não quantificado