

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Análise do teor de contaminantes químicos em alimentos provenientes de áreas ardidas na região Centro

Maria Catarina Gil Sequeira

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professora Deodália Dias (FCUL)
Doutora Sónia Namorado (INSA)

2021

Resumo

Os incêndios florestais são fenómenos que impactam o meio natural. Durante um incêndio, a combustão da matéria orgânica e subsequente deposição de cinzas, induz alterações nos solos. Especificamente, o aumento da temperatura nas camadas superficiais promove a quebra de ligações em compostos organometálicos, favorável à libertação e acréscimo de metais nos solos ardidos. Através da absorção radicular, as espécies vegetais acumulam teores elevados destes e, caso se destinem ao consumo humano, tornam-se numa fonte de exposição a contaminantes.

Sendo Portugal um dos países europeus com elevada incidência de incêndios florestais, o presente trabalho teve como objetivos quantificar o teor de contaminantes químicos inorgânicos em alimentos colhidos em 2019 nas áreas afetadas pelos incêndios de 2017 na região Centro, averiguar o risco de exposição das populações locais associado ao consumo desses alimentos e avaliar a evolução dos teores de contaminantes químicos entre 2017 e 2019. Foram analisados alimentos frequentemente consumidos pelas populações locais.

Foi efetuada a quantificação de crómio (Cr), cobalto (Co), arsénio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb), em amostras de batata, cebola, couve e ovos, colhidas em 2019, utilizando espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo.

Analisando os resultados obtidos, verificou-se que nenhuma amostra apresentou teores superiores à legislação em vigor. A ingestão dos alimentos analisados não parece contribuir de forma significativa para a exposição humana aos contaminantes químicos analisados, não evidenciando riscos para a saúde das populações locais.

Comparando com amostras controlo, as amostras de couve analisadas apresentam teores superiores de Cr e Pb para a maioria dos produtores, e em alguns casos, teores superiores de Co, As e Cd.

Entre 2017 e 2019, verificou-se um aumento na média do teor de Cr e uma diminuição na média do teor de As para as amostras de batata e couve. Ainda, nas amostras de batata observou-se uma redução na média do teor de Cd, enquanto nas amostras de couve, se verificou um aumento na média do teor de Pb.

Palavras-chave: Incêndios florestais, contaminantes químicos, alimentos, saúde humana

Abstrat

Forest fires are phenomenon that affect the natural environment. During a fire, the combustion of organic matter and subsequent deposition of ashes induces changes in soils. Specifically, the increased temperature in the superficial layers promotes the breaking of bonds in organometallic compounds, favorable to the release and increase of metals in burnt soils. Through root uptake, plant species accumulate high concentrations of these substances and become a source of exposure to contaminants, if consumed by humans.

Since Portugal has a high incidence of forest fires, this work aimed to quantify the content of inorganic chemical contaminants in food harvested in 2019 from areas affected by the 2017 fires in the Central Region, to investigate the risk of exposure of local populations associated to consumption of local foods and to assess the evolution of the levels of chemical contaminants between 2017 and 2019. Foods frequently consumed by the resident populations were analysed.

The methodology adopted for the quantification of chromium (Cr), cobalt (Co), arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb), in samples of potato, onion, cabbage and eggs, harvested in 2019, was the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

According to the results obtained, no sample presented levels higher than the legislation in force. The ingestion of the analysed foods does not seem to contribute significantly to the human exposure to the chemical contaminants analyzed, not evidencing risks to the health of local populations.

In comparison with control samples, the analyzed cabbage samples showed, for most producers, higher levels of Cr and Pb, and for some, higher levels of Co, As and Cd.

Between 2017 and 2019, there was an increase in the average Cr content and a decrease in the average As content in both potato and cabbage samples. Also, in potato samples a decrease in the average Cd content was reported, while in cabbage samples a increase in the average Pb content was observed.

Keywords: *Wildfire, Chemical contaminants, Foodstuff, Human Health*

Índice

Agradecimentos.....	VII
Lista de tabelas	IX
Lista de figuras	X
Lista de abreviaturas, símbolos e fórmulas	XII
Capítulo I - Introdução	
1.1 Enquadramento do trabalho.....	1
1.2 Objetivos	1
1.3 Metodologia	2
1.4 Estrutura da dissertação.....	2
Capítulo II - Estado de Arte	
2.1 Incêndios florestais.....	4
2.1.1 Incêndios de 2017 em Portugal	4
2.1.2 Impacto dos incêndios nos ecossistemas florestais	5
2.1.2.1 O efeito das cinzas no solo	6
2.2 Contaminantes químicos inorgânicos.....	7
2.2.1 Contaminantes químicos inorgânicos nas espécies vegetais	8
2.2.2 Efeitos de contaminantes químicos inorgânicos na saúde Humana	9
2.2.2.1 Crómio	9
2.2.2.2 Cobalto.....	10
2.2.2.3 Arsénio.....	10
2.2.2.4 Cádmio.....	11
2.2.2.5 Chumbo	12
2.3 Determinação analítica de contaminantes químicos inorgânicos em alimentos.....	13
2.3.1 Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo.....	13
2.3.1.1 Princípio do método.....	14
2.3.1.2 Interferências	17
2.3.2 Controlo de Qualidade Interno	18
2.3.2.1 Soluções branco	18
2.3.2.2 Análise de replicados	19
2.3.2.3 Soluções Spike.....	19
2.3.2.4 Soluções de Controlo de Qualidade.....	19
2.3.2.5 Padrão interno	20

Capítulo III - Materiais e Amostras em Estudo

3.1 Caracterização das amostras em estudo	21
3.2 Materiais, equipamentos e soluções	21
3.2.1 Equipamentos	21
3.2.2 Material.....	22
3.2.3 Reagentes e padrões	22

Capítulo IV - Procedimento Experimental

4.1 Digestão ácida	23
4.2 Preparação de soluções padrão.....	23
4.2.1 Soluções padrão da curva de calibração	23
4.2.2 Soluções padrão de controlo da qualidade	24
4.2.3 Padrão interno.....	24
4.3 Análise por ICP-MS	25
4.3.1 Performance report	25
4.3.2 Curva de calibração	25
4.3.3 Leitura de soluções	25
4.3.3.1 Critérios de aceitação internos.....	26
4.4 Análise dos resultados obtidos	26

Capítulo V - Resultados e Discussão

5.1 Apresentação e discussão dos resultados obtidos.....	29
5.1.1 Batatas	29
5.1.1.1 5ª Colheita	29
5.1.2 Cebolas	31
5.1.2.1 5ª Colheita	31
5.1.3 Couves	33
5.1.3.1 5ª Colheita	33
5.1.3.2 6ª Colheita	35
5.1.4 Ovos.....	36
5.1.4.1 5ª Colheita	36
5.1.4.2 6ª Colheita	38
5.1.5 Avaliação do risco combinado de exposição.....	40
5.2 Comparação dos resultados obtidos com amostras colhidas em 2017	41
5.2.1 Batatas	41
5.2.2 Couves	44

Capítulo VI - Conclusões

6. Conclusões e considerações finais	48
--	----

Referências bibliográficas	50
Anexos	55

Agradecimentos

Esta dissertação é um dos inícios da minha vida profissional. A sua conclusão não teria sido possível sem o auxílio inestimável de outros. Como tal, presto os meus agradecimentos:

À professora Deodália Dias que, carinhosamente, me apoiou e motivou durante este ano. Estou-lhe sinceramente grata.

À Doutora Isabel Castanheira, por me ter recebido no INSA. À Doutora Sónia Namorado, por ter sido a minha orientadora externa. À Inês Coelho, Sandra Gueifão, à Marta Ventura, à Inês Delgado e à Andreia Matos, colaboradoras do INSA, pela aprendizagem e acolhimento durante este ano.

Ao professor Francisco Martins, a peça final deste puzzle, por me ter guiado sempre com uma boa energia, sempre disponível para qualquer dúvida, sempre prestável e esclarecedor. Um obrigada muito sincero.

À Cláudia e à Sofia, pela amizade, paciência, companhia e motivação.

Ao Henrique, por tudo. Por tudo o que ele é, e por tudo o que ele me dá.

Aos meus pais, à minha irmã, à minha tia, porque sem eles, nunca teria chegado até aqui.

Do fundo do coração, agradeço a todos os que fizeram parte desta etapa na minha vida.

Estou pronta para as próximas... Que venham elas!

Muito obrigada,

Catarina S

“When you have worries about things you don’t know about, like the future, it’s a very good idea to remind yourself of things you do know.”

The Midnight Library, Matt Haig

Lista de tabelas

Tabela 2.1 - Densidade (g/cm^3), número atómico e massa atómica (g/mol) dos contaminantes químicos inorgânicos de interesse ao presente trabalho.

Tabela 2.2 – Teores máximos legislados de Cd, em $\mu\text{g/kg}$ de peso fresco, nos géneros alimentícios de interesse ao presente estudo

Tabela 2.3 – Teores máximos legislados de Pb, em $\mu\text{g kg}$ de peso fresco, nos géneros alimentícios de interesse ao presente estudo.

Tabela 4.1 – Preparação das soluções padrão para o traçado da curva de calibração (CC).

Tabela 4.2 - Gama de trabalho do Cr, Co, As, Cd e Pb, em $\mu\text{g/L}$.

Tabela 5.1 – Análise exploratória dos resultados obtidos ($\mu\text{g/kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata da 5ª colheita ($n = 12$).

Tabela 5.2 – Análise exploratória dos resultados obtidos ($\mu\text{g/kg}$ de peso fresco) nas amostras de cebolas da 5ª colheita ($n = 5$).

Tabela 5.3 – Análise exploratória dos resultados obtidos ($\mu\text{g/kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve da 5ª colheita ($n = 15$).

Tabela 5.4 – Análise exploratória dos resultados obtidos ($\mu\text{g/kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve da 6ª colheita ($n = 12$).

Tabela 5.5 - Análise exploratória dos resultados obtidos ($\mu\text{g/kg}$ de peso fresco) nas amostras de ovo da 5ª colheita ($n = 12$).

Tabela 5.6 – Análise exploratória dos resultados obtidos ($\mu\text{g/kg}$ de peso fresco) nas amostras de ovo da 6ª colheita ($n = 4$).

Tabela 5.7 – Ingestão diária estimada, por $\mu\text{g/dia}$, dos contaminantes químicos analisados com base no consumo médio dos alimentos amostrados na 5ª colheita, na população da região Centro.

Tabela 5.8 – Valor mínimo, média e valor máximo obtidos para cada elemento químico ($\mu\text{g/kg}$ de peso fresco) nas 3 colheitas de amostras de batata ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Tabela 5.9 – Valor mínimo, média e valor máximo obtidos para cada elemento químico ($\mu\text{g/kg}$ de peso fresco) nas 4 colheitas de amostras de couve ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Lista de figuras

- Figura 2.1** – Distribuição das áreas ardidadas em Portugal em 2017, reportado a 29 de setembro.
- Figura 2.2** - Elementos químicos analisados pelo ICP-MS (a cores).
- Figura 2.3** - Representação esquemática das principais componentes do ICP-MS.
- Figura 2.4** - Representação esquemática do sistema de introdução de amostra.
- Figura 2.5** - Representação esquemática da tocha, do gerador de radiofrequência e do sistema de interface.
- Figura 2.6** - Representação esquemática do sistema de interface e respetivos cones *sampler e skimmer*, e lentes iónicas.
- Figura 2.7** – Representação esquemática do analisador de massas em quadrupolo.
- Figura 5.1** - Representação gráfica do teor de Cr, Co, As, Cd e Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata da 5ª colheita ($n = 12$).
- Figura 5.2** - Representação gráfica do teor obtido de Cr, Co, As, Cd e Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de cebola da 5ª colheita ($n = 5$).
- Figura 5.3** - Representação gráfica do teor obtido de Cr, Co, As, Cd e Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve da 5ª colheita ($n = 15$).
- Figura 5.4** - Representação gráfica do teor obtido de Cr, Co, As, Cd e Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve da 6ª colheita ($n = 12$).
- Figura 5.5** - Representação gráfica do teor obtido de Cr, Co, As, Cd e Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de ovo da 5ª colheita ($n = 12$).
- Figura 5.6** - Representação gráfica do teor obtido de Cr, Co, As, Cd e Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de ovo da 6ª colheita ($n = 4$).
- Figura 5.7** – Comparação do teor de Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$.
- Figura 5.8** – Comparação do teor de Co ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21).
- Figura 5.9** – Comparação do teor de As ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. **** $p < 0,0001$.
- Figura 5.10** – Comparação do teor de Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.
- Figura 5.11** – Comparação do teor de Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21).
- Figura 5.12** – Comparação do teor de Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.
- Figura 5.13** – Comparação do teor de Co ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Figura 5.14 – Comparação do teor de As ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 5.15 – Comparação do teor de Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Figura 5.16 – Comparação do teor de Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21) Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$.

Lista de abreviaturas, símbolos e fórmulas

RM ANOVA – Análise de Variância de Medições Repetidas (do inglês *Repeated Measures Analysis of Variance*)

ADN – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

Ar – Árgon

As – Arsénio

C – Carbono

Ca²⁺ – Ião cálcio

CC – Curva de Calibração

CH₄ – Metano

Cd – Cádmiio

Co – Cobalto

CO – Monóxido de Carbono

CO₂ – Dióxido de Carbono

CONFFIAR – Contaminantes químicos provenientes dos Fogos Florestais com Impacte nos Alimentos da Região

Cr – Crómio

CV – Coeficiente de Variação

DAN – Departamento de Alimentação e Nutrição

DSA – Dose Semanal Admissível

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês *European Food Safety Authority*)

FAO – Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

Ge – Germânio

He – Hélio

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

HNO₃ – Ácido Nítrico

IAN-AF – Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (do inglês *International Agency for Research on Cancer*)

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

ICP-MS – Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

In – Índio

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IPMA – Instituto Português do Mar e Atmosfera

LOAEL – Dose mínima de efeito adverso observável (do inglês *Lowest Observed Adverse Effect Level*)

LD – Limite de Detecção (do inglês *Limit of Detection*)

LQ – Limite de Quantificação (do inglês *Limit of Quantification*)

Mg – Magnésio

NH₃ – Amoníaco

NO_x – Compostos de óxidos de azoto

O – Oxigénio

OMS – Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization, WHO*)

P – Fósforo

Pb – Chumbo

PFA – Perfluoroalcoxi (do inglês *perfluoroalkoxy*)

PTWI – Ingestão Semanal Tolerável Temporária (do inglês *Provisional Tolerable Weekly Intake*)

QC – Controlo da Qualidade (do inglês *Quality Control*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

S – Estrôncio

SD – Desvio Padrão (do inglês *Standard Deviation*)

SGIF – Sistema de Gestão de Informação de Incêndios Florestais

Y – Ítrio

Capítulo I

Introdução

1.1 Enquadramento do Trabalho

Os incêndios florestais são fenómenos de origem natural e/ou antropogénica que alteram o funcionamento dos ecossistemas naturais. Vários estudos reportam o seu efeito no aumento do teor de contaminantes químicos inorgânicos em solos e recursos hídricos e os possíveis impactos causados no meio ambiente e na saúde pública (Campos et al., 2016; Mansilha et al., 2020). Acresce ainda que a emissão atmosférica de gases e partículas poluentes, durante um incêndio florestal, incrementa os níveis de poluição do ar, agravando os efeitos devidos às alterações climáticas e contribuindo para o aquecimento global (Oliveira et al., 2020).

Na Europa, Portugal é dos países em que a frequência de ocorrência de incêndios florestais é mais elevada, assim como a área ardida anual (Gonçalves, 2021). O mês de junho de 2017 ficou marcado por um conjunto de trágicos incêndios ocorridos nos concelhos de Pedrógão Grande, Castanheira de Pêra e Figueiró dos Vinhos, com graves consequências ambientais, sociais e económicas para as populações residentes na região.

Sob este cenário, é de extrema importância realizar estudos que analisem todos os possíveis impactos que um incêndio florestal, na sua dimensão e severidade, possa induzir no meio ambiente e na saúde das populações afetadas. São poucos os estudos que associam e avaliam a presença de contaminantes químicos inorgânicos procedentes de incêndios florestais em produtos agrícolas. Até à data, foram encontradas apenas duas publicações inerentes ao contributo dos incêndios ocorridos em 2017 na região Centro, no aumento do teor de contaminantes químicos inorgânicos em alimentos provenientes da região (Gueifão et al., 2020; Ventura et al., 2021).

Dada a escassez de estudos desta natureza, torna-se crucial a realização de mais estudos que avaliem a composição de alimentos oriundos de áreas agrícolas afetadas por incêndios florestais, garantindo que estes estejam em conformidade com a legislação em vigor estabelecida pelas entidades de referência, de modo a proteger a saúde pública.

1.2 Objetivos

O presente estudo, inserido no projeto “Contaminantes químicos provenientes dos Fogos Florestais com Impacte nos Alimentos da Região” (CONFFIAR) do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), tem como principal foco a análise do teor de contaminantes químicos inorgânicos em alimentos provenientes de áreas afetadas pelos incêndios de 2017 na região Centro de Portugal.

Com este propósito, foram definidos os seguintes objetivos:

- ✓ Quantificar, através da técnica de espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS), os elementos crómio (Cr), cobalto (Co), arsénio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em

amostras de batata, cebola, couve e ovos, recolhidas em 2019 nas áreas agrícolas afetadas pelos incêndios de 2017.

- ✓ Comparar os valores observados com a literatura encontrada, e quando aplicável, com a legislação europeia em vigor.
- ✓ Avaliar o risco associado à exposição aos contaminantes químicos inorgânicos, na população portuguesa da região Centro, através da ingestão dos alimentos analisados.
- ✓ Comparar os resultados obtidos com resultados de amostras colhidas em 2017, de modo a estabelecer a evolução dos teores dos contaminantes químicos inorgânicos entre 2017 e 2019.

1.3 Metodologia

No âmbito do projeto CONFFIAR, entre 2017 e 2019, foram realizadas seis colheitas de alimentos (duas colheitas por ano) a 16 produtores distribuídos por três municípios da região Centro (Pedrógão Grande, Castanheira de Pêra e Figueiró dos Vinhos) (Gueifão et al., 2020). Os alimentos colhidos pertencem aos seguintes géneros alimentícios: raízes e tubérculos amiláceos (batatas), hortícolas (pimento e chervilha), hortícolas de folha (couves), leguminosas (favas), bolbos vegetais (cebolas), ervas aromáticas ou flores frescas (alecrim, folhas de laranjeira, folhas de limoeiro), ovos em natureza (ovos) e fruta fresca (maçã, pera, kiwi, laranja, ameixa, limão, morango, tangerina e dióspiro).

A componente experimental deste trabalho, desenvolvida no Laboratório de Materiais de Referência do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do INSA, incidiu na quantificação dos elementos Cr, Co, As, Cd e Pb, por ICP-MS, em 68 *pools* de amostras de alimentos colhidos em Janeiro (5ª colheita) e em Maio (6ª colheita) de 2019.

Os dados provenientes da quantificação elementar das amostras em estudo foram analisados com auxílio das ferramentas Microsoft Excel e R (OpenSource e RStudio).

Os resultados obtidos foram comparados com valores encontrados na literatura e com os teores máximos legislados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA). Para avaliar o risco da exposição aos contaminantes químicos inorgânicos na saúde das populações locais, estimou-se a ingestão diária de cada elemento, com posterior comparação com parâmetros de avaliação do risco estipulados pela EFSA. Para averiguar a evolução do teor dos contaminantes químicos inorgânicos entre 2017 e 2019 foram realizadas análises comparativas, mediante testes estatísticos, entre os resultados obtidos nas amostras de batata e couve colhidas nos dois anos em análise.

1.4 Estrutura da Dissertação

A presente dissertação está organizada em seis capítulos.

O capítulo I, Introdução, está dividido em quatro subcapítulos: “Enquadramento do trabalho”, “Objetivos”, “Metodologia” e “Estrutura da dissertação”. Este capítulo tem por objetivo apresentar, sucintamente, os conteúdos desenvolvidos ao longo deste trabalho.

O capítulo II, Estado da Arte, está dividido em três subcapítulos, intitulados “Incêndios florestais”, “Contaminantes químicos inorgânicos” e “Determinação Analítica de Elementos

Inorgânicos em Alimentos”. No primeiro subcapítulo é feito um enquadramento da situação nacional dos incêndios florestais ocorridos em 2017, sendo também abordados alguns conceitos gerais e impactos destes fenómenos nos ecossistemas florestais. O subcapítulo “Contaminantes químicos inorgânicos” descreve os efeitos decorrentes da exposição a contaminantes químicos nas espécies vegetais e na saúde humana, atribuindo-se maior relevância aos elementos químicos de interesse para o presente estudo. O terceiro subcapítulo, “Determinação Analítica de Elementos Inorgânicos em Alimentos”, apresenta uma descrição teórica do método analítico e dos parâmetros de controlo de qualidade internos adotados na componente experimental.

O capítulo III, Materiais e Amostras em Estudo, apresenta a descrição das amostras em estudo e a listagem dos materiais, equipamentos e soluções utilizados.

No capítulo IV, Procedimento Experimental, são descritos os processos de preparação das amostras e das soluções utilizadas na componente experimental e o procedimento analítico realizado nas amostras em estudo.

O capítulo V, Resultados e Discussão, divide-se em 2 subcapítulos. O primeiro subcapítulo, “Apresentação e Discussão dos Resultados Obtidos”, apresenta uma análise descritiva dos resultados obtidos nas amostras de batata, cebola, couve e ovos, colhidas em 2019. Neste subcapítulo, é feita a avaliação do risco associado à exposição, mediante a comparação da ingestão diária estimada com parâmetros de avaliação do risco estipulados pela EFSA. No segundo subcapítulo, “Comparação dos Resultados Obtidos com Amostras colhidas em 2017”, é efetuada a análise comparativa entre os resultados obtidos neste estudo e os resultados obtidos nas amostras de batata e couves colhidas em 2017.

Para finalizar, no capítulo VI, Conclusões, são apresentadas as conclusões e considerações finais do presente trabalho.

Capítulo II

Estado de Arte

2.1 Incêndios Florestais

As florestas, cruciais à sobrevivência dos seres vivos e ao fornecimento de recursos naturais, constituem um ecossistema vulnerável à ocorrência de catástrofes naturais, como secas, ondas de calor e incêndios.

O fogo é um elemento participativo na evolução, distribuição e organização das comunidades bióticas das florestas, contudo, dependendo da sua intensidade, pode afetar negativamente o normal funcionamento destes ecossistemas, colocando em risco a sua preservação e sustentabilidade (Gonçalves et al., 2017).

Os efeitos das alterações climáticas têm provocado disrupções no planeta Terra. Associado ao aumento da frequência e magnitude de fenómenos climáticos extremos, como as temperaturas elevadas e a redução dos níveis de humidade no solo, nos últimos anos tem-se verificado um acréscimo na frequência e severidade de incêndios florestais (Bowman et al., 2020).

As regiões de climas mediterrânicos, como Portugal, onde predominam invernos húmidos e verões secos, são mais propensas ao aparecimento recorrente de incêndios florestais (Gonçalves et al., 2017). No ensaio “Os Incêndios Florestais em Portugal” de António Bento-Gonçalves (Gonçalves, 2021), o autor afirma que as principais causas de ocorrência de incêndios, a nível nacional, se devem à “desestruturação do mundo rural, ao desordenamento do território, à falta de gestão florestal, num contexto onde existe um predomínio das monoculturas de eucalipto e de pinheiro-bravo (a norte do Tejo), e a uma profunda falta de educação florestal”. Por este motivo, afirma ainda que “Portugal apresenta anualmente extensas áreas ardidadas e uma das mais elevadas taxas de ignições, a nível mundial” (Gonçalves, 2021).

2.1.1 Incêndios de 2017 em Portugal

No mês de junho de 2017 foram registados 1 405 fogos na base de dados do Sistema de Gestão de Informação de Incêndios Florestais (SGIF), com 198 incêndios florestais, dos quais resultaram 52 000 ha de área total ardidada (ICNF, 2017a). A nível nacional, estes incêndios estão entre os mais trágicos da última década, tendo provocado a morte de 64 vítimas (ICNF, 2017a). A distribuição das áreas ardidadas em Portugal, entre 1 de Janeiro e 29 de Setembro de 2017, está representada na figura 2.1.

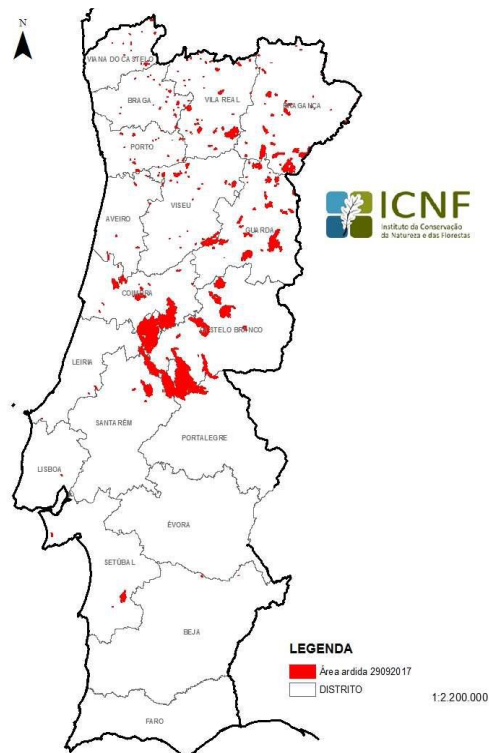


Figura 2.1 – Distribuição das áreas ardidas em Portugal em 2017, reportada a 29 de setembro (ICNF, 2017b) .

Verificou-se à posteriori que o nível catastrófico destes incêndios foi intensificado pelas temperaturas elevadas, pela reduzida humidade no solo e pela predominância de monoculturas de alto teor inflamável (Turco et al., 2019). Segundo o relatório do Instituto Português do Mar e Atmosfera (IPMA), a instabilidade atmosférica, com descargas elétricas sem precipitação e fortes rajadas de vento, favoreceu a rápida propagação do fogo (IPMA, 2017). Os efeitos subsequentes prolongaram-se para lá das fronteiras nacionais, com a formação de uma intensa nuvem de fumo detetada a Norte da Europa (Turco et al., 2019).

Pela forte predisposição à ocorrência de grandes incêndios em Portugal, torna-se crucial aprofundar o conhecimento das possíveis consequências derivadas da ingestão de contaminantes químicos inorgânicos, através do consumo de alimentos oriundos de áreas agrícolas afetadas por incêndios, de forma a salvaguardar a saúde das populações locais.

2.1.2 Impacto dos Incêndios nos Ecossistemas Florestais

Os impactos causados pelos incêndios, ao nível dos ecossistemas florestais, manifestam-se na atmosfera, nas comunidades bióticas, nos solos e nos recursos hídricos.

A contaminação do ar, pela emissão atmosférica de gases e partículas poluentes, é o primeiro impacto induzido pelos incêndios no meio natural (Oliveira et al., 2020). Como mencionado em (Lazaridis et al., 2008), na Europa, os incêndios são responsáveis por um acréscimo de 0,2% a 1,2% nas emissões de óxidos de azoto (NO_x), compostos orgânicos voláteis, metano (CH_4), monóxido e dióxido de carbono (CO e CO_2) e amoníaco (NH_3). É de salientar que a emissão atmosférica de CO_2 agrava o efeito de estufa e reduz a capacidade fotossintética das espécies vegetais, e a emissão de CO exerce efeitos tóxicos ao ser humano (Földi and Kuti, 2016).

Ao nível das comunidades bióticas, o impacto com maior significância reside na destruição dos habitats. Contudo, apesar do fogo impossibilitar a sobrevivência da maior parte das espécies residentes, pode favorecer a eventual colonização de outras que sejam adaptativamente compatíveis com as condições do novo habitat pós-incêndio (Földi and Kuti, 2016).

Nos solos e recursos hídricos, os efeitos mais proeminentes dos incêndios estão associados à degradação total e/ou parcial da cobertura vegetal e às interações entre as cinzas e as camadas de solo subjacentes.

Face às elevadas temperaturas da combustão, parte da componente orgânica do solo é degradada, enquanto a componente mineral é sujeita a alterações físicas e biogeoquímicas (Abraham et al., 2017). Uma das consequências derivadas da degradação da cobertura vegetal é o aumento da exposição da área superficial dos solos, tornando-os vulneráveis à ação erosiva dos agentes da geodinâmica externa (vento, água e seres vivos) (Abraham et al., 2017; Földi and Kuti, 2016). As partículas erodidas podem ser redistribuídas horizontalmente e culminar nos cursos de água superficiais, ou lixiviadas ao longo do perfil do solo, contaminando os cursos de água subterrâneos. Um estudo recente (Mansilha et al., 2020) reporta um aumento no teor de certos elementos químicos, entre os quais Cr, em amostras de águas subterrâneas oriundas de aquíferos periurbanos afetados por incêndios florestais, o que reforça a hipótese de ocorrência de processos de lixiviação nessas áreas. Estes fenômenos, para além de introduzirem sedimentos e poluentes nos cursos de água subterrâneos, favorecem a depleção nutricional e consequente redução da capacidade fértil dos solos ardidos (Abraham et al., 2017).

Acresce ainda que, as temperaturas elevadas da combustão são suficientes para quebrar ligações existentes nos compostos organometálicos, conduzindo ao aumento da exposição dos organismos vivos a metais e outros elementos químicos (Abraham et al., 2017). Os elementos químicos voláteis são distribuídos pelo fumo emitido durante a combustão, enquanto os restantes são incorporados nas cinzas (Bodí et al., 2014). A título de exemplo, (Campos et al., 2016) ao analisar o efeito de incêndios florestais na distribuição de elementos químicos no solo, observou a presença de níveis elevados de Cd e Pb em áreas ardidas, comparativamente a áreas não ardidas. Estes autores, também reportaram níveis de pH e condutividade elétrica superiores em solos ardidos, comparativamente a solos não ardidos. Pensa-se que este cenário ocorra devido à combustão da matéria orgânica e subsequente deposição de cinzas.

2.1.2.1 O efeito das cinzas no solo

Conforme definido por (Bodí et al., 2014), as cinzas são constituídas por um conjunto de partículas remanescentes nos solos resultantes da combustão da matéria orgânica.

Dada a existência de metais na composição das cinzas, quando incorporadas nos solos e após fenômenos de precipitação, pode ocorrer a solubilização de alguns elementos e a sua subsequente disponibilização às espécies vegetais (Bodí et al., 2014). No entanto, estes efeitos são condicionados pela porosidade das cinzas e do solo (Bodí et al., 2014). Cinzas constituídas por partículas de maior calibre e, por isso, com elevada porosidade, conseguem reter quantidades significativas de água, o que propicia a solubilização de determinados elementos químicos. Por seu turno, solos impermeáveis à água, como os solos argilosos, são dotados de uma maior capacidade de retenção, o que permite a acumulação e biodisponibilidade dos elementos solúveis das cinzas depositadas (Bodí et al., 2014). Assim, a eventual presença de elementos potencialmente tóxicos nas cinzas, constitui uma fonte de contaminação dos solos, das espécies vegetais e, quando sujeitas a lixiviação, dos recursos hídricos.

Comumente, o pH das cinzas é superior ao pH do solo subjacente, tendo sido reportados valores de pH entre 7 e 8 em cinzas imediatamente após um incêndio (Campos et al., 2016). Como mencionado em (Bodí et al., 2014), as alterações físico-químicas nos solos induzidas pelas cinzas, como a alcalinização do meio atribuída à presença de alguns compostos solúveis de caráter alcalino, nomeadamente K^+ , Ca^{2+} e Mg^+ , podem alterar a atividade microbiana e inibir a germinação das espécies vegetais. Por este motivo, a inibição da germinação das espécies vegetais decorrente de um incêndio florestal, encontra-se associada à alcalinização do solo, ao impedimento da absorção de água pelas raízes dada a elevada pressão osmótica do meio, e aos possíveis efeitos tóxicos exercidos pelos compostos solúveis das cinzas (Abraham et al., 2017).

Apesar do acréscimo inicial observado nos parâmetros de pH em solos ardidos, estes apresentam uma tendência decrescente a longo prazo, atribuída à formação de húmus e mobilidade das cinzas (Campos et al., 2016).

2.2 Contaminantes químicos inorgânicos

Os elementos químicos inorgânicos ocorrem na crosta terrestre através de processos naturais como a erosão dos solos, erupções vulcânicas, atividades bacterianas, emissões atmosféricas e cósmicas, e de atividades antropogénicas (Engwa et al., 2019). Desde a revolução industrial que a ação antropogénica, mediante a extração mineira, o uso de combustíveis fósseis, a incineração de resíduos, e a aplicação de fertilizantes agrícolas entre outras, tem contribuído para o aumento do teor de metais no meio natural (Abraham et al., 2017).

Na tabela 2.1 encontram-se especificadas as características dos elementos Cr, Co, As, Cd e Pb. Apesar do As apresentar características que o inserem no grupo dos metais, este elemento evidencia também particularidades específicas de não metais. Por este motivo, o As é considerado um metalóide, como será mencionado adiante.

Tabela 2.1 - Densidade (g/cm^3), número atómico e massa atómica (g/mol) dos contaminantes químicos inorgânicos de interesse ao presente trabalho.

Elemento inorgânico	Número atómico	Densidade (g/cm^3)	Massa atómica (g/mol)
Cr	24	7,19	52,0
Co	27	8,9	58,9
As	33	5,7	74,9
Cd	48	8,7	112,4
Pb	82	11,4	207,2

Certos elementos são considerados essenciais ao normal funcionamento biológico, como é o caso do Co e do Cr (Engwa et al., 2019). No entanto, como o grau de toxicidade é, para além de outras condicionantes, dependente do teor do elemento químico, até mesmo elementos considerados essenciais, em quantidades desadequadas aos organismos, podem induzir efeitos tóxicos.

Outros, como o Pb, Cd e As, que em qualquer nível de exposição, não evidenciam benefício biológico, mas induzem efeitos tóxicos, são considerados não essenciais aos organismos vivos (El-Kady and Abdel-Wahhab, 2018; Thompson and Darwish, 2019).

Dadas estas noções, importa esclarecer os efeitos gerais que elementos químicos inorgânicos induzem nas espécies vegetais, em particular nos produtos hortícolas destinados ao consumo humano.

2.2.1 Elementos inorgânicos nas espécies vegetais

As espécies vegetais, como produtores primários, são um passo intermédio na transferência de elementos do solo para níveis tróficos superiores.

O sistema radicular, em paralelo com agentes quelantes, transportadores metálicos e reações de oxidação-redução, consegue solubilizar e absorver elementos químicos presentes na solução do solo, mesmo sob concentrações reduzidas (Manzoor et al., 2018; Rai et al., 2019).

Conforme mencionado em (Gupta et al., 2019), primeiramente ocorre a adsorção dos elementos, sob forma catiónica, na superfície das raízes, seguida da sua absorção a nível celular, mediante gradientes de concentração e recetores iónicos específicos, como as glicoproteínas. Os elementos podem permanecer retidos no apoplasto da raiz ou serem translocados para os vasos xilémicos e floémicos (Gupta et al., 2019). (Gupta et al., 2019) também afirma que plantas com inúmeras raízes conseguem absorver quantidades de elementos químicos superiores às que possuem menor número de raízes. A absorção radicular é também condicionada pelo tipo de elemento e pelos fatores abióticos do meio, na medida em que elementos caracterizados por uma elevada mobilidade no solo e fraca afinidade à matéria orgânica, como o Cd, são mais prováveis de serem absorvidos (Manzoor et al., 2018).

O fenómeno de transpiração foliar também influencia a absorção radicular, exercendo uma tensão ao nível da raiz, pelo défice de água gerado nas folhas (Gupta et al., 2019). Por este motivo, as espécies vegetais folhosas, tais como couves e espinafres, possuem taxas de transpiração e de translocação superiores às das espécies não folhosas, registando quantidades elevadas de elementos acumulados (Gupta et al., 2019). Analogamente à absorção radicular, quanto maior a concentração de elementos presentes na atmosfera, maior a taxa de absorção foliar (Gupta et al., 2019).

Se o meio exterior apresentar teores consideráveis de contaminantes químicos inorgânicos, estes podem ser absorvidos pelas espécies vegetais mediante os processos acima descritos. Especificamente, a presença interna de alguns metais pode induzir toxicidade pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), pelas interferências causadas nos sistemas antioxidantes, na cadeia transportadora de eletrões e em certos processos metabólicos (Gupta et al., 2019).

Remetendo para os incêndios ocorridos em junho de 2017 na região Centro, o estudo de (Ventura et al., 2021) compara a presença de elementos inorgânicos, entre os quais As, Cr, Co, Cd e Pb, em amostra de couves (*Brassica Oleracea*) colhidas em quatro momentos diferentes: um anterior (grupo controlo) e três posteriores aos incêndios (três colheitas). Neste estudo verifica-se um acréscimo nos teores dos elementos analisados entre o grupo controlo e a 1ª colheita, com exceção do Cd e do Pb. Comparando as primeiras colheitas, os autores registaram diferenças significativas nos teores de As e Cr e, comparativamente ao grupo controlo, a 3ª colheita reportou teores de Cr e Pb muito elevados (Ventura et al., 2021). A importância deste estudo deve-se não só ao facto de este elucidar o potencial impacto destes incêndios em espécies vegetais largamente consumidas pelas populações afetadas, como também ao facto deste realçar a vulnerabilidade destas à presença acrescida de contaminantes químicos inorgânicos no meio natural.

2.2.2 Efeitos dos contaminantes químicos inorgânicos na saúde humana

A exposição humana a contaminantes químicos inorgânicos pode ocorrer por absorção, como por exemplo por contacto dérmico, por inalação de poluentes ou por ingestão de alimentos e águas contaminadas.

Após a sua ingestão, os contaminantes químicos inorgânicos são absorvidos no trato gastrointestinal e distribuídos via corrente sanguínea pelos restantes órgãos. De acordo com a literatura, o Pb é transportado pelas células sanguíneas até ao fígado e rins, redistribuindo-se, sob a forma de sais, para o tecido ósseo, dentes e cabelo (Engwa et al., 2019). Por outro lado, o Cd absorvido liga-se às células sanguíneas e a proteínas plasmáticas, como a albumina, através das quais é encaminhado para o fígado e rins, onde se liga a metalotioneínas. Já relativamente ao As, a acumulação deste elemento tem sido reportada ao nível do coração, pulmões, fígado, rins, músculos, tecidos neurais e ainda da pele, unhas e cabelo (Engwa et al., 2019).

Analogamente às espécies vegetais, a toxicidade dos contaminantes químicos inorgânicos no ser humano está associada à produção de ROS e subsequente indução de *stress* oxidativo intracelular, de perturbações nos sistemas antioxidantes e nos processos metabólicos de desintoxicação, entre outros (Gupta et al., 2019). Apesar da toxicidade destes elementos ser comum à maioria dos sistemas de órgãos, a severidade desta é dependente do tipo e especiação do elemento, da via e duração da exposição e dos fatores de suscetibilidade individual (Gupta et al., 2019).

De acordo com (Gupta et al., 2019), os elementos inorgânicos de maior risco à saúde humana são o Cd, o Pb e o As. A literatura refere que, a longo prazo, a acumulação destes elementos no organismo constitui um fator de risco ao desenvolvimento de doenças associadas a processos de degeneração física, muscular e neurológica, nomeadamente, a doença de Parkinson e de Alzheimer (Engwa et al., 2019). Além disso, a exposição contínua e prolongada a certos metais pode favorecer a disrupção dos sistemas endócrinos e hormonais, causar danos ao nível do ADN e, subsequentemente, desencadear o aparecimento de carcinomas (Engwa et al., 2019).

Importa salvaguardar que as associações estabelecidas entre a exposição a um determinado elemento inorgânico e os efeitos manifestados, a curto ou a longo prazo, podem não derivar unicamente da exposição, mas ser resultado de um efeito multifatorial, englobando fatores inerentes ao indivíduo, como o estilo de vida, o ambiente envolvente, o histórico de saúde, e a predisposição genética a certas doenças, entre outros.

2.2.2.1 Crómio

O Cr é um metal do grupo 6 da tabela periódica, que está presente no meio natural sob a forma trivalente (III) e hexavalente (VI) (EFSA, 2014a). A ingestão de alimentos é reportada como a principal fonte de exposição humana ao Cr (> 90% da ingestão total), especificamente o consumo de frutas, vegetais, batatas, gema de ovo e alimentos de origem marinha (Achmad et al., 2017; EFSA, 2014a).

A toxicidade do Cr é dependente da respetiva forma valente. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC), considera o Cr (VI) como substância carcinogénica ao ser humano (Grupo 1) (IARC, 1990). Por outro lado, a IARC não considera o Cr (III) como substância carcinogénica ao ser humano (Grupo 3) (IARC, 1990), sendo o Cr (III) postulado por alguns estudos de suplementação como sendo essencial no metabolismo de glúcidos e lípidos (EFSA, 2014b). Contudo, a opinião científica (EFSA, 2014b) considera estas conclusões pouco fiáveis, pois a maioria

dos estudos foram realizados em indivíduos com quadros clínicos de dislipidemia e intolerância à glucose. Neste âmbito, a EFSA não considera apropriado estabelecer um valor de ingestão diária recomendado para o Cr, pela falta de evidência de potenciais benefícios fisiológicos (EFSA, 2014b). Em concordância com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a EFSA considera que a ingestão de Cr (III) não deve exceder os 250 µg/dia (EFSA, 2010a).

Com base nestas conclusões, a toxicidade do Cr diz respeito à forma hexavalente, enquanto que a forma trivalente carece de evidência científica inerente a possíveis efeitos tóxicos no ser humano.

Sob doses elevadas de Cr (VI), a literatura reporta efeitos ao nível dos sistemas respiratório, hematológico, cardiovascular e gastrointestinal (EFSA, 2014b).

2.2.2.2 Cobalto

O Co, um metal de transição do grupo 9 da tabela periódica, ocorre no meio natural sob os estados oxidativos +2 (II) e +3 (III). Este elemento faz parte da cobalamina (vitamina B12), cuja ingestão diária recomendada é de 2,4 µg, equivalente a 0,1 µg de Co (EFSA, 2009a; Kim et al., 2006).

A ingestão de alimentos é a principal fonte de exposição humana ao Co, em particular os produtos hortícolas, que correspondem a 22% da ingestão diária de Co (ATSDR, 2004). Segundo a (EFSA, 2009a), a dose mínima de Co que provoca efeitos adversos detetáveis na saúde (LOAEL) é de 1 mg/kg de peso corporal.

A IARC considera o Co e os sais solúveis de Co (II) como substâncias possivelmente carcinogénicas ao ser humano (Grupo 2B) (IARC, 2006). Como mencionado em (EFSA, 2009a), estudos *in-vitro* realizados em células de mamífero com sais solúveis de Co (II), como o sulfato de cobalto (CoSO₄), demonstraram efeitos mutagénicos induzidos pela produção de ROS e inibição dos mecanismos de reparação do DNA, enquanto em estudos *in-vivo*, via exposição oral, foram reportados efeitos genotóxicos decorrentes de danos no ADN.

Sucintamente, a monografia de (ATSDR, 2004) refere que a exposição humana por inalação de Co está associada a efeitos ao nível da tiroide e dermatite, sendo este último derivado, simultaneamente, da exposição dérmica e do desenvolvimento de uma reação alérgica ao Co. Ainda, a policitemia (associada ao aumento de eritrócitos no sangue) é considerada o efeito mais sensível face à ingestão de Co, tendo sido observada em indivíduos saudáveis e pacientes anémicos (ATSDR, 2004).

2.2.2.3 Arsénio

O As é considerado um metaloide por evidenciar características típicas de metais e não metais (EFSA, 2009b). Situa-se no grupo 15 da tabela periódica, tal como o azoto (N), com o qual partilha semelhanças químicas (EFSA, 2009b).

A arsenobetaina (AsB) é exemplo de uma espécie orgânica de As estruturalmente semelhante à betaína glicina [(CH₃)₃N+CH₂COO⁻], um composto de N utilizado pelos organismos marinhos na manutenção do equilíbrio osmótico (EFSA, 2021a). Na presença de AsB e de níveis elevados de salinidade no meio, os organismos marinhos ao invés de aumentarem os níveis de betaína glicina, absorvem a AsB do meio, resultando na acumulação desta espécie orgânica em alimentos de origem marinha como crustáceos, peixes ósseos e algas marinhas (EFSA, 2021a).

Nos alimentos de origem terrestre, as formas de As mais comuns são as inorgânicas, como o arsenito (As (III)) e arsenato (As (V)), e as espécies metiladas, como o ácido metilarsônico (MA) e ácido dimetilarsônico (DMA) (EFSA, 2021a).

Na Europa, existe somente legislação para as espécies inorgânicas de As em arroz (200 µg/kg) e produtos à base de arroz (entre 100 µg/kg e 300 µg/kg) (Regulamento (UE) 2015/1006 da Comissão de 25 de junho de 2015, 2015). Ainda, a EFSA identificou uma gama de valores para dose de referência no limite de confiança inferior (BMDL01) entre 0,3 e 8 µg/kg de peso corporal por dia relativamente ao cancro do pulmão, da pele e da bexiga, assim como a lesões cutâneas (EFSA, 2021b).

Conforme a classificação de substâncias da IARC, as espécies inorgânicas de As são consideradas como carcinogénicas ao ser humano (Grupo 1), enquanto as orgânicas não são classificadas como carcinogénicas ao ser humano (Grupo 3) (IARC, 2012). Apesar das formas inorgânicas serem tóxicas ao ser humano, o As (III) é considerado mais tóxico do que o As (V) (EFSA, 2021a). Os efeitos carcinogénicos das espécies inorgânicas estão associados à indução de danos oxidativos, alterações epigenéticas e à inibição dos sistemas de reparação do ADN, não sendo consideradas diretamente reativas com esta molécula (EFSA, 2009b).

Segundo a literatura encontrada, os efeitos associados à exposição crónica a espécies inorgânicas de As incluem lesões dérmicas, como hiperpigmentação e hiperqueratose palmoplantar, que aparentam anteceder ao aparecimento de carcinomas, efeitos ao nível do sistema nervoso e circulatório, alterações hematológicas caracterizadas por anemia e leucopenia, carcinomas em órgãos vitais, atrasos no desenvolvimento infantil e diabetes (EFSA, 2009b).

2.2.2.4 Cádmi

O Cd, um metal do grupo 12 da tabela periódica, pode ser encontrado em zonas mineiras, frequentemente associado ao Pb (Järup, 2003). Na população não fumadora, a ingestão de alimentos consiste na principal via de exposição, em particular os produtos hortícolas, cereais, batatas e outros tubérculos (EFSA, 2009c).

A tabela 2.2 apresenta uma compilação dos teores máximos de Cd legislados pela EFSA nos géneros alimentícios de interesse ao presente estudo, através do Regulamento (UE) 2021/1323 da Comissão Europeia de 10 de agosto de 2021 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006. Para além disso a EFSA estabelece uma dose semanal admissível (DSA) de 2,5 µg/kg de peso corporal (EFSA, 2009c).

Tabela 2.2 – Teores máximos legislados de Cd, em µg/kg de peso fresco, nos géneros alimentícios de interesse ao presente estudo (Regulamento (UE) 2021/1323 da comissão de 10 de agosto de 2021, 2021).

Géneros alimentícios	Teores máximos de Cd (µg/kg de peso fresco)
Raízes e tubérculos, com exceção dos Bolbos	100
Bolbos, exceto alhos	30
Couves de folha	100

Relativamente à classificação atribuída pela IARC, o Cd e respetivos compostos são considerados como carcinogénicos ao ser humano (Grupo I) (IARC, 1993).

A ação tóxica deste elemento no organismo resulta das perturbações na homeostase de elementos essenciais como o Ca, o Zn e o Fe, da indução de stress oxidativo e da inibição de sistemas de reparação de ADN (EFSA, 2009c).

A longo prazo, a exposição humana ao Cd tem sido associada ao aparecimento de carcinomas no pulmão, rins e próstata, e a efeitos tóxicos ao nível do sistema renal, nervoso, endócrino e reprodutor (EFSA, 2009c).

De acordo com (El-Kady and Abdel-Wahhab, 2018), os rins, em especial as células tubulares proximais, são o principal alvo de toxicidade do Cd, sendo que 200 µg/g de Cd no córtex renal é suficiente para desencadear disfunções renais, evidenciadas pelo excesso de proteínas de baixo peso molecular na urina, como as β2-microglobulinas e α1-microglobulinas. Adicionalmente, têm sido reportados danos ao nível do sistema esquelético resultantes da exposição crónica a este elemento, evidenciados pela primeira vez no Japão, na década de 50, onde a utilização contínua de água contaminada por Cd na irrigação de colheitas de arroz levou ao aparecimento da doença itai-itai, cuja sintomatologia é semelhante à da osteomalacia e osteoporose (Järup, 2003).

2.2.2.5 Chumbo

O Pb é considerado um contaminante ambiental, com origem predominante em atividades antropogénicas, como processos mineiros e o fabrico de baterias (EFSA, 2010b). Este elemento situa-se no grupo 14 da tabela periódica, e está presente no meio natural na forma inorgânica e orgânica (EFSA, 2010b).

Na Europa, os cereais, batatas e vegetais folhosos são os géneros alimentícios que mais contribuem para a exposição ao Pb (EFSA, 2010b).

Os teores máximos de Pb legislados pela EFSA nos géneros alimentícios de interesse ao presente estudo, através do Regulamento (UE) 2021/1317 da Comissão Europeia de 9 de agosto de 2021 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006, apresentam-se compilados na tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Teores máximos legislados de Pb, em µg/kg de peso fresco, nos géneros alimentícios de interesse ao presente estudo (Regulamento (UE) 2021/1317 da Comissão de 9 de Agosto de 2021, 2021).

Géneros alimentícios	Teor máximo de Pb (µg/kg de peso fresco)
Raízes e tubérculos, bolbos, leguminosas frescas e produtos hortícolas de caule	100
Couves de folha	300

Devido à inexistência de evidência científica inerente a parâmetros de neurotoxicidade e nefrotoxicidade em adultos, a EFSA não tem estabelecida uma dose semanal admissível (DAS) para Pb (EFSA, 2010b). Contudo, para fins de caracterização de risco, a EFSA considera adequado o uso da dose provisória semanal tolerável (PTWI) de 25 µg/kg de peso corporal, estabelecida pelo comité de especialistas FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA) (EFSA, 2010b).

A IARC classifica os compostos inorgânicos de Pb como provavelmente carcinogénicos (Grupo 2A), enquanto os orgânicos não são considerados carcinogénicos ao ser humano (Grupo 3) (IARC, 2004).

Após absorção, o Pb é transferido e acumulado nos tecidos moles (fígado, rins e cérebro) e tecidos ósseos, sendo o tempo de semivida estimado no organismo de 10 a 30 anos (El-Kady and Abdel-Wahhab, 2018). No tecido ósseo, o Pb tem a capacidade de substituir os íons Ca^{2+} , pela semelhança estrutural evidenciada, provocando *stress* oxidativo nas membranas celulares (EFSA, 2010b).

Com base em estudos de avaliação do risco, a EFSA considera que, a longo prazo, a exposição humana ao Pb resulta em efeitos neurotóxicos, cardiovasculares e nefrotóxicos (EFSA, 2010b). Estes efeitos são mais severos durante a fase infantojuvenil, por sua vez coincidente com o período crítico do desenvolvimento neuronal, provocando severos declínios cognitivos e intelectuais (Thompson and Darwish, 2019).

2.3 Determinação analítica de elementos inorgânicos em alimentos

A determinação do teor de elementos inorgânicos é um requisito necessário à avaliação da composição nutricional e à verificação da ocorrência de contaminantes em alimentos, garantindo a segurança e a sua qualidade para o consumo humano.

2.3.1 Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo

A ICP-MS é a técnica analítica preferencial na determinação do teor de elementos inorgânicos em alimentos e, quando conjugada com um procedimento de preparação de amostras adequado, é capaz de fornecer concentrações na ordem das $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Wilschefski and Baxter, 2019).

Nos últimos anos, estudos sobre a influência dos solos no perfil nutricional das espécies vegetais e sobre os mecanismos envolvidos nas cadeias de produção alimentar, aliados ao forte desenvolvimento tecnológico, têm recorrido à aplicação da ICP-MS na autenticação (avaliar diferenças em alimentos de igual matriz, mas de variedade, local e produção diferente) e rastreabilidade (estabelecer associações entre a composição do alimento e o local de origem) de géneros alimentícios (Aceto, 2016).

Na perspetiva analítica, a maior vantagem inerente à ICP-MS consiste na capacidade de efetuar análises multielementares, precisas e exatas, num curto período de tempo, ou seja, quantificar correta e simultaneamente vários elementos numa só análise (Aceto, 2016; Wilschefski and Baxter, 2019). Ainda, esta técnica possui uma sensibilidade e seletividade notáveis, garantindo elevada fiabilidade na resposta produzida (Aceto, 2016). No entanto, a ICP-MS apresenta algumas desvantagens como os elevados custos de aquisição, manutenção e operacionais, a necessidade de profissionais qualificados para o seu manuseamento e o controlo constante de possíveis interferências (PerkinElmer, 2004; Wilschefski and Baxter, 2019). Os elementos possíveis de quantificar pela ICP-MS encontram-se evidenciados na figura 2.2.

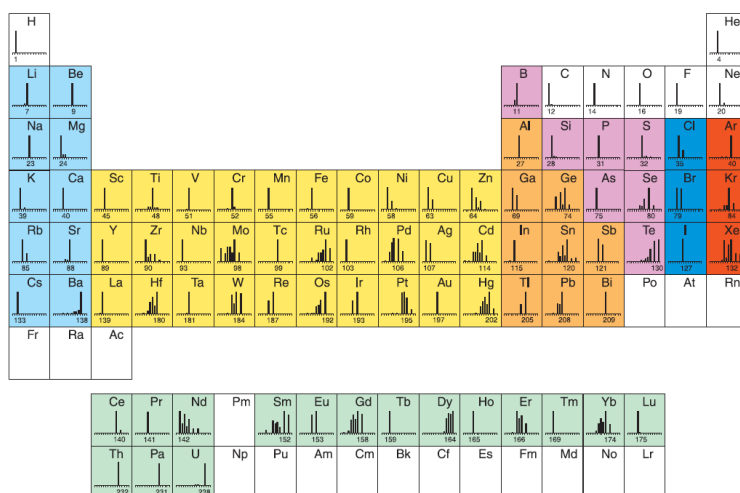


Figura 2.2 - Elementos analisados pela ICP-MS (a cores). Adaptado de (PerkinElmer, 2004).

2.3.1.1 Princípio do método

No equipamento da ICP-MS, esquematizado na figura 2.3, existem seis componentes fundamentais a destacar: o sistema de introdução de amostra, o plasma de argônio, o sistema de interface, as lentes iônicas, o analisador de massa e o detector (Wilschefski and Baxter, 2019).

Como princípio de funcionamento, a ICP-MS permite a quebra de ligações existentes entre os elementos químicos, através de um plasma de argônio (Ar) de elevada energia, propiciando o transporte das suas formas iônicas para um analisador de massa, a fim de serem seletivamente detetadas e quantificadas (PerkinElmer, 2004).

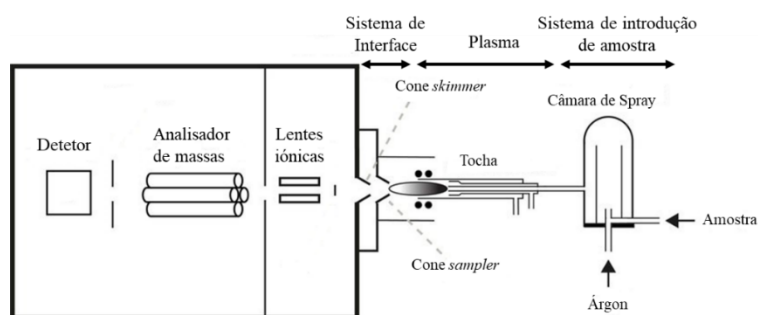


Figura 2.3 - Representação esquemática das principais componentes do equipamento de ICP-MS.

Nesta técnica, a amostra líquida é direcionada para o plasma de Ar através de uma bomba peristáltica e de um sistema de introdução (figura 2.4), constituído por um nebulizador concêntrico que direciona o gás Ar paralelamente à amostra, e uma câmara de spray (Thomas, 2004; Wilschefski and Baxter, 2019).

Inicialmente, a bomba peristáltica introduz a solução de amostra no nebulizador concêntrico, que a converte num aerossol. Este é encaminhado para a câmara de spray, que separa as gotículas de amostra consoante a sua dimensão (Wilschefski and Baxter, 2019). Deste modo, as gotículas de maior dimensão ficam retidas ao colidirem com as paredes da câmara de spray, enquanto as de menor dimensão são encaminhadas para o plasma (Wilschefski and Baxter, 2019). Esta separação é extremamente importante pois o plasma não possui a capacidade de dissociar as gotículas de grandes

dimensões ($> 10 \mu\text{m}$ de diâmetro) das de pequenas dimensões, sendo igualmente uma forma de minimizar a instabilidade do plasma (Wilschefski and Baxter, 2019).

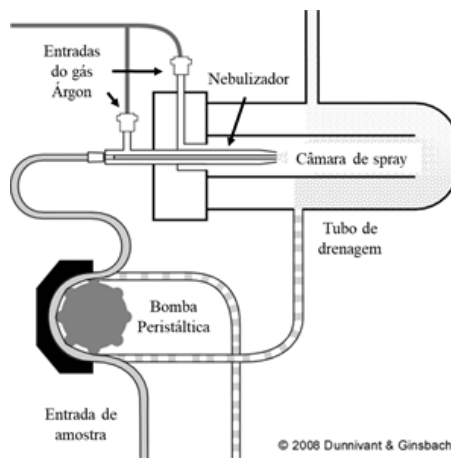


Figura 2.4 - Representação esquemática do sistema de introdução de amostra.

A tocha (figura 2.5), onde se forma o plasma, é constituída por três tubos concêntricos de quartzo, entre os quais flui continuamente o gás Ar (Wilschefski and Baxter, 2019). Na extremidade da tocha, existe uma bobina de indução de cobre conectada a um gerador de radiofrequência (Wilschefski and Baxter, 2019). Este fornece energia à bobina, gerando uma corrente alternada de alta frequência, responsável pela criação de um campo eletromagnético na tocha (Wilschefski and Baxter, 2019). Através do fluxo de Ar e do campo eletromagnético na tocha, são induzidas descargas energéticas que ionizam uma porção dos átomos de Ar, gerando íons e elétrons (Wilschefski and Baxter, 2019). Estes, influenciados pelo campo eletromagnético, colidem com outros átomos de Ar, o que leva à ocorrência de sucessivas ionizações e subsequente libertação de mais íons e elétrons (Wilschefski and Baxter, 2019). A propagação e o movimento destas partículas geram quantidades elevadas de calor (Wilschefski and Baxter, 2019).

Após a nebulização da amostra, o aerossol é encaminhado da câmara de spray para o plasma, por meio do fluxo de Ar (Wilschefski and Baxter, 2019). Sob as elevadas temperaturas do plasma (6 000 K e 10 000 K), o aerossol de amostra sofre instantaneamente os processos de dessolvatação, vaporização, atomização e ionização, sendo o grau de ionização dependente das temperaturas do plasma e do potencial de ionização de cada elemento químico (Aceto, 2016; García Alonso et al., 2015).

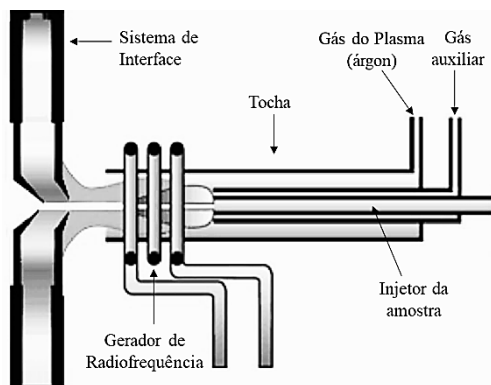


Figura 2.5 - Representação esquemática da tocha, do gerador de radiofrequência e do sistema de interface. Adaptado de (Thomas, 2004).

No interior do plasma, a ionização decorre sob pressão atmosférica, contudo, o analisador de massa apenas atua sob condições de alto vácuo e a baixas temperaturas. Como tal, a incorporação do sistema de interface, composto por 2 cones de níquel (o *sample* e o *skimmer*), permite a coexistência do plasma sob pressão atmosférica e as restantes componentes, sob alto vácuo, facilitando a passagem de iões até ao analisador de massa (Wilschefski and Baxter, 2019).

O sistema de lentes iónicas, posicionado entre o cone *skimmer* e o analisador de massa, consiste em duas ou mais lentes controladas electrostáticamente. Esta componente também encaminha os iões presentes no plasma, que se encontra a pressão atmosférica, para o analisador de massa, sob condições de alto vácuo. Além disso, o sistema de lentes iónicas impede a entrada de outras partículas diferentes do analito, no analisador de massa e no detetor. O fluxo de iões extraído do sistema de interface contém espécies neutras e fotões que não devem entrar no analisador de massa ou no detetor, pois provocam instabilidade no sinal dos iões analito, afetando a performance do equipamento (Thomas, 2004).

O sistema de interface e o sistema de lentes iónicas estão representados esquematicamente na figura 2.6.

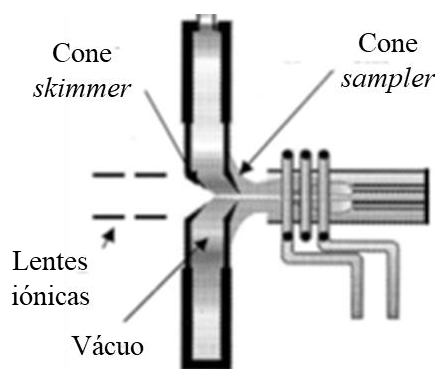


Figura 2.6 - Representação esquemática do sistema de interface e respetivos cones *sampler* e *skimmer*, e lentes iónicas. Adaptado de (Thomas, 2004).

Dos vários analisadores de massa existentes no mercado (quadrupolo, *time-of-flight*, e setor magnético), o quadrupolo é frequentemente utilizado em ICP-MS, devido ao bom desempenho e baixo custo associado (PerkinElmer, 2004). O analisador de massa em quadrupolo atua como um filtro de massas iónicas, ou seja, separa iões consoante a razão massa/carga (m/z), definida como o quociente entre a massa do ião analito e a sua carga, preestabelecida pelo operador no sistema de controlo do

equipamento (PerkinElmer, 2004; Wilschefski and Baxter, 2019). O quadruplo, esquematizado na figura 2.7, é composto por quatro hastes metálicas paralelas, posicionadas numa matriz quadrada (Wilschefski and Baxter, 2019). Estas filtram os iões, através da aplicação de campos de corrente elétrica no centro do quadrupolo (Wilschefski and Baxter, 2019). Consoante a especificidade dos campos elétricos, apenas os iões com determinada razão m/z conseguem atravessar o centro do quadrupolo (Wilschefski and Baxter, 2019). Aqueles que não satisfaçam a razão m/z preestabelecida, adquirem trajetórias instáveis, colidem com as hastes do quadrupolo e não são direcionados para o detetor (Wilschefski and Baxter, 2019).

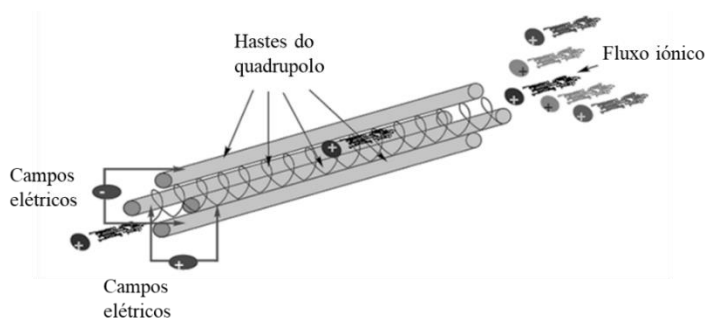


Figura 2.7 – Representação esquemática do analisador de massas em quadrupolo. Adaptado de (Thomas, 2004).

No detetor de multiplicação de eletrões, os iões selecionados no analisador de massa colidem com os vários dínodos constituintes e, mediante sucessivos embates, originam uma cascata de eletrões que se traduz num sinal elétrico (PerkinElmer, 2004). Desta forma, a partir do embate de um único ião, o detetor consegue produzir um sinal quantificável. A intensidade deste sinal, cujo teor elementar é desconhecido, é comparada com a de sinais emitidos por padrões de calibração (PerkinElmer, 2004).

2.3.1.2 Interferências

As interferências em ICP-MS podem ser consideradas espectroscópicas e não espectroscópicas. As primeiras ocorrem quando uma espécie iónica possui o mesmo valor de m/z que o ião analito, já as segundas referem-se aos efeitos da matriz das amostras e da carga espacial no equipamento (Wilschefski and Baxter, 2019). Ambas as interferências têm o potencial de causar erros analíticos, contudo, estes têm sido minimizados pelo desenvolvimento tecnológico do equipamento e pela otimização da metodologia analítica (Thomas, 2004).

2.3.1.2.1 Interferências espectroscópicas

As interferências espectroscópicas podem resultar da presença de iões poliatómicos, elementos isobáricos, iões de dupla carga e de óxidos e hidróxidos (Wilschefski and Baxter, 2019).

As interferências por iões poliatómicos, as mais problemáticas, resultam da combinação de dois ou mais iões provenientes do plasma, da amostra, dos reagentes ou da entrada de gases atmosféricos (Thomas, 2004).

As interferências por óxidos e hidróxidos derivam da capacidade de certos elementos se associarem ao O^- ou OH^- (derivado da água ou do ar), formando iões óxido e hidróxido, cujo pico do sinal obtido se sobrepõe ao pico dos iões analito (Thomas, 2004).

Já as interferências causadas por iões com dupla carga surgem na presença de elementos com uma segunda energia de ionização baixa, e como tal, com facilidade em perderem um segundo eletrão.

Nestas situações pode ocorrer uma perda de sinal, nos casos em que o analito de interesse forma um ião duplamente carregado, ou uma interferência espectral devido à formação de iões com uma razão m/z coincidente com a massa dos elementos químicos de interesse.

Por fim, as interferências isobáricas resultam da produção, a partir de isótopos de elementos diferentes do analito, de iões com razão m/z análoga à do analito (Thomas, 2004; Wilschefski and Baxter, 2019). Algumas formas de compensar este tipo de interferências baseiam-se em equações de correção, sistemas de arrefecimento do plasma e, a mais comum, na utilização de células de colisão/reação, cuja remoção pode ocorrer através da colisão entre as espécies moleculares e um gás inerte (geralmente hélio (He)), ou de reações entre estas e um gás reativo (CH_4 ou NH_3) (Thomas, 2004).

2.3.1.2 Interferências não espectroscópicas

As interferências não espectroscópicas resultam dos efeitos associados à matriz das amostras e à carga espacial (Wilschefski and Baxter, 2019).

Os primeiros, provocam uma supressão do sinal do analito pela presença de componentes na matriz que interferem no processo de nebulização ou na separação das gotículas na câmara de spray. No caso das matrizes orgânicas, estas interferências derivam da diferença de viscosidade das componentes da matriz (Thomas, 2004). A forma mais comum de atenuar estes efeitos reside na utilização de uma solução de padrão interno, abordada adiante no controlo de qualidade interno. Os efeitos de carga espacial ocorrem entre o cone *skimmer* e as lentes iónicas, verificando-se um desvio na trajetória dos iões e conseqüente diminuição deste até ao analisador de massa (Thomas, 2004). Estes efeitos afetam particularmente a sensibilidade e a especificidade do equipamento. Para os minimizar, são aplicadas tensões nas lentes iónicas, corrigindo a trajetória dos iões analito para o analisador de massa (Thomas, 2004).

2.3.2 Controlo de Qualidade Interno

O Controlo de Qualidade Interno consiste num conjunto de procedimentos independentes de uma fonte de intervenção externa, executados no sentido de monitorizar e avaliar continuamente o método analítico, para garantir a produção de resultados fiáveis (Barwick et al., 2014). Segundo definido em (RELACRE, 1996), o controlo de qualidade interno “visa controlar a precisão dos resultados obtidos pelos laboratórios”.

Estes procedimentos são suportados por diversas ferramentas metrológicas, nomeadamente: replicados das amostras, soluções branco (branco instrumental e branco de digestão), soluções fortificadas (ou soluções *spike*), materiais de referência, padrões internos e soluções de controlo da qualidade (QC) (Barwick et al., 2014).

2.3.2.1 Soluções branco

As soluções branco são constituídas pelos reagentes utilizados no procedimento analítico com exceção da amostra. Recorrendo a vários tipos de soluções branco, como o branco instrumental e o branco de digestão, é possível avaliar a contribuição do equipamento ou de possíveis contaminações externas, para além da contribuição do próprio analito, no resultado final (Barwick et al., 2014)

O branco instrumental permite avaliar a presença de contaminações nos reagentes durante o procedimento analítico (Barwick et al., 2014). Por outro lado, as soluções branco de digestão,

preparadas simultaneamente com as soluções de amostra, permitem monitorizar possíveis contaminações derivadas do procedimento de preparação das amostras (Barwick et al., 2014).

2.3.2.2 Análise de replicados

A análise de soluções de amostra em replicado tem como finalidade detetar a presença de erros acidentais e controlar a repetibilidade dos resultados obtidos (RELACRE, 1996). A literatura recomenda a preparação de replicados em análises que requerem várias etapas com múltiplas fontes de erro, e em amostras cuja composição constitui um obstáculo ao procedimento de homogeneização (RELACRE, 1996). Na deteção de erros acidentais, é possível proceder à eliminação das réplicas que apresentem valores discrepantes (*outliers*) das restantes.

A criação de replicados das amostras não garante uma maior exatidão no resultado final, pois na presença de erros sistemáticos, tais como erros associados à calibração do equipamento analítico, às condições de medição, às leituras sistematicamente incorretas ou à utilização de um método analítico não adequado ao estudo, todos os replicados são afetados, dificultando a deteção e minimização destes erros (RELACRE, 1996).

2.3.2.3 Soluções spike

As soluções fortificadas ou *spike* são soluções de amostra às quais foram adicionadas, deliberadamente, concentrações conhecidas dos analitos de interesse (Matos, 2016).

A avaliação das soluções *spike* é feita com base na sua percentagem de recuperação, a qual compara o resultado obtido nestas soluções com o resultado obtido nas amostras equivalentes, mas sem *spike*. Nos casos em que o valor da percentagem de recuperação não seja concordante com os critérios de aceitação internos, pressupõe-se a ocorrência de perdas de analito ou de contaminações durante o procedimento analítico.

2.3.2.4 Soluções de Controlo de Qualidade

As soluções de controlo da qualidade (QCs) são preparadas através de padrões de marcas ou lotes diferentes dos padrões utilizados na curva de calibração do equipamento, sendo lidas, intercaladamente, com um conjunto de soluções de amostra, permitindo verificar a ocorrência de variações no procedimento analítico (Barwick et al., 2014).

As soluções de QCs, que também se encontram sujeitas a erros associados ao desempenho do equipamento, devem ser suficientemente estáveis e homogéneas, de modo a garantir o mesmo resultado nas suas leituras, durante um período de tempo (Barwick et al., 2014).

A verificação da conformidade das soluções de QCs com os critérios de aceitação internos, deve ser feita ao longo do procedimento analítico, de forma a corrigir atempadamente possíveis erros e a minimizar desperdícios de amostra, reagentes e tempo (Barwick et al., 2014). A discrepância nos resultados obtidos nas soluções de QCs não permite a validação dos resultados das soluções de amostra.

2.3.2.5 Padrão interno

O padrão interno destina-se a minimizar o efeito de matriz e a controlar variações no equipamento decorrentes de fatores externos como a introdução da amostra, temperatura e humidade (RELACRE, 1996).

Os elementos utilizados como padrão interno não devem estar presentes nas amostras em estudo ou a sua concentração deve ser vestigial de modo a não causar interferências com os resultados obtidos (Matos, 2016). Além disso, também devem apresentar propriedades físico-químicas semelhantes às dos analitos em estudo (Matos, 2016).

Capítulo III

Materiais e Amostras em Estudo

3.1 Caracterização das Amostras em Estudo

No âmbito do projeto CONFFIAR, entre 2017 e 2019, foram realizadas seis campanhas de colheita de alimentos em 16 produtores distribuídos por três municípios da região Centro (Pedrógão Grande, Castanheira de Pêra e Figueiró dos Vinhos). Para garantir a representatividade das amostras analisadas foram colhidos, por produtor, 3 alimentos que, após homogeneização, constituíram uma *pool* (Gueifão et al., 2020). Assim, uma *pool* de amostra representa uma mistura homogênea de 3 alimentos iguais, provenientes do mesmo produtor. De modo a não suscitar dúvidas, na presente dissertação considera-se “*pool* de amostra” como “amostra”.

Os alimentos colhidos no projeto CONFFIAR pertencem aos seguintes géneros alimentícios: raízes e tubérculos amiláceos (batatas), hortícolas (pimento e chervia), hortícolas de folha (couves), leguminosas (favas), bolbos vegetais (cebolas), ervas aromáticas ou flores frescas (alecrim, folhas de laranjeira, folhas de limoeiro), ovos em natureza (ovos) e fruta fresca (maçã, pera, kiwi, laranja, ameixa, limão, morango, tangerina e dióspiro).

Este trabalho teve como foco principal a análise quantitativa de 68 amostras colhidas em Janeiro e em Maio de 2019. Nestas amostras estão contidas batatas, cebolas, couves, ovos, alecrim, folhas de loureiro, folhas de laranjeira, pimentos e favas. Contudo, a análise estatística dos resultados obtidos incidiu somente nos alimentos cujo número de amostras era superior a 1 ($n > 1$) (batatas, cebolas, couves e ovos).

A preparação das amostras consistiu na cozedura prévia das batatas e ovos, enquanto as couves, cebolas, folhas de loureiro e laranjeira, pimentos e favas não sofreram qualquer tratamento culinário. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas, com a determinação do teor de humidade, e trituradas, de forma a garantir uma maior homogeneidade das mesmas. Como método de armazenamento, as amostras foram embaladas em vácuo. Estes processos de preparação das amostras não foram realizados na componente prática do presente estudo.

3.2 Materiais, equipamentos e soluções

3.2.1 Equipamentos

- ✓ Espectrómetro de massa com plasma indutivamente acoplado (*ICP-MS, Thermo X Série II, UK*);
- ✓ Amostrador automático (*Autosampler*);
- ✓ Sistema em linha de adição de padrão interno;
- ✓ Bloco de aquecimento em grafite (*DigiPREP MS SCP SCIENCE*);

- ✓ Sistema de purificação de água (*MILLIPORE Q-POD® ELEMENT*);
- ✓ Balança analítica, com resolução de 0,0001 g;
- ✓ Câmara de fluxo laminar;
- ✓ Camara frigorífica (5 +/- 3 °C).

3.2.2 Material

Todo o material necessário à componente prática foi sujeito a um processo prévio de descontaminação com uma solução de HNO₃ a 5 % (v/v).

- ✓ Micropipetas calibradas, de volume fixo e volume variável e respetivas pontas;
- ✓ Tubos *DigiPREP* – 50 ml;
- ✓ Tubos *Falcon* – 15 e 50 ml;
- ✓ Frascos de PFA de vários volumes;
- ✓ Balões volumétricos em PFA de vários volumes;
- ✓ Seringas de 10 ml;
- ✓ Filtros de seringa, diâmetro 0,45 µm.

3.2.3 Reagentes e padrões

- ✓ Soluções padrão monoelementar de Co (*MERCK*);
- ✓ Solução padrão multielementar IX (As, Be, Cd, Cr (VI), Hg, Ni, Pb, Se, Ti) (*MERCK*);
- ✓ Solução de Tuning (TUNE A) do ICP-MS (Ba, Be, Bi, Ce, Co, In, Li, Pb, U, TI) (*MERCK*);
- ✓ Solução monoelementar de padrões internos (Ge, Y, In) (*Inorganic Ventures, MERCK*);
- ✓ Ácido nítrico (HNO₃) ultrapuro a 65 % (*MERCK*);
- ✓ Peróxido de hidrogénio (H₂O₂) de concentração superior a 30 % (*MERCK*);
- ✓ Água ultrapura (H₂O) (*Q-POD Millipore, Interface, Portugal*).

Capítulo IV

Procedimento Experimental

A componente experimental do presente estudo foi desenvolvida no Laboratório de Materiais de Referência do DAN, cujos ensaios se encontram acreditados conforme a norma ISO/IEC 17025:2017, referente aos requisitos gerais laboratoriais para acreditação e controlo de qualidade dos ensaios.

4.1 Digestão ácida

Previamente à quantificação elementar por ICP-MS, as 68 amostras liofilizadas foram sujeitas a um processo de digestão em meio ácido, a fim de as converter ao estado líquido.

Cada processo de digestão foi constituído pelas amostras em triplicado, soluções *spike* e soluções branco de digestão, tendo sido aplicado o seguinte procedimento:

1. Num tubo *DigiPREP* de 50 ml, pesou-se cerca de 0,6 g de amostra. Esta etapa foi repetida três vezes, a fim de se prepararem os triplicados das amostras;
2. Foram escolhidas, aleatoriamente, quatro amostras, às quais se acrescentou uma quarta réplica correspondente à solução *spike*.
3. Em cada tubo *DigiPREP* contendo a porção de amostra, adicionou-se 7 ml de HNO_3 , deixando-o sob repouso a pré-digerir durante a noite.
4. Após este período, acrescentou-se 1 ml de H_2O_2 , e nos tubos destinados à solução *spike*, adicionou-se 1 ml do padrão multielementar contendo Cr, Co, As, Cd e Pb.
5. Procedeu-se à colocação dos tubos *DigiPREP* no bloco de aquecimento em grafite, programado para alcançar 85 °C em 4 h.
6. Após este período, para cada tubo, perfez-se 25 ml com água ultrapura. De seguida procedeu-se à filtração de todas as soluções de amostra para tubos *Falcon*, pois apresentavam partículas visíveis em suspensão.
7. Por fim, as amostras digeridas foram armazenadas numa câmara frigorífica.

4.2 Preparação de soluções padrão

4.2.1 Soluções padrão da curva de calibração

Para o traçado da curva de calibração (CC), foram preparadas seis soluções padrão multielementar e uma solução branco (contendo somente HNO_3 a 2 %), a que se fizeram corresponder os pontos da CC.

O procedimento de preparação das seis soluções padrão multielementar foi o seguinte:

- ✓ Prepararam-se duas soluções intermédias multielementar: solução intermédia 1 e solução intermédia 2.

- A solução intermédia 1, de concentração final 100 000 µg/L, teve por base a solução padrão monoelementar de Co com 1000 000 µg/L.
 - A solução intermédia 2 foi preparada com uma concentração final de 500 µg/L, obtida a partir da solução multielementar contendo As, Cd, Cr e Pb e da solução intermédia 1.
- ✓ A partir da solução intermédia 2, extraiu-se o volume referente ao ponto da CC (tabela 4.1), perfazendo o restante com HNO₃ a 2%.

Tabela 4.1 – Preparação das soluções padrão para o traçado da curva de calibração (CC).

Ponto da CC (µg/L)	Volume a pipetar da solução intermédia 2 (µl)	Volume a pipetar de HNO ₃ a 2% (ml)	Volume final (ml)	
P0	0	0	50,000	
P1	0,25	25	49,975	
P2	0,5	50	49,950	
P3	1	100	49,900	50
P4	2,5	250	49,750	
P5	5	500	49,500	
P6	10	1 000	49,000	

4.2.2 Soluções padrão de controlo da qualidade

O método de preparação das soluções de QC foi análogo ao das soluções padrão de calibração, contudo fez-se diferir as marcas e ou lotes da solução multielementar utilizada.

No total, prepararam-se três soluções de QC's com concentrações de 0,25; 0,5 e 2,5 µg/L.

4.2.3 Padrão interno

Neste estudo, o padrão interno consistiu numa solução contendo os elementos Germânio (Ge) (100 µg/L), Ítrio (Y) e Índio (In) (15 µg/L para ambos). Esta solução foi adicionada no ICP-MS, em sistema em linha, de forma a acompanhar todo o processo analítico.

4.3 Análise por ICP-MS

Após a preparação das amostras em triplicado, soluções *spike*, soluções padrão de calibração, soluções de QCs e padrão interno, procedeu-se à quantificação por ICP-MS do teor de Cr, Co, As, Cd e Pb nas amostras em estudo.

4.3.1 Performance report

Previamente à leitura de qualquer solução, o Laboratório de Materiais de Referência avalia diariamente a sensibilidade e estabilidade do equipamento através da realização do teste de performance (*performance report*). Os parâmetros avaliados neste teste incluem a largura e o erro do pico do sinal emitido, a sensibilidade, a estabilidade e a presença de duplas cargas e de óxidos.

O *performance report* é realizado com recurso à solução TUNE A (10 µg/L). Posteriormente à sua realização, o *software* do equipamento emite um relatório que confirma o cumprimento dos parâmetros a avaliar conforme com os critérios de aceitação internos.

4.3.2 Curva de calibração

O traçado das curvas de calibração foi efetuado pela leitura e análise das soluções padrão da CC, anteriormente preparadas. Como parâmetros de verificação da fiabilidade das curvas de calibração, foram avaliados o coeficiente de correlação e a gama de trabalho.

Segundo os critérios de aceitação do Laboratório de Materiais de Referência do DAN, as curvas de calibração são aceites quando reportam um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,9995 e quando são concordantes com a gama de trabalho definida para cada elemento químico.

Na tabela 4.2 encontram-se mencionadas as gamas de trabalho dos elementos químicos de interesse ao presente estudo, definidas pelo Laboratório de Materiais de Referência do DAN.

Tabela 4.2 - Gama de trabalho (µg/L) do Cr, Co, As, Cd e Pb.

Gama de trabalho (µg/L)	Elemento químico
0,25 – 2,5	Co, As, Cd
0,50 – 5	Pb
1 - 5	Cr

4.3.3 Leitura de soluções

Posteriormente à calibração do equipamento conforme os critérios de aceitação internos, procedeu-se à leitura das amostras em triplicado, soluções *spike*, soluções de QCs e das soluções branco.

Tendo em conta que as leituras das soluções de amostra são somente válidas se se encontrarem dentro da gama de trabalho de cada elemento químico e que as concentrações destes diferem consoante o tipo de amostra, foi necessário efetuar várias diluições das soluções de amostra.

A leitura das soluções de amostra teve início nas soluções branco de digestão. O valor obtido da leitura da solução branco de digestão foi comparado com o limite de quantificação (LQ) teórico. Nas situações em que o valor obtido na solução de branco de digestão, para cada elemento químico, se encontrava entre o LQ teórico e o 1º ponto da CC, procedeu-se ao desconto do valor da leitura nos resultados das amostras. Nos casos em que o valor obtido foi superior ao primeiro ponto da CC, procedeu-se à repetição de todo o processo de digestão das amostras, pois esta situação indicia a ocorrência de contaminações das amostras.

Após esta verificação, procedeu-se à leitura das amostras em triplicado e das soluções *spike*. Entre cada conjunto destas soluções, foram lidas as soluções de QC's e o branco instrumental.

4.3.3.1 Critérios de aceitação internos

Os resultados obtidos nas amostras deste estudo foram validados em conformidade com os critérios de aceitação definidos pelo Laboratório de Materiais de Referência.

De acordo com esses critérios, os resultados são considerados válidos quando:

- ✓ Os triplicados das amostras reportam leituras com uma percentagem de coeficiente de variação (CV%) inferior a 10 %.
- ✓ As soluções *spike* e o padrão interno apresentam uma percentagem de recuperação de 80 % a 120 %.
- ✓ Nas soluções de QC's:
 - o QC correspondente ao 1ª ponto da CC não excede os 20% de margem de erro do valor médio lido.
 - os restantes QC's, não excedem os 10 % de margem de erro do valor médio lido.
- ✓ As leituras obtidas da solução branco instrumental não ultrapassam o valor mais baixo da CC de cada elemento químico.

4.4 Análise dos resultados obtidos

Os resultados obtidos na quantificação elementar das amostras em estudo por ICP-MS foram exportados do programa *Thermo Plasmalab* e analisados com auxílio das ferramentas Microsoft Excel e R (OpenSource e RStudio).

Tendo em conta que as amostras em estudo se encontravam liofilizadas, após a extração dos resultados, procedeu-se à conversão do teor em $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso seco, para $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco, com base no teor de humidade registado para cada amostra.

Seguidamente, procedeu-se ao cálculo da média e do desvio padrão (SD) entre os triplicados das amostras, de forma a obter o valor médio do teor do elemento químico de cada amostra. Dito de outro modo, o teor considerado para cada amostra representa a média dos teores obtidos em cada réplica dessa amostra. Posteriormente a estes cálculos, procedeu-se à comparação com valores encontrados na literatura e, quando aplicável, com a legislação em vigor estabelecida pela EFSA. Também foram criadas várias representações gráficas que permitiram uma melhor compreensão e subsequente análise destes resultados. Dada a existência de amostras de couve colhidas em 2015 (amostras controlo) e analisadas por (Ventura et al., 2021), procedeu-se à comparação dos teores

obtidos para as amostras colhidas em 2015 com os teores obtidos para as amostras de couve analisadas neste estudo.

Em cada tipo de amostra foi realizada a análise exploratória dos teores dos elementos químicos, através do cálculo da média, quantis, mediana, valor máximo e valor mínimo, e criadas representações gráficas consideradas adequadas. Esta análise foi crucial para a avaliação da exposição por via alimentar.

A avaliação da exposição por via alimentar é definida pela OMS como uma “avaliação qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos e físicos através do consumo de alimentos ou de outras fontes de exposição relevantes”. Desta forma, para avaliar o pior cenário de exposição alimentar aos elementos químicos analisados, na população portuguesa da região Centro, procedeu-se à estimativa da ingestão diária de cada elemento químico, com base no teor médio máximo obtido por alimento, e no consumo médio destes alimentos na população portuguesa adulta (18 – 64 anos) nesta região. Contudo, o risco de exposição por via alimentar resulta da ingestão combinada de vários alimentos, não sendo exclusivo a um único alimento. Por este motivo, também foi estimada a ingestão total diária dos elementos químicos analisados, com base nas amostras de alimentos da 5ª colheita. Esta avaliação incidiu apenas na 5ª colheita, pois esta é comum a todas as amostras de alimentos, o que permite obter a exposição por via alimentar num único momento (Janeiro de 2019).

De acordo com os dados publicados pelo Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF), que decorreu entre 2015 e 2016, a população portuguesa adulta da região Centro, apresenta um consumo habitual médio de 98,7 g/dia de batatas e outros tubérculos, 156 g/dia de vegetais, dos quais fazem parte cebolas e couves, e 16,3 g/dia de ovos (Lopes et al., 2018).

Tal como descrito na literatura, se o peso corporal do indivíduo não se encontrar disponível para a estimação da ingestão diária, é considerado 70 kg como o peso corporal padrão de um adulto (EFSA, 2012). Importa realçar que, quando o peso corporal real é superior ao peso corporal médio estipulado, a estimativa da ingestão diária do contaminante, por kg de peso corporal, é subestimada.

Como terceira etapa, procedeu-se à comparação destes resultados com os teores obtidos em (Gueifão et al., 2020) nas amostras de batatas e couves colhidas em Agosto (1ª colheita) e Dezembro (2ª colheita) de 2017. Esta análise comparativa teve como objetivo avaliar a evolução do teor dos elementos químicos nas batatas e couves colhidas, entre 2017 e 2019, nas diversas zonas de áreas arduas em junho de 2017 na região Centro.

Refira-se o facto das colheitas de 2017 serem designadas por 1ª e 2ª colheitas e as colheitas de 2019 por 5ª e 6ª colheitas. Esta designação deve-se à existência de colheitas realizadas em 2018, por sua vez, designadas por 3ª e 4ª colheitas, cujos dados não foram analisados no presente estudo.

Com recurso ao *R Studio*, efetuaram-se testes estatísticos que permitiram averiguar a existência de diferenças significativas nos teores de cada elemento químico para as colheitas de batatas e couves. Importa realçar a existência de uma dependência temporal entre as amostras, pois estas foram colhidas nos mesmos produtores, em momentos diferentes (2017 e 2019). Deste modo, as amostras são emparelhadas.

Os testes estatísticos adequados a este fim foram o teste paramétrico *One-way Repeated Measures ANOVA (RM ANOVA)* e o teste equivalente não paramétrico de *Friedman*.

Os pressupostos desta variante da *ANOVA* incluem a independência das observações, a normalidade e a esfericidade. Este último, pressupõe a igualdade das variâncias das diferenças entre cada par de colheitas (Kim, 2015). O *R Studio* inclui um *package (rstatix)* que permite

automaticamente averiguar a esfericidade dos dados, mediante o teste de *Mauchly*, e caso esta não se verifique, procede também à respetiva correção pelo método de *Greenhouse-Geisser*.

Contudo, para que seja possível aplicar o teste *RM ANOVA*, os dados têm que seguir a distribuição normal. Assim, previamente à aplicação do teste estatístico averiguou-se a normalidade dos dados através do teste de *Shapiro-Wilk*, e nos casos em que este pressuposto não foi cumprido, procedeu-se à transformação não linear por logaritmização dos dados.

Sob o cumprimento da normalidade, efetuou-se o teste de *RM ANOVA*. Na rejeição da hipótese nula (H_0), inerente ao conceito da igualdade das médias dos teores dos elementos químicos entre colheitas, procedeu-se à discriminação das diferenças significativas entre as combinações possíveis de colheitas, através do teste T emparelhado e com o método de correção de *Bonferroni*.

Sob o incumprimento da normalidade, aplicou-se o teste de *Friedman*. Na rejeição da H_0 , recorreu-se ao teste de *Wilcoxon-Nemenyi-McDonald-Thompson* (uma adaptação do teste *post-hoc* da *ANOVA*, *Tukey HSD*) com o método de correção de *Bonferroni* (Pereira et al., 2015), para discriminar diferenças significativas nas medianas dos teores dos elementos químicos entre colheitas.

Para todas as análises estatísticas efetuadas neste estudo, foi considerado o nível de significância padrão 0,05 ($\alpha = 0,05$) para a rejeição da H_0 .

Capítulo V

Resultados e Discussão

5.1 Apresentação e discussão dos resultados obtidos

5.1.1 Batatas

5.1.1.1 5ª Colheita

Os teores dos elementos químicos analisados nas 12 amostras de batata da 5ª colheita estão reportados no Anexo 1 e representados graficamente na figura 5.1. Nestas amostras, os LQs obtidos para cada elemento químico encontram-se no Anexo 2.

Da análise da figura 5.1, verifica-se que, para todos os produtores, o Cr apresenta os teores mais elevados, e o As os teores mais baixos, em relação aos restantes elementos químicos.

Salienta-se que os teores de Cr reportados nestas amostras são superiores ao valor encontrado na literatura (19 µg/kg) (EFSA, 2014a). Os teores de Co obtidos nos produtores E e G são superiores ao valor encontrado na literatura (9 µg/kg) (Noël et al., 2012). Os teores de As obtidos, em todos os produtores, são inferiores ao valor encontrado na literatura (14 µg/kg) (EFSA, 2009b). Os teores de Cd e Pb, para qualquer produtor, são inferiores à legislação em vigor (100 µg/kg para raízes e tubérculos) (Regulamento (EU) 2021/1317 da Comissão de 9 de Agosto de 2021, 2021; Regulamento (UE) 2021/1323 da comissão de 10 de agosto de 2021, 2021) e aos valores encontrados na literatura (21 µg/kg para Cd) (EFSA, 2009c) e (35 µg/kg para Pb) (EFSA, 2010b).

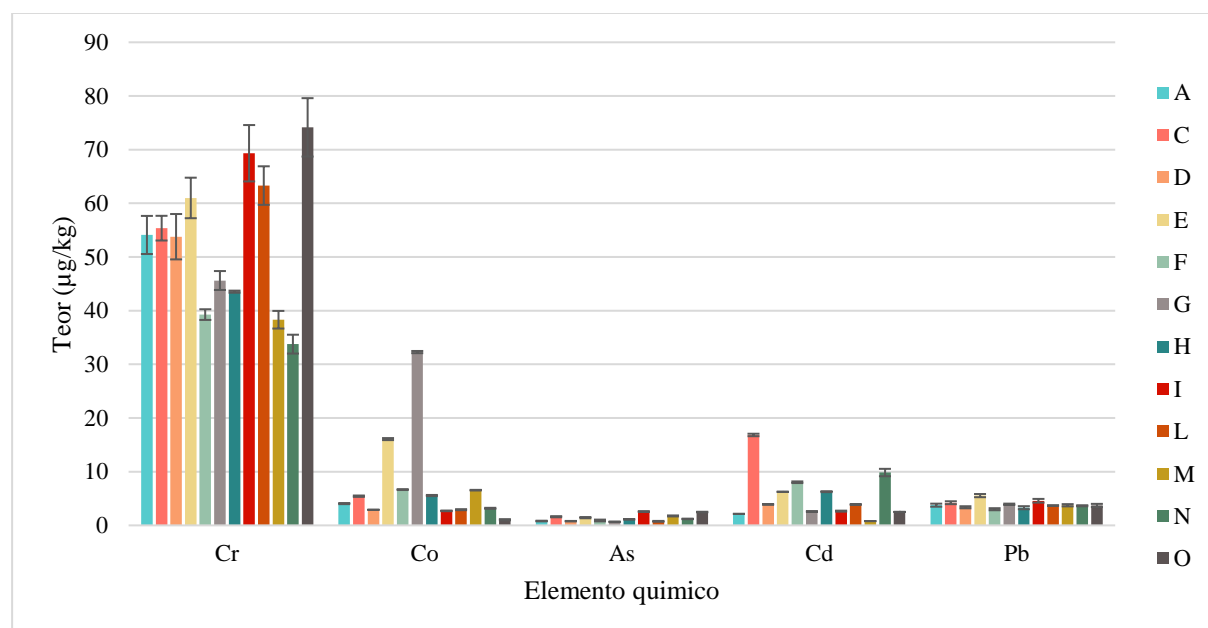


Figura 5.1 - Representação gráfica dos teores de Cr, Co, As, Cd e Pb (µg/kg de peso fresco) nas amostras de batata da 5ª colheita (n = 12).

A tabela 5.1 apresenta os resultados da análise exploratória efetuada nos teores dos elementos químicos obtidos nestas amostras. Comparando com os restantes elementos químicos, o Cr apresenta o teor médio mais elevado (53 µg/kg), enquanto o As reporta o teor médio mais baixo (1,3 µg/kg).

Tabela 5.1 – Análise exploratória dos resultados obtidos (µg/kg de peso fresco) nas amostras de batata da 5ª colheita (n = 12).

Batatas da 5ª colheita	Cr	Co	As	Cd	Pb
	µg/kg de peso fresco				
Média	53	7,5	1,3	5,5	3,9
Mínimo	34	< LQ (2)	< LQ (2)	< LQ (1)	3,0
1º Quantil	42	2,9	0,80	2,6	3,6
Mediana	54	4,8	1,2	3,9	3,7
3º Quantil	62	6,6	1,7	6,7	4,0
Máximo	74	32	2,6	17	5,5

De acordo com o IAN-AF, o consumo habitual médio de batatas e outros tubérculos, na população portuguesa adulta da região Centro, é de 98,7 g/dia (Lopes et al., 2018). Considerando o teor máximo obtido de cada elemento químico e o consumo médio diário de batatas e outros tubérculos, a ingestão diária estimada proveniente das batatas da 5ª colheita é 7,3 µg de Cr, 3,2 µg de Co, 0,25 µg de As, 1,7 µg de Cd e 0,54 µg de Pb.

A EFSA define 1 mg/kg de peso corporal como LOAEL para o Co (EFSA, 2009a), pelo que, num adulto de 70 kg, a dose mínima de Co que induz efeitos adversos detetáveis na saúde é de 70 mg (equivalente a 70000 µg). Sob este cálculo, conclui-se que a ingestão diária estimada de Co, proveniente destas batatas, é consideravelmente inferior ao LOAEL. Relativamente ao As, a EFSA define um intervalo de 0,3 a 8 µg/kg de peso corporal por dia, para as espécies inorgânicas (EFSA, 2021b), o que equivale, num adulto de 70 kg, à ingestão diária de 21 a 560 µg de As. Comparando com este intervalo, a ingestão diária estimada de As, proveniente destas batatas, é inferior ao limite mínimo de 21 µg/dia. Para o Cd, a EFSA estabelece uma DSA de 2,5 µg/kg de peso corporal (EFSA, 2009c). Desta forma, um adulto com 70 kg, pode estar exposto a 25 µg/dia de Cd, cujo valor é superior à ingestão diária estimada nestes alimentos. Por fim, a ingestão diária estimada de Pb, proveniente destes alimentos, é inferior ao PTWI de 25 µg/kg de peso corporal definido pela JECFA e aceite pela EFSA (EFSA, 2010b), equivalente a 250 µg/dia, para um adulto de 70 kg.

Dada esta avaliação, conclui-se que o contributo do consumo de batatas da 5ª colheita (Janeiro de 2019) para a exposição aos elementos químicos analisados, por si só, é muito reduzido e não deverá constituir um risco para a saúde pública na Região Centro.

5.1.2 Cebolas

5.1.2.1 5ª Colheita

A figura 5.2 representa graficamente os resultados obtidos dos teores dos elementos químicos analisados nas 5 amostras de cebola da 5ª colheita. Os resultados obtidos estão reportados no Anexo 3. O Anexo 4 apresenta os LQs calculados nestas amostras.

Da análise da figura 5.2, verifica-se que os teores de Cr, Co e As, em qualquer produtor, são inferiores aos valores encontrados na literatura (57 µg/kg (EFSA, 2014a), 6 µg/kg (Noël et al., 2012), 15 µg/kg (EFSA, 2009b), respetivamente). O produtor L apresenta um teor de Cd superior ao valor encontrado na literatura (7 µg/kg) (EFSA, 2009c). À exceção deste, os restantes produtores reportam teores de Cd e de Pb inferiores aos valores encontrados em literatura (7 µg/kg (EFSA, 2009c) e 39 µg/kg (EFSA, 2010b), respetivamente). Todos os teores de Cd e Pb obtidos são inferiores à legislação em vigor para bolbos (30 µg/kg de Cd) (Regulamento (UE) 2021/1323 da comissão de 10 de agosto de 2021, 2021) (100 µg/kg de Pb) (Regulamento (EU) 2021/1317 da Comissão de 9 de Agosto de 2021, 2021).

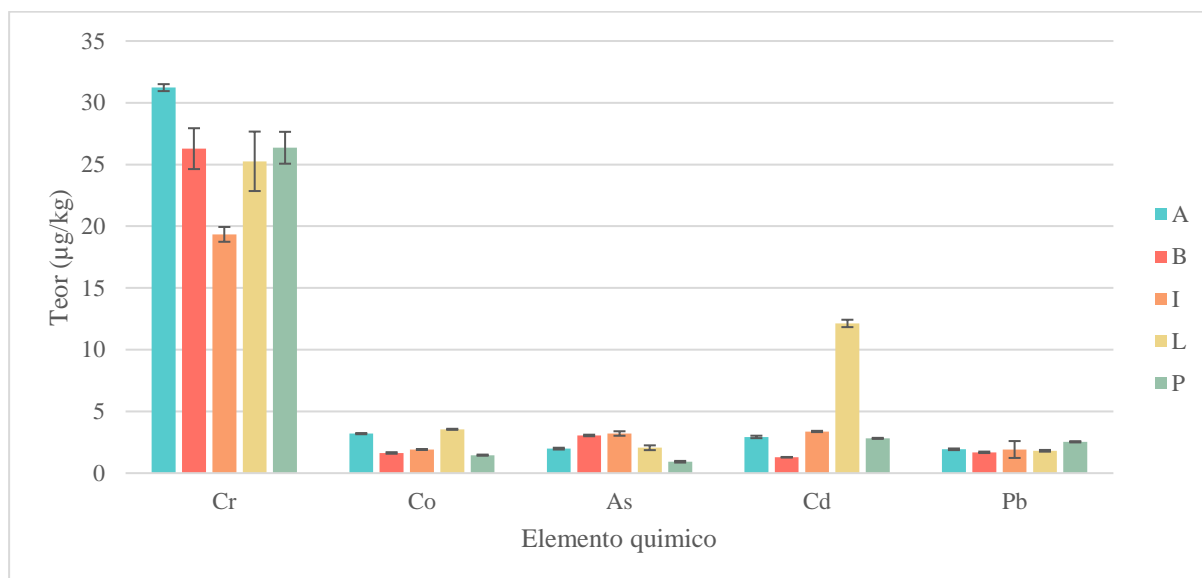


Figura 5.2 - Representação gráfica dos teores de Cr, Co, As, Cd e Pb (µg/kg de peso fresco) nas amostras de cebola da 5ª colheita (n = 5).

Na tabela 5.2 são apresentados os resultados da análise exploratória dos teores dos elementos químicos obtidos nas amostras de cebola da 5ª colheita. Comparativamente aos restantes elementos químicos, o Cr apresenta o teor médio mais elevado (26 µg/kg), enquanto os teores do Pb são inferiores ao LQ (3 µg/kg).

Tabela 5.2 – Análise exploratória dos resultados obtidos ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de cebolas da 5ª colheita (n = 5).

Cebolas da 5ª colheita	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
Média	26	2,4	2,2	4,5	< LQ (3)
Mínimo	19	1,5	0,92	1,3	< LQ (3)
1º Quantil	25	1,5	1,9	2,8	< LQ (3)
Mediana	26	1,9	2,1	2,9	< LQ (3)
3º Quantil	26	3,2	3,1	3,4	< LQ (3)
Máximo	31	3,6	3,2	12,1	< LQ (3)

O IAN-AF reporta que, na população portuguesa adulta da região Centro, o consumo habitual médio de vegetais, nos quais estão incluídas cebolas, é de 156 g/dia (Lopes et al., 2018).

Partindo dos teores máximos registados nos elementos químicos nas amostras de cebola da 5ª colheita, e do consumo habitual médio do grupo dos vegetais, a ingestão diária estimada por meio destes alimentos é 4,9 μg de Cr, 0,6 μg de Co, 0,49 μg de As e 1,89 μg de Cd. Para a ingestão diária de Pb, com base no consumo destas cebolas, considerou-se como teor máximo o valor correspondente ao LQ (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), resultando numa estimativa de 0,5 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de Pb.

De acordo com os parâmetros de avaliação do risco estabelecidos pela EFSA, considerando um adulto de 70 kg, a ingestão diária estimada de Co, proveniente do consumo de cebolas da 5ª colheita é inferior ao LOAEL (70000 μg) (EFSA, 2009a). De igual modo, a ingestão diária para o As, pelo consumo destes alimentos, é inferior ao intervalo de 21 a 560 $\mu\text{g}/\text{dia}$, estipulado para um adulto de 70 kg (EFSA, 2021b). Com base na DSA de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (EFSA, 2009c), a ingestão diária estimada para o Cd, decorrente destas cebolas, é inferior à dose diária admissível de 25 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Por fim, a ingestão diária de Pb estimada nestes alimentos é inferior ao PTWI de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (250 $\mu\text{g}/\text{dia}$, num adulto de 70kg) (EFSA, 2010b).

Em suma, esta avaliação demonstra que o consumo de cebolas da 5ª colheita (Janeiro de 2019), por si só, não deverá constituir um risco significativo para a saúde pública na região Centro. Contudo, importa salientar que o cálculo da ingestão diária teve por base o consumo habitual médio de vegetais, ao invés do consumo habitual médio específico de cebolas, o que propicia a sobrestimação deste parâmetro.

5.1.3 Couves

5.1.3.1 5ª Colheita

Os teores obtidos dos elementos químicos analisados nas 15 amostras de couve da 5ª colheita estão representados graficamente na figura 5.3. Estes resultados encontram-se reportados no Anexo 5. Nestas amostras, os LQs obtidos para cada elemento químico estão indicados no Anexo 6.

Pela análise da figura 5.3, verifica-se que os teores de Cr obtidos são superiores ao valor encontrado na literatura (37 µg/kg) (EFSA, 2014a) para todos os produtores exceto os produtores C, D, E, J e M. Relativamente ao Co, com exceção dos produtores C, I, J, L, N e O, os restantes apresentam teores superiores ao valor encontrado na literatura (6 µg/kg) (Noël et al., 2012). Os teores de As obtidos nos produtores A, B, F, G, H, I, N e O são superiores ao valor encontrado na literatura (11 µg/kg) (EFSA, 2014c). Nos elementos Cd e Pb, todos os produtores reportam teores inferiores ao valor encontrado em literatura (23 µg/kg (EFSA, 2009c) e 26 µg/kg (EFSA, 2010b), respetivamente) e à legislação em vigor (100 µg/kg para Cd (Regulamento (UE) 2021/1323 da comissão de 10 de agosto de 2021, 2021) e 300 µg/kg para Pb (Regulamento (EU) 2021/1317 da Comissão de 9 de Agosto de 2021, 2021)).

Adicionalmente, conforme mencionado por (Ventura et al., 2021), as amostras de couve colhidas em 2015, ou seja, as amostras controlo (n = 8), reportam como teor médio, 19 µg/kg de Cr, 12 µg/kg de Co, 6 µg/kg de As, 8 µg/kg de Cd e 3 µg/kg de Pb. Comparando estes teores com os resultados das amostras de couve da 5ª colheita, verifica-se que todos os produtores reportam teores superiores de Cr. Os produtores B, D, F, G, H e M reportam teores superiores de Co. Apenas os produtores J e P evidenciam teores de As inferiores às amostras controlo. Apenas os produtores A e I reportam teores de Cd superiores, e por fim, todos os produtores, à exceção do C e E, evidenciam teores de Pb superiores às amostras controlo.

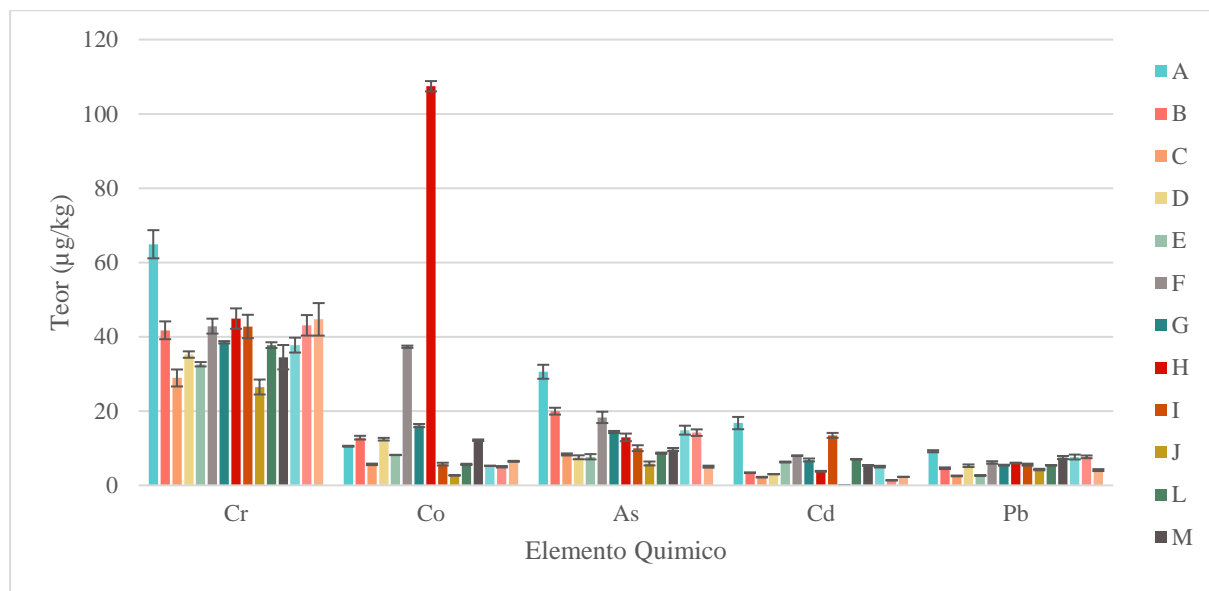


Figura 5.3 - Representação gráfica dos teores de Cr, Co, As, Cd e Pb (µg/kg de peso fresco) nas amostras de couve da 5ª colheita (n = 15).

Os resultados da análise exploratória efetuada nos teores obtidos nestas amostras estão indicados na tabela 5.3. Verifica-se que o Cr regista o teor médio mais elevado (40 µg/kg), enquanto o Cd e o Pb reportam os teores médios mais baixos (5,6 µg/kg), em relação aos restantes elementos químicos.

Tabela 5.3 – Análise exploratória dos resultados obtidos (µg/kg de peso fresco) nas amostras de couve da 5ª colheita (n = 15).

Couves da 5ª colheita	Cr	Co	As	Cd	Pb
	µg/kg de peso fresco				
Média	40	17	13	5,6	5,6
Mínimo	26	2,7	5,0	< LQ (1)	< LQ (3)
1º Quantil	35	5,6	8,0	2,6	4,4
Mediana	38	7,3	9,8	5,2	5,5
3º Quantil	43	13	15	6,9	6,8
Máximo	65	107	31	17	9,2

Segundo o IAN-AF, na população portuguesa adulta da Região Centro, o consumo habitual médio de vegetais, onde se incluem as couves, é de 156g/dia (Lopes et al., 2018).

Considerando os teores máximos obtidos nos elementos químicos analisados nas amostras de couve da 5ª colheita, e o consumo habitual médio do grupo dos vegetais, a estimativa da ingestão diária proveniente destes alimentos é 10 µg de Cr, 16,7 µg de Co, 4,8 µg de As, 2,7 µg de Cd e 1,4 µg de Pb.

Deste modo, considerando um adulto de 70 kg, a ingestão diária resultante do consumo de couves da 5ª colheita estimada para o Co é consideravelmente inferior ao LOAEL (1 mg/kg de peso corporal, equivalente a 70000 µg) (EFSA, 2009a). A ingestão diária estimada de As, proveniente destes alimentos, é inferior ao limite mínimo 0,3 µg/kg de peso corporal por dia (21 µg/dia, num adulto de 70 kg) (EFSA, 2021b). Para o Cd, a ingestão diária estimada, decorrente do consumo destas couves, também é inferior à dose semanal admissível de 2,5 µg/kg de peso corporal (25 µg/dia, num adulto de 70 kg) (EFSA, 2009c). Finalizando, a ingestão diária de Pb estimada nestas couves é mínima face ao PTWI de 25 µg/kg de peso corporal (250 µg/dia, num adulto de 70 kg) (EFSA, 2010b).

Neste cenário, é possível concluir que o consumo de couves da 5ª colheita (Janeiro de 2019), por si só, não evidencia potenciais riscos para a saúde pública na região Centro. Contudo, dada a ausência de dados específicos do consumo médio de couves na população portuguesa da região Centro, a exposição por ingestão aos elementos químicos analisados encontra-se sobrestimada.

5.1.3.2 6ª Colheita

A figura 5.4 representa, graficamente, os teores obtidos dos elementos químicos analisados nas 12 amostras de couve da 6ª colheita. O Anexo 7 apresenta a compilação destes resultados, e o Anexo 8 os valores dos LQ obtidos em cada elemento químico, nestas amostras.

Da análise da figura 5.4., verifica-se que nos produtores C, D, E, G, J e N os teores de Cr obtidos são superiores ao valor encontrado na literatura (37 µg/kg) (EFSA, 2014a). No elemento Co, à exceção dos produtores H, J, L, N e P, os restantes reportam teores superiores ao valor encontrado na literatura (6 µg/kg) (Noël et al., 2012). Os produtores A, D, F, G, H, I, J e N registam teores de As superiores ao valor encontrado na literatura (11 µg/kg) (EFSA, 2014c). Os teores de Cd e Pb obtidos, em qualquer produtor, são inferiores ao valor encontrado na literatura (23 µg/kg (EFSA, 2009c) e 26 µg/kg (EFSA, 2010b), respetivamente) e à legislação em vigor (100 µg/kg (Regulamento (UE) 2021/1323 Da Comissão de 10 de Agosto de 2021) e 300 µg/kg (Regulamento (EU) 2021/1317 da Comissão de 9 de Agosto de 2021), respetivamente).

Comparativamente às amostras controlo analisadas por (Ventura et al., 2021), verifica-se que nas amostras de couve da 6ª colheita, os teores de Cr e de Pb são superiores em todos os produtores. Verifica-se ainda que apenas os produtores D, G e I reportam teores de Co superiores e os produtores C, E e L são os únicos que reportam teores de As inferiores às amostras controlo. Por fim, somente o produtor F é que evidencia um teor de Cd superior às amostras controlo.

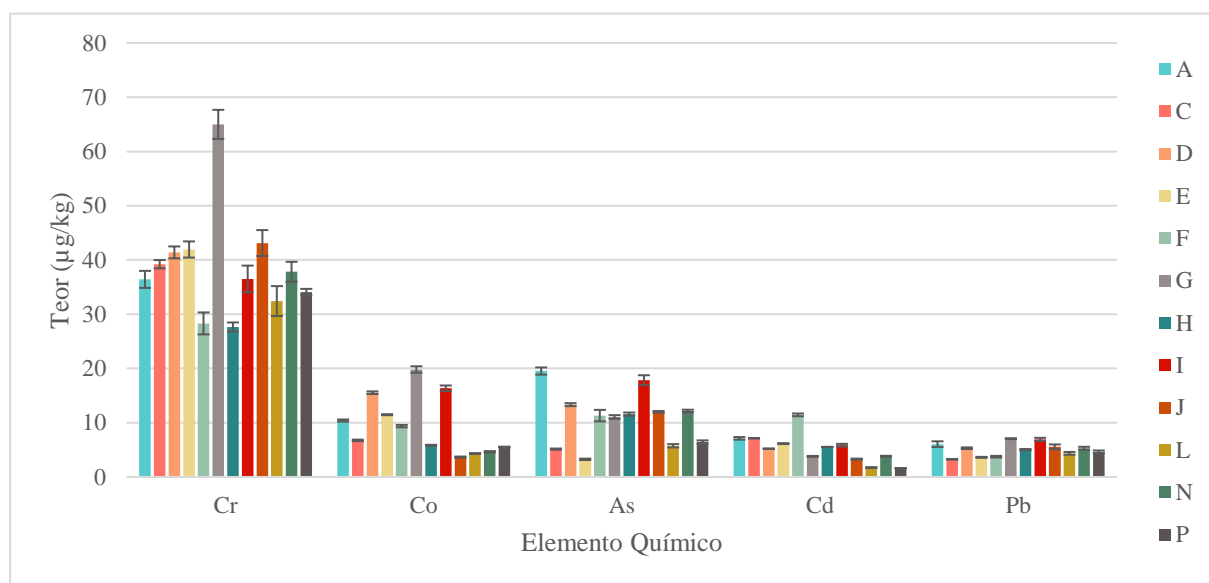


Figura 5.4 - Representação gráfica dos teores de Cr, Co, As, Cd e Pb (µg/kg de peso fresco) nas amostras de couve da 6ª colheita (n=12).

A tabela 5.4 indica os resultados da análise exploratória efetuada para os teores obtidos nas amostras de couve da 6ª colheita. Nestas amostras, verifica-se que o teor médio máximo corresponde ao Cr (39 µg/kg) e o teor médio mínimo corresponde ao Cd e Pb (5,1 µg/kg), comparativamente aos restantes elementos químicos.

Tabela 5.4 – Análise exploratória dos resultados obtidos (µg/kg de peso fresco) nas amostras de couve da 6ª colheita (n = 12).

Couves da 6ª colheita	Cr	Co	As	Cd	Pb
	µg/kg de peso fresco				
Média	39	9,5	11	5,2	5,1
Mínimo	28	3,7	3,3	1,6	3,3
1º Quartil	34	5,3	6,3	3,7	4,2
Mediana	37	8,1	11	5,4	5,2
3º Quartil	42	12	12	6,4	5,7
Máximo	65	20	20	11	7,1

Com base no teor máximo verificado nos elementos químicos analisados nas amostras de couve da 6ª colheita, e no consumo habitual médio do grupo dos vegetais na população portuguesa adulta da Região Centro, a estimativa da ingestão diária proveniente destes alimentos é 10 µg de Cr, 3,1 µg de Co, 3,1 µg de As, 1,7 µg de Cd e 1 µg de Pb.

Com base nos parâmetros anteriormente mencionados e definidos pela EFSA, verifica-se que o consumo de couves da 6ª colheita leva a resultados idênticos aos observados para as amostras de couve da 5ª colheita. Por este motivo, conclui-se que o consumo de couves da 6ª colheita (Maio de 2019), por si só, não constitui um risco para a saúde pública na Região Centro. Importa salientar que, tal como nas amostras de cebola, a ausência de dados específicos do consumo médio de couves na população portuguesa da região Centro, leva à sobrestimação da exposição por ingestão aos elementos químicos analisados.

5.1.4 Ovos

5.1.4.1 5ª Colheita

Os resultados obtidos na análise das 12 amostras de ovo da 5ª colheita estão representados graficamente na figura 5.5 e compilados no Anexo 9. Os valores dos LQs nestas amostras estão indicados no Anexo 10.

Da análise da figura 5.5, verifica-se que, para todos os produtores, o teor de Cr obtido é superior ao valor encontrado na literatura (29 µg/kg) (EFSA, 2014a). Em contraste, o teor de Co obtido em cada produtor é inferior ao valor encontrado na literatura (6 µg/kg) (Noël et al., 2012). Relativamente ao As, todos os produtores também registam teores inferiores ao valor encontrado na literatura (12 µg/kg) (EFSA, 2009b). Todos os produtores registam teores de Cd inferiores ao LQ. Por

último, os produtores H e I apresentam teores de Pb muito superiores aos restantes produtores e ao valor encontrado na literatura (25 µg/kg) (EFSA, 2010b).

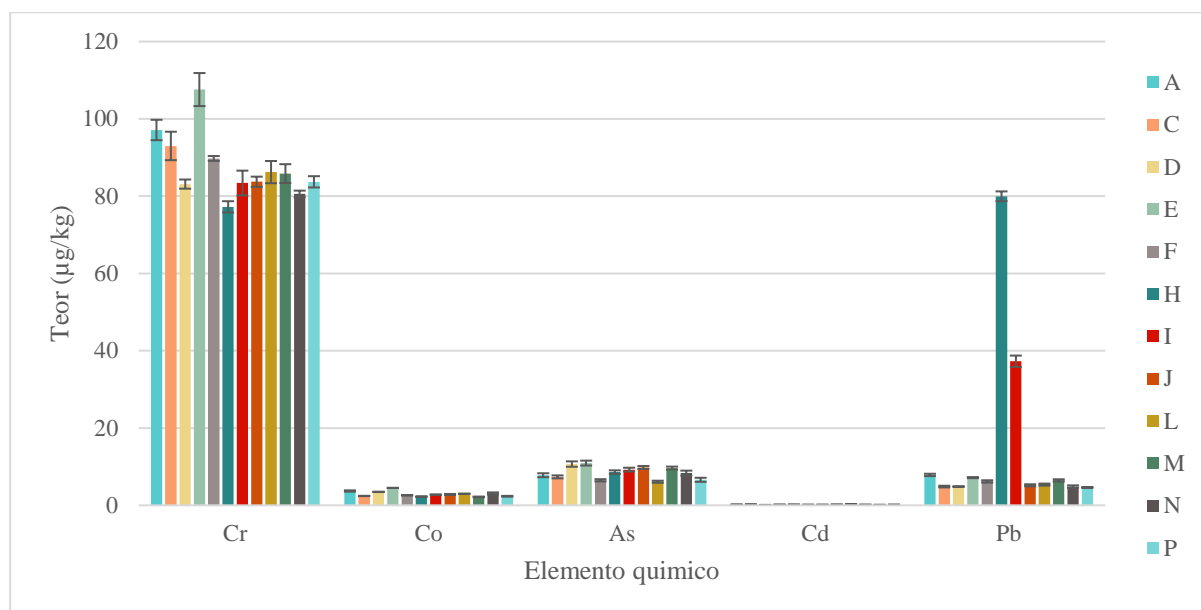


Figura 5.5 - Representação gráfica dos teores de Cr, Co, As, Cd e Pb (µg/kg de peso fresco) nas amostras de ovo da 5ª colheita (n = 12).

Na tabela 5.5, estão indicados os resultados da análise exploratória dos teores obtidos nas amostras de ovo da 5ª colheita. O Cr apresenta o maior teor médio obtido (88 µg/kg), comparativamente aos restantes elementos químicos. Todos os teores de Cd obtidos foram inferiores ao LQ.

Tabela 5.5 - Análise exploratória dos resultados obtidos (µg/kg de peso fresco) nas amostras de ovo da 5ª colheita (n = 12).

Ovos da 5ª colheita	Cr	Co	As	Cd	Pb
	µg/kg de peso fresco				
Média	88	2,9	8,5	< LQ (3)	15
Mínimo	77	2,2	6,1	< LQ (3)	< LQ (5)
1º Quantil	83	2,4	7,2	< LQ (3)	< LQ (5)
Mediana	85	2,8	8,5	< LQ (3)	5,8
3ª quantil	91	3,2	10	< LQ (3)	7,3
Máximo	108	4,5	11	< LQ (3)	80

O IAN-AF reporta que, na população portuguesa adulta da região Centro, o consumo habitual médio de ovos é de 16,3 g/dia (Lopes et al., 2018).

Mediante o teor máximo obtido para os elementos químicos analisados nas amostras de ovo da 5ª colheita e o consumo habitual médio de ovos, a ingestão diária estimada nestes alimentos é de 1,76 µg de Cr, 0,073 µg de Co, 0,18 µg de As e 1,3 µg de Pb. Para o Cd é considerado como teor máximo o valor correspondente ao LQ (3 µg/kg), o que resulta na ingestão diária de 0,05 µg estimada nestes alimentos.

De acordo com os parâmetros de avaliação do risco definidos pela EFSA, considerando um adulto de 70 kg, a ingestão diária estimada de Co, com base no consumo de ovos da 5ª colheita, é inferior ao LOAEL de 1 mg/kg de peso corporal (equivalente a 70000 µg) (EFSA, 2009a) e a ingestão de As está abaixo do limite mínimo de 0,3 µg/kg de peso corporal por dia (equivalente a 21 µg/dia) (EFSA, 2021b). Para o Cd, a ingestão diária estimada nestes alimentos, também é inferior à dose semanal admissível de 2,5 µg/kg de peso corporal (25 µg/dia, num adulto de 70 kg) (EFSA, 2009c). Por fim, a estimativa da ingestão diária de Pb é diminuta face ao PTWI de 25 µg/kg de peso corporal (EFSA, 2010b), correspondente a 250 µg/dia num adulto de 70 kg.

Segundo esta avaliação, conclui-se que o contributo exclusivo do consumo de ovos da 5ª colheita (Janeiro de 2019) para a exposição aos elementos químicos analisados é reduzido, não evidenciando um risco para a saúde da população da região Centro.

5.1.4.2 6ª Colheita

Os resultados obtidos nas 4 amostras de ovos da 6ª colheita encontram-se representados na figura 5.6, e compilados no Anexo 11. Os valores dos LQ's calculados para estas amostras estão indicados no Anexo 12.

Na figura 5.6, verifica-se que, para todos os produtores, o teor de Cr obtido é superior ao valor encontrado na literatura (29 µg/kg) (EFSA, 2014a). Em contraste, o teor de Co obtido, em cada produtor, é inferior ao valor encontrado na literatura (6 µg/kg) (Noël et al., 2012). O teor de As obtido no produtor G é o único superior ao valor encontrado na literatura (12 µg/kg) (EFSA, 2014c). Relativamente ao Cd e Pb, os teores registados, em todos os produtores, são inferiores aos respetivos LQs.

Importa ressaltar que para o produtor H, o teor de Pb obtido na 5ª colheita (80 µg/kg) foi consideravelmente superior ao teor de Pb obtido na 6ª colheita (< LQ). Dada esta discrepância, supõem-se que tenham ocorrido possíveis erros acidentais, por exemplo, ao nível da preparação de amostras, ou eventuais contaminações no local de produção das galinhas e de ovos, no período antecedente à colheita das amostras. Apesar de não terem sido colhidas amostras para o produtor I na 6ª colheita, são atribuídas as mesmas causas ao teor de Pb registado neste produtor na 5ª colheita.

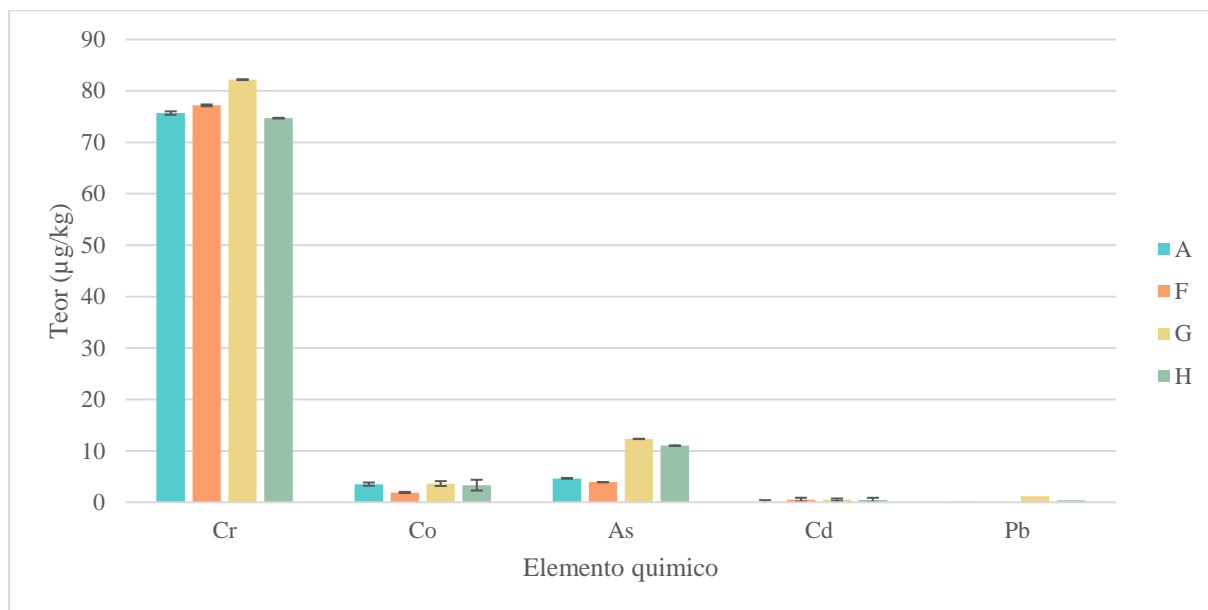


Figura 5.6 - Representação gráfica dos teores de Cr, Co, As, Cd e Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de ovo da 6ª colheita (n = 4).

A tabela 5.6 apresenta os resultados da análise exploratória dos teores obtidos nas amostras de ovo da 6ª colheita. Verifica-se que o Cr apresenta o teor médio mais elevado ($82 \mu\text{g}/\text{kg}$), comparativamente aos restantes elementos químicos. Tanto o Cd como o Pb reportam teores inferiores ao LQ.

Tabela 5.6 – Análise exploratória dos resultados obtidos ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de ovo da 6ª colheita (n = 4).

Ovos da 6ª colheita	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
Média	77	3	8	< LQ (3)	< LQ (8)
Mínimo	75	2	4	< LQ (3)	< LQ (8)
1º Quantil	75	3	4	< LQ (3)	< LQ (8)
Mediana	76	3	8	< LQ (3)	< LQ (8)
3ª quantil	78	4	11	< LQ (3)	< LQ (8)
Máximo	82	4	12	< LQ (3)	< LQ (8)

Mediante o teor máximo dos elementos químicos obtido nas amostras de ovo da 6ª colheita e o consumo habitual médio de ovos, na população portuguesa adulta da região Centro, a estimativa da ingestão diária proveniente destes alimentos é $1,33 \mu\text{g}$ de Cr, $0,07 \mu\text{g}$ de Co e $0,19 \mu\text{g}$ de As. Para o Cd e Pb, considerou-se como teor máximo o valor correspondente aos respetivos LQs, estimando-se nestes alimentos uma ingestão diária de $0,05 \mu\text{g}$ e $0,1 \mu\text{g}$, respetivamente.

Deste modo, verifica-se que a ingestão diária de Co, As, Cd e Pb, atribuída ao consumo de ovos da 6ª colheita, não excede os parâmetros de avaliação do risco definidos pela EFSA.

Como tal, à semelhança das amostras de ovo da 5ª colheita, conclui-se que o consumo de ovos da 6ª colheita (Maio de 2019) por si só, não constitui um risco para a saúde pública na região Centro.

5.1.5 Avaliação do Risco Combinado de Exposição

Utilizando os dados do consumo habitual médio dos alimentos analisados (batatas, cebolas, couves e ovos), na população portuguesa adulta da região Centro (Lopes *et al.*, 2018), e a respetiva ingestão diária estimada dos elementos químicos analisados na 5ª colheita, a ingestão total diária é de 24 µg de Cr, 21 µg de Co, 5,7 µg de As, 6,3 µg de Cd e 3,7 µg de Pb (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 – Ingestão diária estimada, por µg/dia, dos contaminantes químicos analisados com base no consumo médio dos alimentos amostrados na 5ª colheita, na população da região Centro.

Contaminante químico	Batatas	Cebolas	Couves	Ovos	Total
	µg/dia				
Cr	7,30	4,90	10,00	1,76	24,0
Co	3,20	0,60	16,70	0,07	21,0
As	0,25	0,49	4,80	0,18	5,7
Cd	1,70	1,89	2,70	0,05	6,3
Pb	0,54	0,50	1,40	1,30	3,7

Por conseguinte, considerando que a EFSA define 1 mg/kg de peso corporal como LOAEL para o Co (EFSA, 2009c), equivalente a 70 mg num adulto de 70kg, a ingestão total diária de Co, proveniente das amostras de alimentos da 5ª colheita, é inferior ao LOAEL. Para o As, a respetiva ingestão total diária através do consumo das amostras de alimentos da 5ª colheita, é inferior ao limite mínimo de 21 µg/dia definido pela EFSA (EFSA, 2021a). Por outro lado, a DSA (2,5 µg/kg de peso corporal) estabelecida pela EFSA para o Cd (EFSA, 2009a), equivalente a 25 µg/dia de Cd num adulto com 70kg, é superior à ingestão total diária de Cd proveniente das amostras de alimentos da 5ª colheita. Por fim, a ingestão total diária de Pb derivada do consumo das amostras de alimentos da 5ª colheita, é inferior ao PTWI de 25 µg/kg de peso corporal (EFSA, 2010a), equivalente a 250 µg/dia, para um adulto de 70kg.

Dada esta avaliação, conclui-se que o contributo do consumo combinado das batatas, cebolas, couves e ovos da 5ª colheita (Janeiro de 2019) para a exposição aos elementos químicos analisados, não constitui um risco para a saúde pública na região Centro.

5.2 Comparação dos resultados obtidos com amostras colhidas em 2017

5.2.1 Batatas

A comparação entre as médias dos teores dos elementos químicos analisados nas amostras de batata foi efetuada nos 7 produtores (A, C, D, E, F, G e H) comuns às colheitas de 2017 (1ª e 2ª colheitas) e 2019 (5ª colheita).

A figura 5.7 representa graficamente os teores de Cr obtidos nas três colheitas. Segundo o teste *RM ANOVA*, a média do teor de Cr é significativamente diferente entre colheitas ($F(2, 12) = 13,79$, $p < 0,001$). Por seu turno, pela análise *post-hoc* sob a correção de *Bonferroni*, são verificadas diferenças significativas entre a 5ª colheita e as restantes colheitas ($p \leq 0,05$).

A figura 5.7 é concordante com estes resultados, na medida em que, os teores de Cr registados na 5ª colheita reportam uma gama de valores superior aos teores das colheitas de 2017.

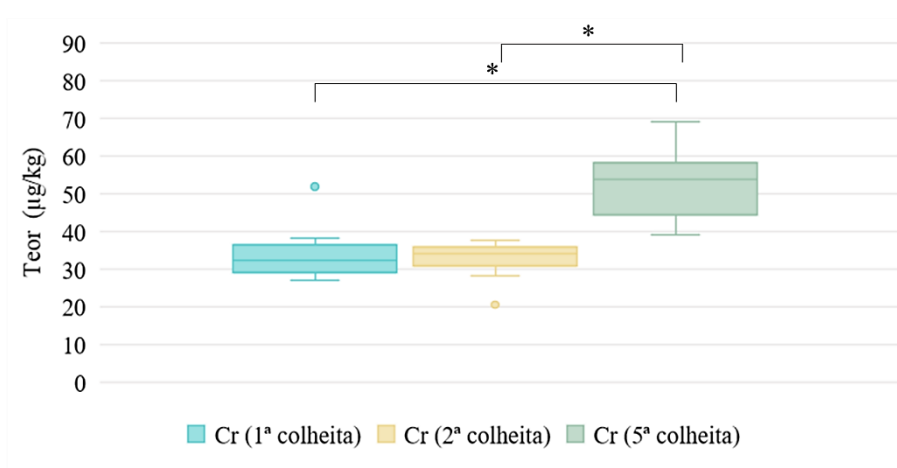


Figura 5.7 – Comparação dos teores de Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$.

A figura 5.8 representa graficamente os teores de Co obtidos nas três colheitas. Segundo o teste de *Friedman*, não existe evidência estatística que permita rejeitar a igualdade das medianas dos teores de Co entre as três colheitas ($Friedman X^2(2) = 3,71$; $p = 0,1561$), o que também é verificado na figura 5.8. As diferentes amplitudes interquartis e a ausência de simetria nos *boxplots* da figura 5.8, reflete a ausência de uma distribuição normal nestes dados.

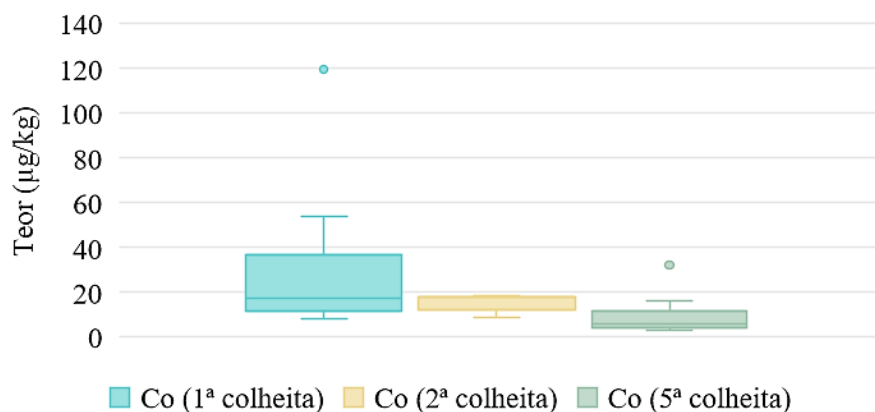


Figura 5.8 – Comparação dos teores de Co ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; $n \text{ total} = 21$).

Relativamente ao As, os teores obtidos nas três colheitas estão representados graficamente na figura 5.9. Conforme o teste *RM ANOVA*, a média do teor de As é significativamente diferente entre colheitas ($F(1,15; 6,91) = 136,366$; $p < 0,001$). Na análise *post-hoc* sob a correção de *Bonferroni*, são identificadas diferenças significativas entre as primeiras colheitas e entre a 2ª e a 5ª colheita ($p \leq 0,05$). Tal como mencionado em (Gueifão et al., 2020), a média dos teores de As obtidos na 2ª colheita é superior à da 1ª colheita. Neste estudo, verifica-se que a média dos teores de As da 5ª colheita é significativamente diferente das médias da 1ª e da 2ª colheita, e pela análise da figura 5.9, observa-se um decréscimo pronunciado nos teores de As entre a 2ª colheita e a 5ª colheita.

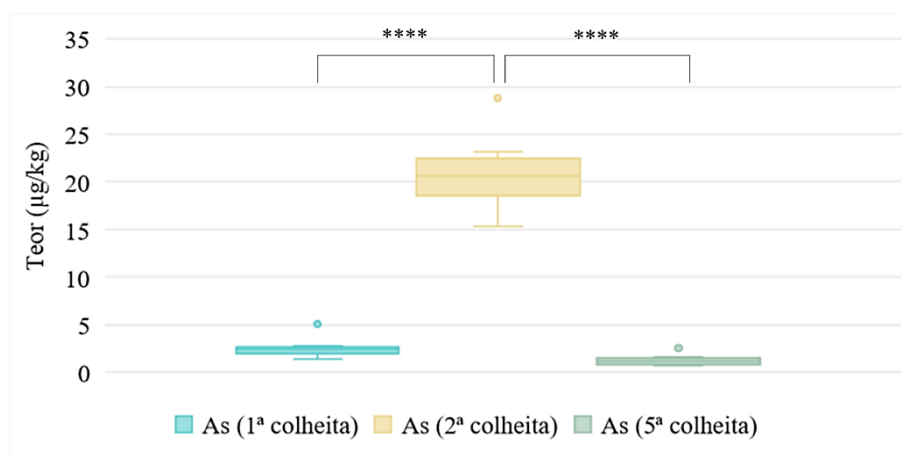


Figura 5.9 – Comparação dos teores de As ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; $n \text{ total} = 21$). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. **** $p < 0,0001$.

Os resultados obtidos nos teores de Cd nas três colheitas estão representados graficamente na figura 5.10. Segundo o teste de *RM ANOVA*, existe evidência estatística para rejeitar a igualdade das médias dos teores de Cd entre as três colheitas ($F(1,13; 6,78) = 34,16$; $p < 0,001$). Na análise *post-hoc* sob a correção de *Bonferroni*, são constatadas diferenças significativas entre todas as combinações possíveis de colheitas ($p \leq 0,05$).

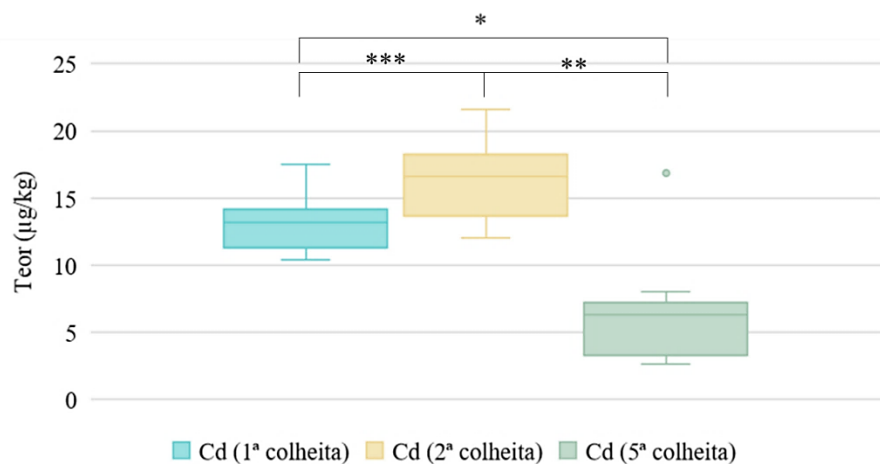


Figura 5.10 – Comparação dos teores de Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Os teores de Pb obtidos nas três colheitas estão representados graficamente na figura 5.11. O teste de *RM ANOVA* reporta evidência estatística para rejeitar a igualdade das médias dos teores de Pb entre as três colheitas ($F(1,04; 6,24) = 8,496$; $p = 0,025$). Por seu turno, estas diferenças não se revelam significativas quando analisadas entre pares de combinações de colheitas. Como tal, a análise estatística corrobora a existência de diferenças significativas nas médias dos teores de Pb entre as colheitas analisadas como um todo, mas não reporta diferenças significativas entre combinações específicas de colheitas. Como mencionado em (Gueifão et al., 2020), verifica-se um aumento no teor de Pb entre a 1ª e a 2ª colheita. Comparando com a 1ª colheita, os teores de Pb na 5ª colheita são ligeiramente superiores, enquanto relativamente à 2ª colheita, os teores de Pb na 5ª colheita são inferiores. No entanto, estas diferenças, sob um nível de confiança de 95%, não são consideradas significativas.

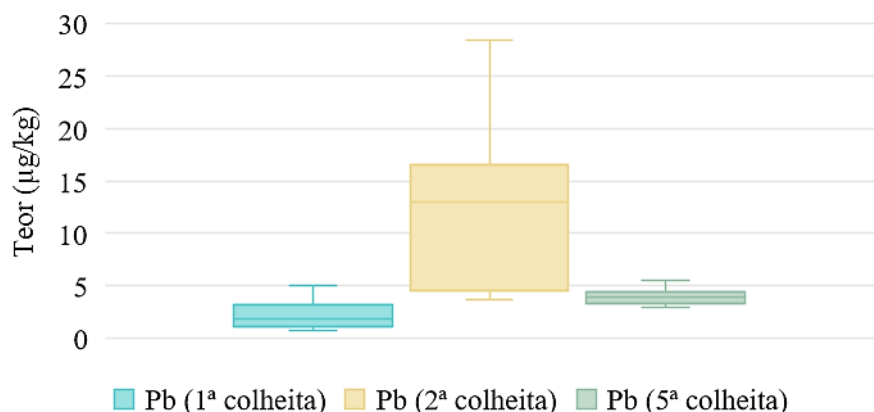


Figura 5.11 – Comparação dos teores de Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de batata colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Mediante as análises anteriormente descritas e os resultados reportados na tabela 5.8, é possível concluir que, nas amostras de batata, o Cr foi o único elemento químico no qual se observou um aumento significativo do teor médio entre 2017 e 2019. À exceção do Co, cujas diferenças entre

colheitas não foram significativas, os teores médios de As e de Cd reportam decréscimos significativos entre 2017 e 2019. As médias dos teores de Pb entre colheitas são significativamente diferentes, mas entre combinações de colheitas não apresentam diferenças significativas.

Tabela 5.8 – Valor mínimo, média e valor máximo obtidos para cada elemento químico ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas 3 colheitas de amostras de batata ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Batatas	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
Mínimo 1ª Colheita	27	8	1	10	1
Mínimo 2ª Colheita	21	9	15	12	4
Mínimo 5ª Colheita	39	3	1	3	3
Média 1ª colheita	35	34	3	13	2
Média 2ª colheita	32	15	21	16	12
Média 5ª colheita	53	10	1	7	4
Máximo 1ª Colheita	52	120	5	18	5
Máximo 2ª Colheita	38	18	29	22	28
Máximo 5ª Colheita	69	32	3	17	6

5.2.2 Couves

A comparação dos teores dos elementos químicos analisados nas amostras de couve foi realizada nos 7 produtores (A, C, D, E, F, G e H) comuns às colheitas de 2017 (1ª e 2ª colheitas) e de 2019 (5ª e 6ª colheitas).

Os teores de Cr obtidos nas quatro colheitas estão representados graficamente na figura 5.12. Segundo o teste *RM ANOVA*, existe evidência estatística para rejeitar a igualdade das médias dos teores de Cr entre as quatro colheitas ($F(3,18) = 7,752$; $p = 0,006$). Na análise *post-hoc* sob a correção de *Bonferroni*, a média do teor de Cr da 2ª colheita é significativamente diferente das médias do teor de Cr da 1ª e da 5ª colheita ($p \leq 0,05$). Esta situação é corroborada pela figura 5.12, na qual se verifica um decréscimo nos teores de Cr entre a 1ª e a 2ª colheita, seguido de um aumento entre a 2ª colheita e as colheitas de 2019.

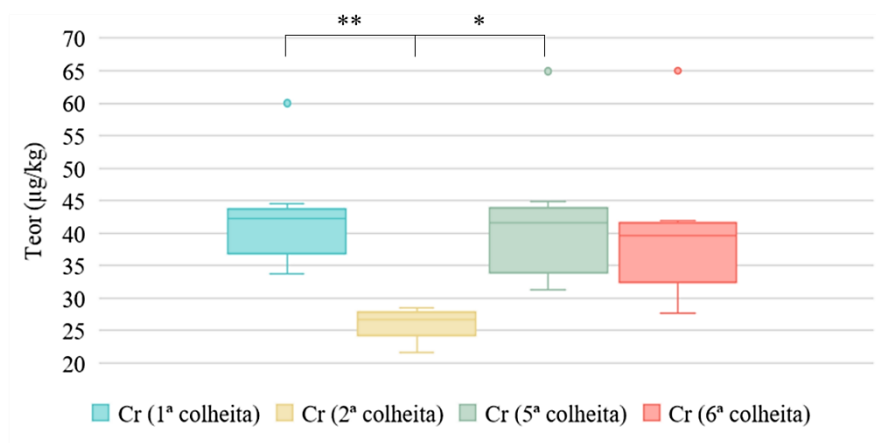


Figura 5.12 – Comparação dos teores de Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Os teores de Co obtidos para as quatro colheitas estão representados graficamente na figura 5.13. De acordo com o teste de *Friedman*, não é reportada evidência estatística que permita rejeitar a igualdade das medianas dos teores de Co entre as quatro colheitas (*Friedman* $X^2(3) = 5,23$; $p = 0,156$). Como evidenciado na figura 5.13, os teores de Co obtidos na 6ª colheita são inferiores aos teores obtidos nas colheitas de 2017, apesar das diferenças nas medianas não serem significativas.

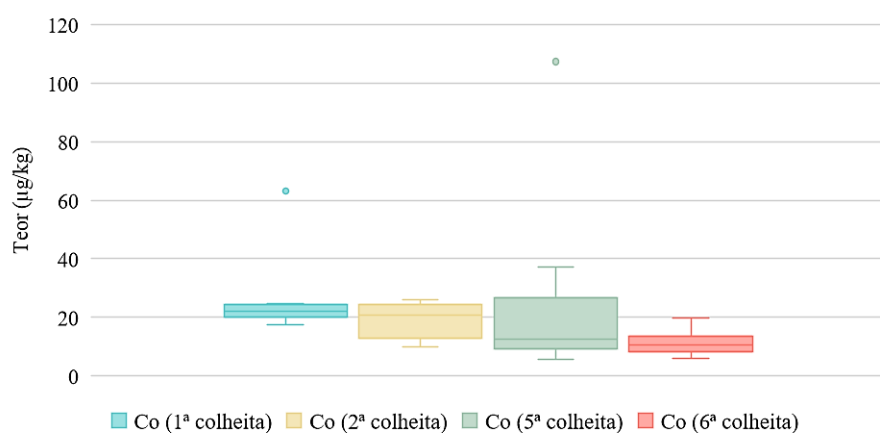


Figura 5.13 – Comparação dos teores de Co ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Os teores de As obtidos nas quatro colheitas estão representados graficamente na figura 5.14. De acordo com o teste *RM ANOVA*, existe evidência estatística que permite rejeitar a igualdade das médias dos teores de As entre as quatro colheitas ($F(3,18) = 26,078$; $p < 0,001$) em particular, entre as colheitas de 2017 e entre a 2ª colheita e as colheitas de 2019 ($p \leq 0,05$). Na figura 5.14, os teores de As obtidos na 2ª colheita são superiores aos teores reportados nas colheitas de 2019. Conforme mencionado em (Gueifão et al., 2020), houve um aumento significativo entre os valores médios das colheitas de 2017. Este estudo confirma uma redução significativa nos teores de As da 2ª colheita para as colheitas de 2019.

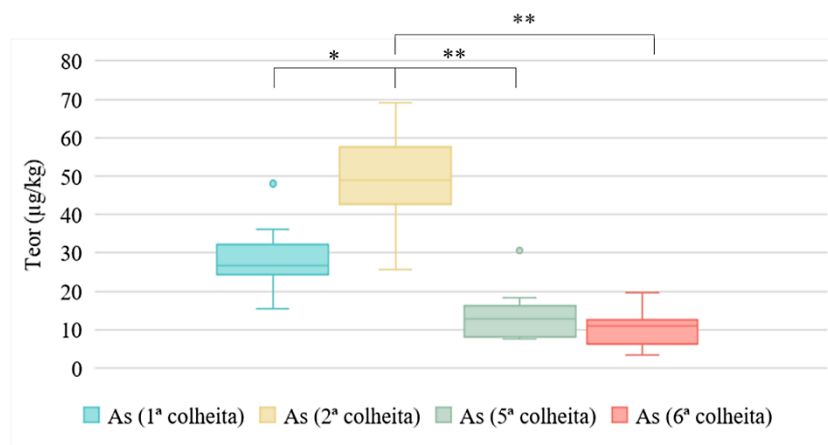


Figura 5.14 – Comparação dos teores de As ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21). Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Relativamente ao Cd, os teores obtidos nas quatro colheitas estão representados na figura 5.15. Conforme o teste *RM ANOVA*, não existe evidência estatística que permita rejeitar a igualdade das médias dos teores de Cd entre as quatro colheitas ($F(3,18) = 2,997$; $p = 0,058$). Na figura 5.15, observa-se uma redução no teor de Cd, ao longo das quatro colheitas, apesar de não ser significativa.

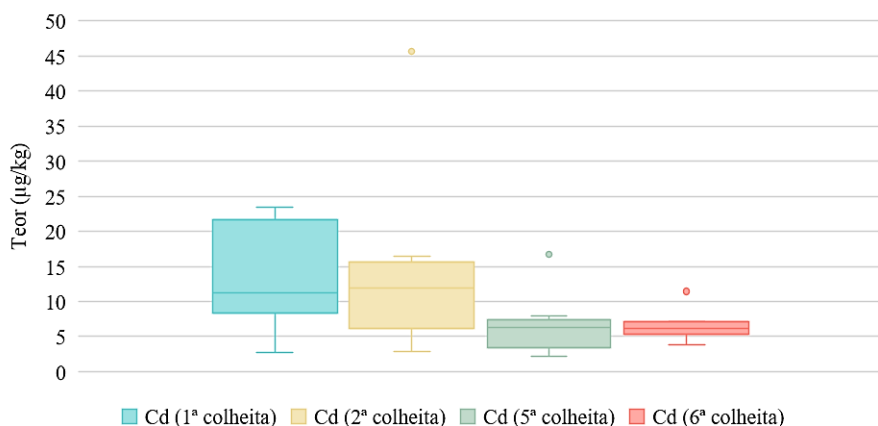


Figura 5.15 – Comparação dos teores de Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Os resultados inerentes aos teores de Pb obtidos nas quatro colheitas estão representados graficamente na figura 5.16. Segundo o teste *RM ANOVA*, existe evidência para rejeitar a igualdade das médias dos teores de Pb entre as quatro colheitas ($F(3,18) = 6,797$, $p = 0,003$), especificamente entre a 2ª colheita e a 6ª colheita ($p \leq 0,05$). A figura 5.16 corrobora um aumento significativo nos teores de Pb entre essas duas colheitas.

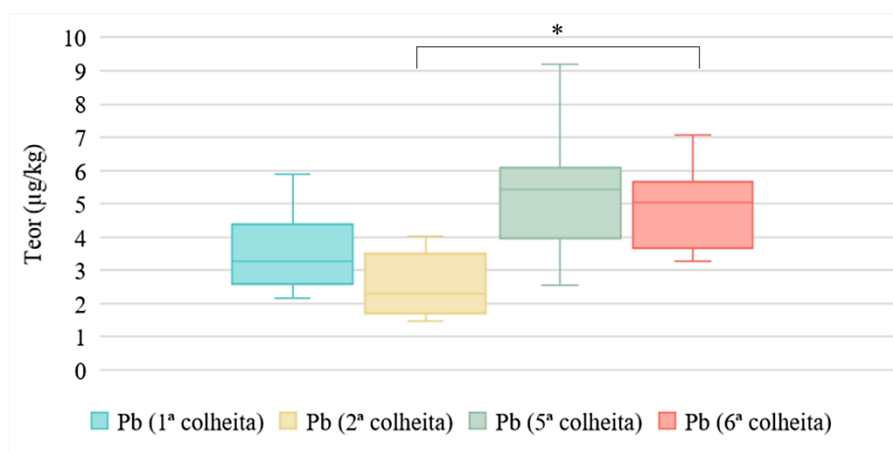


Figura 5.16 – Comparação dos teores de Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de couve colhidas em 2017 (1ª e 2ª colheita) e 2019 (5ª e 6ª colheita) ($n = 7$, por colheita; n total = 21) Teste de comparação múltipla: Teste T, Correção: *Bonferroni*. * $p < 0,05$.

Em suma, mediante a análise estatística e os dados da tabela 5.9, nas amostras de couve, verifica-se um aumento nos teores de Cr entre a 2ª colheita e as colheitas de 2019 e uma redução significativa nos teores de As entre as colheitas de 2017 e de 2019. Os decréscimos verificados nos teores de Co e Cd, entre 2017 e 2019, não são considerados estatisticamente significativos. Os teores de Pb, entre os anos em análise, reportam um acréscimo significativo entre a 2ª e a 6ª colheita.

Tabela 5.9 – Valor mínimo, média e valor máximo obtidos para cada elemento químico ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), nas 4 colheitas de amostras de couve ($n = 7$, por colheita; n total = 21).

Couves	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
Mínimo 1ª Colheita	34	17	15	3	2
Mínimo 2ª Colheita	22	10	26	3	1
Mínimo 5ª Colheita	31	6	8	2	3
Mínimo 6ª Colheita	28	6	3	4	3
Média 1ª colheita	42	27	29	14	4
Média 2ª colheita	26	19	49	15	3
Média 5ª colheita	42	28	14	7	5
Média 6ª colheita	40	11	10	7	5
Máximo 1ª Colheita	60	63	48	24	6
Máximo 2ª Colheita	29	26	69	46	4
Máximo 5ª Colheita	65	107	31	17	9
Máximo 6ª Colheita	65	20	20	11	7

Capítulo VI

Conclusões

6. Conclusões e Considerações Finais

Os incêndios florestais evidenciam capacidade para incrementar o teor de contaminantes químicos no meio natural. Como reporta a literatura, as emissões de gases e partículas, a combustão da matéria orgânica e a deposição de cinzas, são considerados como os principais mecanismos decorrentes dos incêndios, que potenciam a introdução e mobilização de elementos químicos na atmosfera, no solo e nos recursos hídricos. Por conseguinte, sob elevados teores de elementos químicos no exterior, as espécies vegetais conseguem absorver e acumular quantidades tais que induzem efeitos tóxicos ao nível celular, fisiológico e morfológico. Caso estas espécies se destinem ao consumo humano, passam a constituir uma fonte de exposição a elementos químicos potencialmente tóxicos, colocando em risco a saúde dos consumidores. Como mencionado, os metais pesados Cr, Co, As, Cd e Pb, quando introduzidos na dieta humana, podem causar efeitos adversos, a curto e a longo prazo, na sua saúde.

Assim, é estabelecida uma relação entre a ocorrência de incêndios florestais e os impactos causados nas várias componentes dos ecossistemas naturais que, por sua vez, se refletem nas cadeias alimentares, primeiramente ao nível dos produtores (espécies vegetais) e culminando nos consumidores de topo (ser humano).

Nos resultados obtidos neste estudo, importa realçar que:

- ✓ Segundo a legislação em vigor estabelecida pela EFSA, nenhuma amostra de alimento reporta teores dos elementos químicos analisados prejudiciais à saúde das populações da região Centro.
 - As amostras de batata da 5^a colheita revelam uma maior proporção de Cr e uma menor proporção de As. Segundo os parâmetros de avaliação do risco definidos pela EFSA, a exposição por ingestão destas batatas aos elementos químicos analisados, por si só, não constitui um risco para a saúde da população.
 - As amostras de cebola da 5^a colheita apresentam maior proporção de Cr, relativamente aos restantes elementos químicos analisados. Segundo os parâmetros de avaliação do risco definidos pela EFSA, a exposição por ingestão destas cebolas aos elementos químicos analisados, por si só, não constitui um risco para a saúde da população. Importa realçar que a estimativa da ingestão diária teve por base o valor médio do consumo de vegetais, na população portuguesa da região Centro, devido à ausência de dados específicos referentes ao consumo de cebolas nesta população.
 - As amostras de couve da 5^a e da 6^a colheita apresentam uma maior proporção de Cr e proporções de Cd e Pb mais baixas. Com base nos parâmetros de avaliação do risco definidos pela EFSA, a exposição pela ingestão destas couves aos elementos químicos analisados, por si só, não constitui um risco para a saúde da população. Dada a ausência de dados específicos referentes ao consumo de couves na população portuguesa da região Centro, a exposição por ingestão encontra-se sobrestimada. Comparando com amostras

controle, as amostras de couve analisadas apresentam teores superiores de Cr e Pb para a maioria dos produtores, e em alguns casos teores superiores de Co, As e Cd.

- As amostras de ovo da 5ª e da 6ª colheita reportam proporções elevadas de Cr e baixas de Cd. Segundo os parâmetros de avaliação do risco definidos pela EFSA, a exposição por ingestão destes ovos aos elementos químicos analisados, não constitui um risco para a saúde da população
- Em adição, o contributo do consumo combinado das batatas, das cebolas, das couves e dos ovos da 5ª colheita (Janeiro de 2019) para a exposição aos elementos químicos analisados, não constitui um risco para a saúde pública na região Centro.
- ✓ Apesar de provirem de áreas agrícolas próximas das áreas ardidas em 2017 na região Centro, a análise efetuada às amostras de alimentos colhidas em 2019 não suporta a existência de uma relação entre o aparecimento de efeitos adversos à saúde humana e a exposição aos elementos químicos analisados.
- ✓ Tendo-se verificado que no estudo pioneiro de (Gueifão et al., 2020) entre a 1ª colheita (Agosto de 2017) e a 2ª colheita (Dezembro de 2017), o teor de As aumentou nas amostras dos alimentos em estudo (batatas e couves), os teores de Cd e Pb aumentaram nas amostras de batata e o teor de Cr diminuiu nas amostras de couve, neste estudo, complementarmente aos resultados das colheitas de 2017, verificou-se que, entre 2017 e 2019:
 - Nas amostras de batata, o teor médio de Cr foi o único no qual se observou um aumento significativo. À exceção do Co, cujas diferenças entre colheitas não foram significativas, os teores médios de As e de Cd reportam decréscimos significativos. As médias dos teores de Pb entre colheitas são significativamente diferentes, mas entre combinações de colheitas, não apresentam diferenças significativas;
 - Nas amostras de couve, verificou-se um aumento significativo nos teores de Cr e uma redução significativa nos teores de As. O decréscimo nos teores de Co e Cd, não são considerados estatisticamente significativos. Os teores de Pb reportam um acréscimo significativo entre a 2ª e a 6ª colheita.

Como sugestões para trabalhos futuros:

- ✓ Reforça-se a importância de realizar amostragens mais abundantes e diversificadas, garantindo uma maior representatividade dos alimentos consumidos pelas populações da Região em estudo.
- ✓ Propõe-se a elaboração de inquéritos sobre hábitos de consumo das populações e produtores afetados, para se obterem dados concretos de consumo alimentar e, a partir destes, estimar o risco real de exposição por via alimentar.
- ✓ Reforça-se a necessidade de efetuar a especificação do Cr, Co e As, cuja toxicidade é evidenciada em formas valentes específicas, como o Cr (IV), iAs e Co (II).
- ✓ Sugere-se a elaboração de estudos que avaliem com maior precisão os efeitos dos incêndios no meio ambiente e nas populações afetadas. Para tal, propõe-se a utilização de mapas de risco nacionais de incêndios florestais para selecionar zonas de risco elevado e, nessas, elaborar amostragens de alimentos, de solo e de água, criando uma base de dados de amostras consideradas como amostras controle. Após a ocorrência de incêndios nessas zonas, propõe-se a realização de amostragens regulares de alimentos, solo e água, e posterior análise comparativa com as amostras controle (colhidas previamente aos incêndios).

Referências bibliográficas

- Abraham, J., Dowling, K., Florentine, S., 2017. Risk of post-fire metal mobilization into surface water resources: A review. *Science of the Total Environment* 599–600, 1740–1755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.096>
- Aceto, M., 2016. The Use of ICP-MS in Food Traceability, in: *Advances in Food Traceability Techniques and Technologies: Improving Quality Throughout the Food Chain*. Elsevier Ltd, pp. 137–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100310-7.00008-9>
- Achmad, R.T., Budiawan, Auerkari, E.I., 2017. Effects of Chromium on Human Body. *Annual Research and Review in Biology* 13, 1–8. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/33462>
- ATSDR, 2004. Toxicological Profile for Cobalt, ATSDR. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.1956.tb04795.x>
- Barwick, V., Bravo, P.P.M., Ellison, S.L.R., Engman, J., Gjengedal, E.L.F., Lund, U.O., Magnusson, B., Patriarca, M., Pohl, B., Roboucj, P., Sibbesen, L.P., Vanstapel, F., Vercruysee, I., Yialmaz, A., Omeroglu, P.Y., Ornemark, U., 2014. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, Second Edition. ed.
- Bodí, M.B., Martín, D.A., Balfour, V.N., Santín, C., Doerr, S.H., Pereira, P., Cerdà, A., Mataix-Solera, J., 2014. Wildland fire ash: Production, composition and eco-hydro-geomorphic effects. *Earth-Science Reviews* 130, 103–127. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2013.12.007>
- Bowman, D.M.J.S., Kolden, C.A., Abatzoglou, J.T., Johnston, F.H., van der Werf, G.R., Flannigan, M., 2020. Vegetation fires in the Anthropocene. *Nature Reviews Earth & Environment*. <https://doi.org/10.1038/s43017-020-0085-3>
- Campos, I., Abrantes, N., Keizer, J.J., Vale, C., Pereira, P., 2016. Major and trace elements in soils and ashes of eucalypt and pine forest plantations in Portugal following a wildfire. *Science of the Total Environment* 572, 1363–1376. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.190>
- EFSA, 2021a. Scientific report on the chronic dietary exposure to inorganic arsenic. *EFSA Journal* 19, 1–50. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6380>
- EFSA, 2021b. Chronic dietary exposure to inorganic arsenic. *EFSA Journal* 19, 1–50. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6380>
- EFSA, 2014a. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water. *EFSA Journal* 12, 1–261. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3595>
- EFSA, 2014b. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for chromium. *EFSA Journal* 12, 1–25. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3845>
- EFSA, 2014c. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *EFSA Journal* 12, 1–68. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3597>

EFSA, 2012. Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 10, 1–32. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2579>

EFSA, 2010a. Scientific Opinion on the safety of trivalent chromium as a nutrient added for nutritional purposes to foodstuffs for particular nutritional uses and foods intended for the general population (including food supplements). *EFSA Journal* 8, 1–46. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1882>

EFSA, 2010b. Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA Journal* 8, 1–151. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1570>

EFSA, 2009a. Scientific Opinion on the use of cobalt compounds as additives in animal nutrition. *EFSA Journal* 7, 1–45. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1383>

EFSA, 2009b. Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal* 7, 1–199. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1351>

EFSA, 2009c. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *EFSA Journal* 980, 1–139.

El-Kady, A.A., Abdel-Wahhab, M.A., 2018. Occurrence of trace metals in foodstuffs and their health impact. *Trends in Food Science and Technology* 75, 1–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.001>

Engwa, G.A., Ferdinand, P.U., Nwalo, F.N., Unachukwu, M.N., 2019. Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans, in: *Poisoning in the Modern World - New Tricks for an Old Dog?* pp. 1–23.

Földi, L., Kuti, R., 2016. Characteristics of Forest Fires and their Impact on the Environment. *Aarms* 15, 5–17.

García Alonso, J.I., Marchante-Gayón, J.M., Moldovan, M., 2015. New developments in food analysis by ICP-MS, in: *Handbook of Mineral Elements in Food*. pp. 239–262. <https://doi.org/10.1002/9781118654316.ch12>

Gonçalves, A.B., 2021. *Os Incêndios Florestais em Portugal*. Fundação Francisco Manuel dos Santos, Lisboa.

Gonçalves, A.C., Sousa, A.M.O., Sousa, A.M.O., 2017. The Fire in the Mediterranean Region: A Case Study of Forest Fires in Portugal, in: *Mediterranean Identities - Environment, Society, Culture*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69410>

Gueifão, S., Sequeira, C., Ribeiro, M., Moreira, T., Ventura, M., Rego, A., Castanheira, I., 2020. Análise de contaminantes inorgânicos em alimentos provenientes de áreas ardidas na região Centro de Portugal. *INSA* 1–6.

Gupta, N., Yadav, K.K., Kumar, V., Kumar, S., Chadd, R.P., Kumar, A., 2019. Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Science of the Total Environment* 651, 2927–2942. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.047>

IARC, 2012. A review of human carcinogens. Part C: Arsenic, metals, fibres and dusts., IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

IARC, 2006. Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium arsenide, Indium Phosphide, and Vanadium Pentoxide, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

IARC, 2004. Inorganic and Organic Lead Compounds, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

IARC, 1993. Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the glass manufacturing industry., IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

IARC, 1990. Chromium, Nickel and Welding., IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

ICNF, 2017a. 10o Relatório Provisório de Incêndios Florestais - 2017.

ICNF, 2017b. 8o Relatório Provisório de Incêndios Florestais - 2017.

IPMA, 2017. Condições Meteorológicas associadas ao Incêndio de Pedógrão Grande de 17 de Junho 2017.

Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167–182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>

Kim, H.-Y., 2015. Statistical notes for clinical researchers: A one-way repeated measures ANOVA for data with repeated observations. *Restorative Dentistry & Endodontics* 40, 91–95. <https://doi.org/10.5395/rde.2015.40.1.91>

Kim, J.H., Gibb, H.J., Howe, P.D., 2006. Cobalt and Inorganic Cobalt Compounds, World Health Organization.

Lazaridis, M., Latos, M., Aleksandropoulou, V., Hov, O., Papayannis, A., Tørseth, K., 2008. Contribution of forest fire emissions to atmospheric pollution in Greece. *Air Quality, Atmosphere and Health* 1, 143–158. <https://doi.org/10.1007/s11869-008-0020-0>

Lopes, C., Torres, D., Oliveira, A., Severo, M., Alarcão, V., Guiomar, S., Mota, J., Teixeira, P., Rodrigues, S., Lobato, L., Magalhães, V., Correia, D., Carvalho, C., Pizzaro, A., Marques, A., Vilela, S., Oliveira, L., Nicola, P., Soares, S., Ramos, E., 2018. National Food, Nutrition, and Physical Activity Survey of the Portuguese General Population 2015-2016: Summary of Results.

Mansilha, C., Melo, A., Martins, Z.E., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pereira, A.M., Marques, J.E., 2020. Wildfire Effects on Groundwater Quality from Springs Connected to Small Public Supply Systems in a Peri-Urban Forest Area (Braga region, NW Portugal). *Water (Switzerland)* 12, 1–16. <https://doi.org/10.3390/W12041146>

Manzoor, J., Sharma, M., Wani, K.A., 2018. Heavy metals in vegetables and their impact on the nutrient quality of vegetables: A review. *Journal of Plant Nutrition* 41, 1744–1763. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1462382>

Matos, A.S.B., 2016. Aplicação de Cartas de Controlo na análise de arsénio: Controlo da Qualidade Interno de Brancos.

Noël, L., Chekri, R., Millour, S., Vastel, C., Kadar, A., Sirot, V., Leblanc, J.C., Guérin, T., 2012. Li, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Se and Mo levels in foodstuffs from the Second French TDS. Food Chemistry 132, 1502–1513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.009>

Oliveira, M., Delerue-Matos, C., Pereira, M.C., Morais, S., 2020. Environmental Particulate Matter Levels during 2017 Large Forest Fires and Megafires in the Center Region of Portugal: A Public Health Concern? Environmental Research and Public Health 17, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031032>

Pereira, D.G., Afonso, A., Medeiros, F.M., 2015. Overview of Friedmans Test and Post-hoc Analysis. Communications in Statistics: Simulation and Computation 44, 2636–2653. <https://doi.org/10.1080/03610918.2014.931971>

PerkinElmer, 2004. The 30-minute Guide to ICP-MS, PerkinElmer. <https://doi.org/10.1016/j.pnucene.2012.01.005>

Rai, P.K., Lee, S.S., Zhang, M., Tsang, Y.F., Kim, K.H., 2019. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. Environment International 125, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>

Regulamento (UE) 2015/1006 da Comissão de 25 de junho de 2015 que altera o Regulamento (CE) no 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de arsénio na forma inorgânica nos géneros alimentícios, 2015. Jornal Oficial da União Europeia. <http://data.europa.eu/eli/reg/2015/1006/oj>

Regulamento (UE) 2021/1317 da Comissão de 9 de Agosto de 2021 que altera o Regulamento (CE) no 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de chumbo em certos géneros alimentícios, 2021. Jornal Oficial da União Europeia. <http://data.europa.eu/eli/reg/2021/1317/oj>

Regulamento (UE) 2021/1323 da comissão de 10 de agosto de 2021, 2021. Regulamento (UE) 2021/1323 da comissão de 10 de agosto de 2021 que altera o Regulamento (CE) n.o 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de cádmio em certos géneros alimentícios, 2021. Jornal Oficial da União Europeia. <http://data.europa.eu/eli/reg/2021/1323/oj>

RELACRE, 1996. Guia RELACRE 3 Validação de Resultados em Laboratórios Químicos.

Thomas, R., 2004. Practical guide to ICP-MS. M. Dekker.

Thompson, L.A., Darwish, W.S., 2019. Environmental Chemical Contaminants in Food: Review of a Global Problem. Journal of Toxicology 2019, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/2345283>

Turco, M., Jerez, S., Augusto, S., Tarín-Carrasco, P., Ratola, N., Jiménez-Guerrero, P., Trigo, R.M., 2019. Climate drivers of the 2017 devastating fires in Portugal, Scientific Reports. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50281-2>

Ventura, M., Cavaco, H., Delgado, I., Coelho, I., Gueifão, S., Martins, M., Costa, M.H., Matos, A., Castanheira, I., 2021. The occurrence of inorganic contaminants in ‘tronchuda’ cabbage (Brassica

oleracea L. var. costata DC.) after large forest fires in Portugal. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 1–18. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1893709>

Wilschefski, S., Baxter, M.R., 2019. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. Clinical Biochemical Review 40, 115–133. <https://doi.org/doi.org/10.33176/AACB-19-00024>

Anexos

Anexo 1 – Teor dos elementos químicos ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) analisados, por produtor, nas amostras de batata da 5ª colheita ($n=12$). Expresso pela média \pm SD. Teores superiores à literatura encontrada estão destacados pelo símbolo *.

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	54 \pm 4*	4,1 \pm 0,1	< LQ (1)	2,14 \pm 0,01	3,8 \pm 0,3
C	55 \pm 2*	5,4 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	16,8 \pm 0,2	4,2 \pm 0,3
D	55 \pm 4*	2,91 \pm 0,03	< LQ (1)	3,9 \pm 0,1	3,4 \pm 0,2
E	61 \pm 4*	16,1 \pm 0,2*	1,4 \pm 0,1	6,26 \pm 0,03	5,5 \pm 0,3
F	39 \pm 1*	6,7 \pm 0,1	< LQ (1)	8,0 \pm 0,2	3,0 \pm 0,2
G	47 \pm 2*	32,3 \pm 0,2*	< LQ (1)	2,58 \pm 0,03	3,9 \pm 0,1
H	43,5 \pm 0,2*	5,6 \pm 0,1	< LQ (1)	6,3 \pm 0,1	3,3 \pm 0,3
I	69 \pm 5*	2,71 \pm 0,06	2,57 \pm 0,03	2,7 \pm 0,1	4,6 \pm 0,4
L	63 \pm 4*	2,9 \pm 0,1	< LQ (2)	3,9 \pm 0,1	3,69 \pm 0,04
M	38 \pm 2*	6,6 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	< LQ (1)	3,8 \pm 0,2
N	34 \pm 2*	3,2 \pm 0,1	< LQ (2)	9,8 \pm 0,7	3,7 \pm 0,1
O	74 \pm 5*	< LQ (2)	2,5 \pm 0,1	2,51 \pm 0,02	3,7 \pm 0,3

Anexo 2 - Limite de Quantificação (LQ) obtido para os elementos químicos ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) analisados, por produtor, nas amostras de batata da 5ª colheita ($n = 12$).

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	2	1	1	1	2
C	3	2	2	2	3
D	3	1	1	1	3
E	3	1	1	1	3
F	2	1	1	1	2
G	2	1	1	1	2
H	3	1	1	1	3
I	3	2	2	2	3
L	3	2	2	2	3
M	2	1	1	1	2
N	3	1	1	1	3
O	3	2	2	2	3

Anexo 3 – Teor obtido dos elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco) nas amostras de cebola da 5ª colheita ($n = 5$). Expresso pela média \pm SD. Teores superiores à literatura encontrada estão destacados pelo símbolo *.

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	$31,2 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	< LQ (3)
B	26 ± 2	$1,6 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,1$	$1,29 \pm 0,03$	< LQ (3)
I	19 ± 1	$1,92 \pm 0,03$	$3,2 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,1$	< LQ (2)
L	25 ± 2	$3,55 \pm 0,04$	$2,1 \pm 0,2$	$12,1 \pm 0,3^*$	< LQ (3)
P	26 ± 1	$1,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$2,82 \pm 0,04$	< LQ (3)

Anexo 4 - Limite de Quantificação (LQ) obtido para os elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de cebola da 5ª colheita ($n = 5$).

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	9	1	1	1	3
B	7	1	1	1	3
I	7	1	1	1	3
L	8	1	1	1	3
P	9	1	1	1	4

Anexo 5 – Teor obtido dos elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de couve da 5ª colheita ($n = 15$). Expresso pela média \pm SD. Teores superiores à literatura encontrada estão destacados pelo símbolo *.

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	$65 \pm 4^*$	$10,5 \pm 0,1^*$	$31 \pm 2^*$	17 ± 2	$9,2 \pm 0,3$
B	$42 \pm 2^*$	$13 \pm 1^*$	$20 \pm 1^*$	$3,4 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,2$
C	29 ± 2	$5,6 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,1$	< LQ (3)
D	35 ± 1	$12,4 \pm 0,4^*$	8 ± 1	$3,01 \pm 0,04$	$5,3 \pm 0,4$
E	33 ± 1	$8,18 \pm 0,04^*$	8 ± 1	$6,3 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$
F	$43 \pm 2^*$	$37,3 \pm 0,3^*$	$18 \pm 2^*$	$8,0 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,3$
G	$38,5 \pm 0,3^*$	$16,1 \pm 0,4^*$	$14,4 \pm 0,3^*$	$6,8 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,1$
H	$45 \pm 3^*$	$107 \pm 1^*$	$13 \pm 1^*$	$3,8 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$
I	$43 \pm 3^*$	$5,7 \pm 0,4$	10 ± 1	14 ± 1	$5,6 \pm 0,3$
J	27 ± 2	$2,68 \pm 0,02$	6 ± 1	$0,35 \pm 0,02$	$4,2 \pm 0,2$
L	$38 \pm 1^*$	$5,7 \pm 0,2$	$8,7 \pm 0,2$	$7,01 \pm 0,02$	$5,38 \pm 0,02$
M	35 ± 3	$12,2 \pm 0,2^*$	$9,6 \pm 0,4$	$5,36 \pm 0,03$	$7,5 \pm 0,4$
N	$38 \pm 2^*$	$5,3 \pm 0,1$	$15 \pm 1^*$	$5,0 \pm 0,2$	8 ± 1
O	$43 \pm 3^*$	$5,0 \pm 0,2$	$14 \pm 1^*$	< LQ (1)	$7,7 \pm 0,4$
P	$45 \pm 4^*$	$6,5 \pm 0,1^*$	$5,0 \pm 0,3$	$2,28 \pm 0,04$	$4,1 \pm 0,3$

Anexo 6 - Limite de Quantificação (LQ) obtido para os elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de couve da 5ª colheita (n = 15).

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	3	2	2	2	3
B	3	2	2	2	3
C	3	1	1	1	3
D	3	1	1	1	3
E	3	1	1	1	3
F	3	2	2	2	3
G	3	2	2	2	3
H	3	2	2	2	3
I	3	1	1	1	3
J	3	1	1	1	3
L	3	1	1	1	3
M	3	2	2	2	3
N	3	2	2	2	3
O	3	1	1	1	3
P	9	1	1	1	4

Anexo 7 – Teor obtido dos elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de couve da 6ª colheita ($n = 12$). Expresso pela média \pm SD. Teores superiores à literatura encontrada estão destacados pelo símbolo *.

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	$36 \pm 2^*$	$10,4 \pm 0,2^*$	$20 \pm 1^*$	$7,1 \pm 0,2$	6 ± 1
C	$39 \pm 1^*$	$6,8 \pm 0,1^*$	$5,1 \pm 0,1$	$7,13 \pm 0,03$	$3,26 \pm 0,03$
D	$41 \pm 1^*$	$15,5 \pm 0,2^*$	$13,3 \pm 0,3^*$	$5,21 \pm 0,03$	$5,3 \pm 0,2$
E	$42 \pm 2^*$	$11,5 \pm 0,1^*$	$3,3 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$
F	28 ± 2	$9,4 \pm 0,2^*$	$11 \pm 1^*$	$11,5 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,2$
G	$65 \pm 3^*$	$20 \pm 1^*$	$11,1 \pm 0,3^*$	$3,8 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$
H	28 ± 1	$5,8 \pm 0,1$	$11,6 \pm 0,3^*$	$5,53 \pm 0,02$	$5,0 \pm 0,1$
I	37 ± 3	$16 \pm 1^*$	$18 \pm 1^*$	$5,9 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,3$
J	43 ± 2	$3,7 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,2^*$	$3,3 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,4$
L	32 ± 3	$4,32 \pm 0,02$	$5,6 \pm 0,3$	$1,73 \pm 0,04$	$4,4 \pm 0,3$
N	38 ± 2	$4,6 \pm 0,1$	$12,2 \pm 0,2^*$	$3,8 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,3$
P	34 ± 1	$5,5 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,3$	$1,59 \pm 0,01$	$4,6 \pm 0,3$

Anexo 8 - Limite de Quantificação (LQ) obtido para os elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de couve da 6ª colheita ($n = 12$).

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	2	1	1	1	2
C	3	1	1	1	3
D	3	1	1	1	3
E	3	1	1	1	3
F	2	1	1	1	2
G	2	1	1	1	2
H	2	1	1	1	2
I	2	1	1	1	2
J	3	2	2	2	3
L	2	1	1	1	2
N	3	1	1	1	3
P	3	2	2	2	3

Anexo 9 – Teor obtido dos elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de ovo da 5ª colheita ($n = 12$). Expresso pela média \pm SD. Teores superiores à literatura encontrada estão destacados pelo símbolo *.

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco					
A	$97 \pm 3^*$	$3,7 \pm 0,2$	8 ± 1	< LQ (3)	$7,9 \pm 0,3$
C	$93 \pm 4^*$	< LQ (3)	$7,4 \pm 0,4$	< LQ (3)	< LQ (5)
D	$83 \pm 1^*$	$3,5 \pm 0,1$	11 ± 1	< LQ (3)	< LQ (5)
E	$108 \pm 4^*$	$4,52 \pm 0,01$	11 ± 1	< LQ (3)	$7,2 \pm 0,1$
F	$90 \pm 1^*$	< LQ (3)	$6,5 \pm 0,3$	< LQ (3)	$6,2 \pm 0,3$
H	$77 \pm 1^*$	< LQ (2)	9 ± 1	< LQ (3)	$80 \pm 1^*$
I	$83 \pm 3^*$	$2,8 \pm 0,1$	9 ± 1	< LQ (3)	$37 \pm 1^*$
J	$84 \pm 1^*$	$2,8 \pm 0,1$	$9,8 \pm 0,4$	< LQ (3)	$5,2 \pm 0,3$
L	$86 \pm 3^*$	$3,0 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,3$	< LQ (3)	< LQ (6)
M	$86 \pm 2^*$	< LQ (2)	$9,6 \pm 0,4$	< LQ (2)	$6,5 \pm 0,3$
N	$81 \pm 1^*$	$3,1 \pm 0,2$	8 ± 1	< LQ (2)	< LQ (5)
P	$84 \pm 1^*$	< LQ (3)	7 ± 1	< LQ (3)	< LQ (5)

Anexo 10 - Limite de Quantificação (LQ) obtido para os elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de ovo da 5ª colheita (n =12).

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	6	3	3	3	6
C	5	3	3	3	5
D	5	3	3	3	5
E	5	3	3	3	5
F	6	3	3	3	6
H	5	2	2	2	5
I	5	3	3	3	5
J	5	3	3	3	5
L	6	3	3	3	6
M	5	2	2	2	5
N	5	2	2	2	5
P	5	3	3	3	5

Anexo 11 – Teor obtido dos elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de ovo da 6ª colheita ($n = 4$). Expresso pela média \pm SD. Teores superiores à literatura encontrada estão destacados pelo símbolo *.

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	$76 \pm 2^*$	$3,5 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,3$	< LQ (3)	< LQ (8)
F	$77 \pm 6^*$	< LQ (3)	$3,9 \pm 0,1$	< LQ (3)	< LQ (8)
G	$82 \pm 5^*$	$3,6 \pm 0,1$	$12 \pm 1^*$	< LQ (3)	< LQ (8)
H	$74 \pm 8^*$	$3,3 \pm 0,1$	$11,0 \pm 1,1$	< LQ (2)	< LQ (7)

Anexo 12 - Limite de Quantificação (LQ) obtido para os elementos químicos analisados ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco), por produtor, nas amostras de ovo da 6ª colheita ($n = 4$).

Produtor	Cr	Co	As	Cd	Pb
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco				
A	5	3	3	3	8
F	5	3	3	3	8
G	5	3	3	3	8
H	5	2	2	2	7