



# Observações

— Boletim Epidemiológico

## sumário

### Editorial

- O Departamento de Saúde Ambiental em relevo no quadro das funções essenciais do INSA** p03  
*Highlighting the Department of Environmental Health in the framework of essential functions of INSA*  
Helena Rebelo

### Artigos breves

#### Ambiente e saúde

- 1\_ Novos valores-guia da Organização Mundial de Saúde para cianotoxinas em águas para consumo humano e balneares** p05  
*New World Health Organisation cyanotoxin guideline values for drinking and recreational waters*  
Elsa Dias, Tânia Rosado, Carina Menezes
- 2\_ As novas guidelines da Organização Mundial de Saúde para águas balneares, a qualidade das areias e a Bandeira Azul: que impacto esperar da monitorização dos fungos?** p15  
*The new World Health Organisation guidelines on recreational water quality, sand quality and the Blue Flag: what to expect from fungal monitoring?*  
João Brandão, Konstantina Sarioglou, Susana Silva, Helena Rebelo
- 3\_ Detecção de vírus entéricos por real-time RT-qPCR em águas superficiais, subterrâneas, de consumo e águas residuais** p19  
*Real-time RT-qPCR detection of enteric viruses in superficial, underground, drinking waters and wastewater sources*  
Pedro Teixeira, Filipa Costa Ferreira, Raquel Rodrigues, Elisabete Valério
- 4\_ Monitorização de trihalometanos e halocetonas em amostras de água** p24  
*Monitoring of trihalomethanes and haloketones in water samples*  
Sílvia S. José, Helena Rebelo
- 5\_ Exposição profissional a benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), entre 2015-2020** p28  
*Occupational exposure to benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX), between 2015 and 2020*  
Ana Filipa Pires, Aida Pais, Tiago Faria, Sílvia Santos, Anabela Oliveira, Joana Amado, Herminia Pinhal, Ana Nogueira

#### Alimentação e nutrição

- 6\_ Contributo da dieta vegetariana para o aporte mineral no adulto** p34  
*Contribution of vegetarian diet to mineral intake in adults*  
Rita Bárbara, Dina Ribeiro, Adriana Costa, Nelson Tavares, Marta Ventura, Ana Cláudia Nascimento, Isabel Castanheira, Ana Rito, Mariana Santos, Susana Santiago
- 7\_ Exposição do trato gastrointestinal à aflatoxina B<sub>1</sub>: um impacto negligenciado?** p39  
*Exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> in the gastrointestinal tract: an overlooked impact?*  
Inês Serrenho, Ricardo Assunção, Paula Alvito
- 8\_ Vigilância da qualidade nutricional de refeições hospitalares, entre 2017 e 2019** p46  
*Surveillance of the nutritional quality of hospital meals, between 2017 and 2019*  
Ana Cristina Bento, Filipa Matias, Tânia Fontes, Maria João Pires, Ana Cláudia Nascimento, Susana Santiago, Mariana Santos, Isabel Castanheira

#### Doenças oncológicas

- 9\_ A inflamação intestinal como promotor da tumorigénese: pistas sobre a base molecular envolvida** p52  
*Intestinal inflammation promotes tumorigenesis: clues on the underlying molecular basis*  
Joana F. S. Pereira, Cláudia Bessa, Paulo Matos, Peter Jordan

#### Medicina personalizada

- 10\_ Aplicação de métodos de aprendizagem automática em grafos de conhecimento para medicina personalizada** p57  
*Application of machine learning methods for knowledge graphs to personalized medicine*  
Joana Vilela, Muhammad Asif, Ana Rita Marques, João Xavier Santos, Célia Rasga, Astrid Vicente, Hugo Martiniano





### Acidentes e lesões

#### 11\_ Acidentes domésticos e de lazer ocorridos em pessoas com 65 e mais anos durante a pandemia da COVID-19: comparação entre 2019 e 2020 p.62

*Home and leisure accidents in people aged 65 and over during the COVID-19 pandemic: comparison between 2019 and 2020*

*Tatiana Alves, Emanuel Rodrigues, Mariana Neto, Ricardo Mexia, Carlos Matias Dias*

## O Departamento de Saúde Ambiental em relevo no quadro das funções essenciais do INSA

### *Highlighting the Department of Environmental Health in the framework of essential functions of INSA*

Para a prossecução das suas atribuições, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) está organizado em departamentos técnico-científicos onde são desenvolvidas atividades de investigação e desenvolvimento em ciências da saúde, de referência e garantia da qualidade analítica, de observação do estado de saúde da população, de prestação de serviços diferenciados, de formação de quadros técnicos e de difusão da cultura científica.

Este trigésimo número da segunda edição do *Boletim Epidemiológico Observações* publicado pelo INSA, reúne cinco artigos elaborados por técnicos e investigadores do Departamento de Saúde Ambiental (DSA) que traduzem em larga escala o âmbito de atuação deste departamento enquadrado nas funções essenciais do INSA.

A sua ação visa fundamentalmente a monitorização e controlo da qualidade da água, nas suas diversas utilizações, bem como dos locais de trabalho e condições laborais com vista à identificação de situações capazes de colocarem em risco a saúde dos trabalhadores ou ocupantes de espaços interiores. Estes propósitos abrangem a obtenção e o fornecimento de evidência científica de suporte à decisão técnica e política, no âmbito da proteção da saúde pública. Para o efeito, o DSA mantém uma estreita colaboração com todos os profissionais e autoridades de saúde, assim como com a população em geral.

No âmbito da divulgação da cultura científica, o artigo relativo a “Novos valores-guia da OMS para cianotoxinas em águas para consumo humano e balneares” atualiza o conhecimento a respeito da ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas em águas de consumo e balneares de acordo com

o novo guia técnico-científico da Organização Mundial de Saúde (OMS) *Toxic Cyanobacteria in Water – a guide to their public health consequences, monitoring and management*, contribuindo assim para a difusão do saber nesta área técnica.

O artigo relativo à importância dos fungos na avaliação da qualidade das areias à luz das novas *guidelines* da OMS para águas balneares é um feliz exemplo da importância do laboratório na produção de informação e conhecimento de suporte à decisão em saúde pública, no caso, a implementação de medidas tendentes a melhorar a contaminação fecal das areias e águas balneares e a aplicação do novo critério da OMS, relativamente à presença de fungos nas areias das praias, para atribuição do galardão da Associação Bandeira Azul da Europa.

No âmbito da função referência, destaca-se o artigo “Detecção de vírus entéricos por *real-time* PCR em águas superficiais, subterrâneas, de consumo e águas residuais” que ilustra uma importante aplicação da metodologia de RT-PCR quantitativo em tempo real, em oposição aos tradicionais indicadores de contaminação fecal, na avaliação de riscos para a saúde associados à presença de agentes patogénicos (norovírus genogrupos I e II), nomeadamente em águas residuais sujeitas a tratamento terciário para reutilização.

Considerando a toxicidade associada à formação de subprodutos da desinfecção da água, é publicado um artigo que ilustra o trabalho desenvolvido no âmbito da investigação aplicada. Neste artigo apresentam-se os resultados obtidos do estudo da presença de trihalometanos e halocetonas em águas de consumo humano e tanques recreativos, salientando-se a importância da avaliação do risco para a saúde decorrente da exposição a estes compostos.

Neste número do Boletim fica também patente o trabalho do DSA no âmbito da prestação diferenciada de serviços através do artigo relativo ao estudo da exposição profissional aos hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX). Pelas suas propriedades tóxicas, é da maior importância a monitorização destes compostos



em espaços laborais para proteção dos trabalhadores no desenvolvimento das suas atividades profissionais.

Com uma equipa motivada, qualificada e em constante atualização, o Departamento de Saúde Ambiental cumpre com empenho e prontidão as suas atribuições com foco na saúde, segurança e bem-estar dos portugueses.

### Helena Rebelo

*Farmacêutica, Coordenadora do  
Departamento de Saúde Ambiental do INSA*

## \_Novos valores-guia da Organização Mundial de Saúde para cianotoxinas em águas para consumo humano e balneares

### *New World Health Organisation cyanotoxin guideline values for drinking and recreational waters*

Elsa Dias, Tânia Rosado, Carina Menezes

[elsa.dias@insa.min-saude.pt](mailto:elsa.dias@insa.min-saude.pt)

Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

#### \_Resumo

As cianobactérias são organismos procariotas fotoautotróficos, presentes numa variedade de habitats, designadamente nas águas doces superficiais. Sendo produtores primários, são essenciais nos ecossistemas, uma vez que estão na base da cadeia trófica e são uma das principais fontes de oxigénio. No entanto, produzem compostos tóxicos (cianotoxinas) que constituem um risco para a saúde pública, sendo a principal via de exposição humana a estas toxinas a ingestão de água contaminada. A legislação comunitária e nacional regulamenta o teor de cianotoxinas em água de consumo humano e em águas balneares, contemplando a microcistina-LR. Não obstante a evolução do conhecimento acerca das cianotoxinas, quer em termos toxicológicos, quer em termos analíticos, existem ainda muitas lacunas que não permitem elaborar legislação que abranja todos os tipos de cianotoxinas, pelo que a monitorização das massas de água está circunscrita às toxinas mais conhecidas e estudadas – as microcistinas. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde procedeu a uma atualização dos valores-guia de cianotoxinas (incluindo cilindropermopsina, anatoxina e saxitoxina) para águas de consumo humano e balneares. Neste artigo apresentaremos um resumo destas novas orientações e discutiremos a sua relevância para o conhecimento e monitorização de cianobactérias tóxicas em águas doces superficiais nacionais.

#### \_Abstract

*Cyanobacteria are photoautotrophic prokaryotic organisms that live in diverse habitats, namely superficial water bodies. As primary producers, they constitute the basis of the food chain and play a primary role in oxygen production. However, they have also the ability to produce toxins (cyanotoxins) that pose a major threat to Public Health. The main route of exposure in humans is the ingestion of contaminated water. Implementation of European and national legislation has regulated the concentration of cyanotoxins in drinking and recreational waters, specifically of microcystin-LR. Regardless of the knowledge evolution concerning cyanotoxins, whether toxicological or analytic, there are still scientific gaps that impair the establishment of legislation that cover all toxin types. Water monitoring is therefore limited to the most common toxins, microcystins. Recently WHO has elaborated an update of the guidelines for cyanotoxins (including other toxins such as cylindrospermopsis, anatoxin and saxitoxin) in drinking and recreational waters. In this paper, we present a summary of these new guidelines and discuss their relevance for the knowledge and monitoring of toxic cyanobacteria in national superficial waters.*

#### \_Introdução

As cianobactérias são organismos procariotas fotoautotróficos, presentes numa variedade de habitats, designadamente nas águas doces superficiais. Sendo produtores primários, são essenciais nos ecossistemas, uma vez que estão na base da cadeia trófica e são uma das principais fontes de oxigénio. No entanto, produzem compostos tóxicos (cianotoxinas) que constituem um risco para a saúde pública, sendo a principal via de exposição humana a estas toxinas a ingestão de água contaminada.

A legislação comunitária e nacional regulamenta o teor de cianotoxinas em água de consumo humano e em águas balneares, contemplando a microcistina-LR. Não obstante a evolução do conhecimento acerca das cianotoxinas, quer em termos toxicológicos, quer em termos analíticos, existem ainda muitas lacunas que não permitem elaborar legislação que abranja todos os tipos de cianotoxinas, pelo que a monitorização das massas de água está circunscrita às toxinas mais conhecidas e estudadas – as microcistinas. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde procedeu a uma atualização dos valores-guia de cianotoxinas (incluindo cilindropermopsina, anatoxina e saxitoxina) para águas de consumo humano e balneares.

#### \_Objetivo

Neste artigo apresentamos um resumo das novas orientações da Organização Mundial da Saúde relativas a cianotoxinas e discutimos a sua relevância para o conhecimento e monitorização de cianobactérias tóxicas em águas doces superficiais nacionais.



## Ocorrência de cianobactérias tóxicas em águas doces superficiais

Os recursos de água doce superficial nacionais são largamente usados para a produção de energia, irrigação, atividades recreativas e balneares, sendo fonte de água para consumo humano para cerca de 60% da população portuguesa (1,2). Uma proporção significativa desses recursos são reservatórios artificiais derivados de rios, tais como barragens e albufeiras. Essas barreiras artificiais alteram o fluxo natural dos rios e criam corpos de água lânticos que são vulneráveis à eutrofização (1). De notar que, cerca de 42% das albufeiras portuguesas estão eutrofizadas e muitas outras apresentam sinais de progressiva degradação do estado trófico (2). A eutrofização favorece a proliferação massiva de cianobactérias (3), fenómeno conhecido como *bloom*. As alterações climáticas, designadamente o aumento global da temperatura e a seca, também são fatores que contribuem para o agravamento deste fenómeno (4).

Os *blooms* cianobacterianos têm impactos ambientais negativos tais como a desoxigenação da água, a mortalidade de peixes por anoxia ou asfixia e a alteração da composição e diversidade da comunidade fitoplanctónica. Por outro lado, causam a alteração das características organolépticas da água devido à produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) como a geosmina e o 2-Metilisoborneol (2-MIB) (5). Embora estes compostos sejam geralmente considerados como não tóxicos, a sua presença altera a perceção de segurança das populações relativamente à qualidade da água. No entanto, a característica mais negativa dos *blooms* é a capacidade das cianobactérias produzirem toxinas, o que acarreta riscos para a saúde humana e animal. A exposição a estas toxinas pode ocorrer através da ingestão de água para consumo indevidamente tratada ou da ingestão acidental de água bruta durante atividades recreativas, desportivas ou ocupacionais nas massas de água superficiais.

As cianotoxinas mais comuns a nível global são as microcistinas (hepatotoxinas potencialmente cancerígenas) (6). Em Portugal também ocorrem esporadicamente neurotoxinas, especificamente saxitoxina e derivados (7) e anatoxina-a (9).

Até à data, apenas foi registada uma ocorrência de cilindrospermopsina (citotoxina e genotoxina) (10).

A ocorrência de *blooms* cianobacterianos em águas doces superficiais portuguesas é frequente, estando muitas vezes associados a estirpes tóxicas, pelo que a monitorização de cianobactérias e cianotoxinas é uma questão relevante para a saúde pública (11). A monitorização destas ocorrências garante, não só, o controlo da qualidade da água, prevenindo riscos para a saúde, como também contribui para a implementação de medidas que visam reduzir os custos associados ao seu tratamento. O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) assegura desde 1996 a monitorização de cianobactérias e toxinas associadas em albufeiras nacionais, mantendo uma coleção de culturas de cianobactérias (Estela Sousa e Silva Algae Culture Collection – ESSACC) com estirpes isoladas de albufeiras nacionais, usadas em trabalhos de investigação.

## Avaliação do risco de exposição humana a cianotoxinas

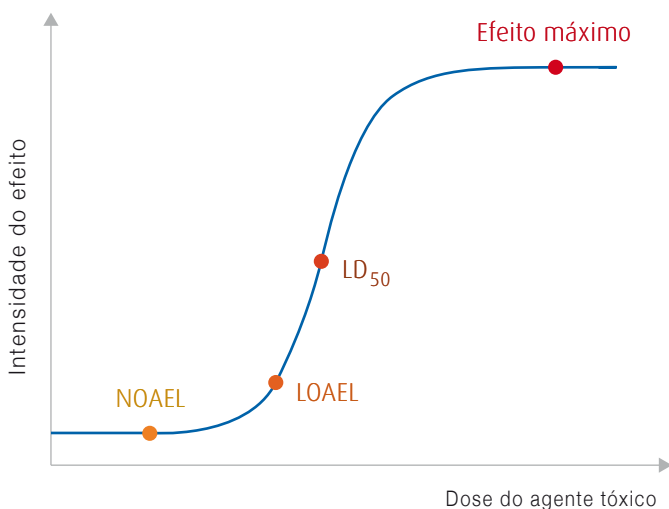
A avaliação do risco associado a cianotoxinas não é simples, pois embora a perigosidade destas toxinas esteja identificada, o risco que acarretam não é fácil de caracterizar e quantificar. Os efeitos causados pelas cianotoxinas são comuns a muitas patologias, pelo que é difícil estabelecer uma relação causa-efeito entre a exposição a água contaminada e a sintomatologia respetiva. Efetivamente, os dados epidemiológicos são escassos, e muitas vezes inconclusivos, e a ocorrência no meio hídrico estará provavelmente subavaliada, devido, também, a limitações analíticas. Por outro lado, não obstante a evolução do conhecimento da toxicologia destes compostos, desconhecem-se ainda mecanismos de ação e efeitos de muitas cianotoxinas (toxicodinâmica), bem como a forma como são absorvidas, distribuídas, metabolizadas e eliminadas (toxicocinética) pelo organismo. Por outro lado, está ainda pouco estudado o efeito das misturas de cianotoxinas, que muitas vezes coocorrem nas massas de água, uma vez que estirpes cianobacterianas da mesma espécie ou de espécies diferentes, produtoras de diferentes cianotoxinas, podem coexistir no mesmo *bloom*.



artigos breves\_ n. 1

A avaliação do risco de exposição a cianotoxinas constitui, tal como para outros contaminantes e agentes tóxicos (12), um processo de análise faseado e que implica: i) identificação dos perigos associados às toxinas [informação toxicológica e epidemiológica que permite associar as toxinas a efeitos nocivos, ou seja, estabelecer a relação causa-efeito, e estimar a Dose Diária Aceitável (DDA)]; ii) a caracterização da relação dose-resposta [medida do efeito adverso em função da concentração do agente]; iii) avaliação da exposição às toxinas [identificação das vias e dose de exposição e determinação da Dose Diária Ingerida (DDI)]. A comparação entre a DDA e a DDI permite determinar o nível de risco para a saúde decorrente da exposição humana às toxinas através da água de consumo ou banhar e, conseqüentemente, adotar as medidas de gestão dos recursos hídricos adequadas à salvaguarda da Saúde Pública. Se o valor da DDI exceder o valor da DDA existe risco de exposição ao agente tóxico. A DDA é determinada através de parâmetros toxicológicos que fornecem indicação sobre a relação entre a dose do agente e a resposta do organismo, designadamente o NOAEL (dose máxima que não causa efeito) ou o LOAEL (dose mínima que causa efeito) (figura 1).

Figura 1: Relação dose-resposta do agente tóxico.



NOAEL – No Observed Adverse Effect Level; LOAEL – Lowest Observed Adverse Effect Level; LD<sub>50</sub> – Dose letal para 50% dos animais testados

### Valores-guia para cianotoxinas

Não havendo informação suficiente para estabelecer valores paramétricos de referência (regulamentares) para as cianotoxinas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu, em 1998, um Valor-Guia (VG) provisório para as microcistinas em água para consumo humano (13). Nessa altura apenas foi estabelecido um VG para estas cianotoxinas, por serem consideradas as mais comuns e sobre as quais havia mais informação epidemiológica e toxicológica. Este VG foi adotado como valor paramétrico na legislação de muitos países, como se exemplifica na tabela 1. No caso de alguns países, como o Brasil, a Austrália e a Nova Zelândia, foram também estabelecidos valores de referência para outras cianotoxinas (tabela 1), atendendo à sua ocorrência frequente e à sua associação a episódios de intoxicação humana e animal.

O Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto, transposto da Diretiva 98/83/CE do Conselho Europeu de 3 de novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, estabelece o valor paramétrico de 1 µg/L para a microcistina-LR na água tratada colhida à saída da Estação de Tratamento. Porém, a legislação nacional não contempla valores paramétricos para outras cianotoxinas. Conseqüentemente, algumas destas cianotoxinas não são incluídas nos planos de monitorização, pelo que estarão certamente subestimadas. De referir, no entanto, que algumas entidades distribuidoras/gestoras de água para consumo humano estão sensibilizadas para o potencial tóxico das cianobactérias, pelo que, para além de microcistinas, também procedem à análise de outras cianotoxinas, para as quais ainda não foi estabelecido qualquer valor paramétrico. Coloca-se então a questão: Qual o significado do resultado e como proceder perante um resultado positivo? O estabelecimento de novos VG, para o maior número possível de cianotoxinas, ajuda a responder a esta questão, visto que constituem limites orientadores para a tomada de decisão sobre medidas preventivas, de remediação e de gestão do risco, por parte das entidades envolvidas na gestão da qualidade da água, de acordo com os sistemas de alerta de cianobactérias.



Tabela 1: ↓ Valores de referência para cianotoxinas em águas para consumo humano adotados em diferentes países (14-18).

País	Toxina	VG
África do Sul	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VG)
	STX	n.d.
Austrália	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	1 µg/L (*)
	MC	1,3 µg/L (VG)
	STX	3 µg/L (*)
Brasil	ATX-a	n.d.
	CYL	15 µg/L (VG)
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VP)
	STX	3 µg/L (VG)
Canadá	ATX-a	3,7 µg/L (Quebec, CMAP)
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1,5 µg/L (CMA)
	STX	n.d.
Espanha	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VP)
	STX	n.d.
Finlândia	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	>1 µg/L (RA) e >10 µg/L (PA)
	STX	n.d.
França	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VP)
	STX	n.d.

País	Toxina	VG
Nova Zelândia	ATX-a	1 µg/L (VMP)
	CYL	1 µg/L (VMP)
	NOD	n.d.
	MC	1,3 µg/L (VMP)
	STX	3 µg/L (VMP)
Portugal	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VP; DL 306/2007)
	STX	n.d.
República Checa	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VP)
	STX	n.d.
Singapura	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VP)
	STX	n.d.
Turquia	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VP)
	STX	n.d.
Uruguai	ATX-a	n.d.
	CYL	n.d.
	NOD	n.d.
	MC	1 µg/L (VP)
	STX	n.d.

VG – Valor-guia; VP – Valor-padrão; CMAP – Concentração máxima aceitável provisória; CMA – Concentração máxima aceitável; RA – Restrições ao uso de água; PA - Proibição do uso de água; VMP – Valor máximo provisório; \* – Valor indicativo baseado nos efeitos sobre a saúde; n.d. – não definido



artigos breves\_ n. 1

Os novos VG vêm, também, colmatar lacunas relativamente à água destinada a atividades recreativas e balneares, uma vez que não tinha sido estabelecido previamente qualquer VG para cianotoxinas nesse meio de exposição. A legislação portuguesa (Decreto-Lei n.º 113/2012 de 23 de maio; Decreto-Lei n.º 135/2009 de 3 de junho), transposta da Diretiva 2006/7/CE do Parlamento e do Conselho Europeus de 15 de fevereiro de 2006, relativa à qualidade das águas balneares, apenas recomenda a monitorização das massas de água quando for detetado visualmente o potencial para a formação de *blooms*. Neste caso, é da responsabilidade do delegado de saúde local proceder à identificação de riscos para a saúde, competindo às autoridades de saúde e do ambiente gerir o risco e prevenir a exposição às toxinas.

Passados cerca de 20 anos do estabelecimento do VG para as microcistinas, e face à tendência crescente de ocorrência de *blooms* cianobacterianos tóxicos e de episódios de intoxicação por cianotoxinas, a OMS propôs novos VG provisórios para várias cianotoxinas, considerando diferentes cenários de exposição humana a estes compostos.

Os VG são calculados a partir da DDA (19-22), tendo em conta a sua alocação a diferentes vias de exposição. Espera-se que a exposição às cianotoxinas através das possíveis vias, ao longo da vida dos indivíduos, não acarrete risco para a sua saúde. Ou seja, o VG fornece informação quantitativa para o processo de avaliação de risco que, por sua vez, permitirá gerir o risco de forma a proteger a saúde humana.

O VG das cianotoxinas é calculado de acordo com a seguinte fórmula (19-22):

$$VG = \frac{DDA * pc * fa}{c}, \text{ em que } DDA = \frac{NOAEL \text{ ou } LOAEL}{fi}$$

DDA – dose diária aceitável ( $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{pc}}/\text{dia}$ );

pc – peso corporal (60 kg para adultos; 5 Kg/15 Kg para bebés/crianças);

fa – fator de alocação (Apenas usado no caso de águas para consumo humano. Considera-se, no caso da exposição crónica, que 80% da exposição ocorre através da ingestão de água, sendo as outras fontes, como ar, alimentos e solo, consideradas pouco significativas. No caso da exposição aguda, considera-se que a exposição é alocada 100% à água contaminada. Assim, fa é 0,8 ou 1, respetivamente);

c – Consumo diário de água (2 L para adultos; 0,25 L/0,75 L para bebés/crianças);

NOAEL – Dose máxima que não causa efeito nocivo (*no observed adverse effect level*) ( $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{pc}}$ );

LOAEL – Dose mínima que causa efeito nocivo (*lowest observed adverse effect level*) ( $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{pc}}$ );

fi – fatores de incerteza (10 para variações interespécies, 10 para variações intraespécie, 10 para a limitação de informação sobre toxicidade crónica, 3 para limitação de dados).

O cálculo do VG das microcistinas baseou-se num valor de NOAEL de 40  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{pc}}$  por dia, valor obtido através de um estudo em murganhos (23). No caso da cilindrospermopsina, usou-se um valor de NOAEL de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{pc}}$  por dia, também obtido num estudo com murganhos (24). O VG foi determinado para vários tipos de exposição. Assim, foram determinados o VG<sub>crónico</sub> e o VG<sub>agudo</sub> para água de consumo humano, correspondendo a uma exposição a longo termo e a curto termo, respetivamente. O cálculo destes valores difere, basicamente, nos fatores de incerteza. No caso do VG<sub>crónico</sub>, usou-se um fator de incerteza de 1000, de forma a contemplar as variações inter e intra espécies e a limitação de informação sobre toxicidade crónica (19,20). No caso do VG<sub>agudo</sub> para as microcistinas, usou-se um fator de incerteza de 100, correspondendo às variações inter e intra espécies (19). Em relação ao VG<sub>agudo</sub> da cilindrospermopsina, usou-se um fator de incerteza de 300, correspondendo às variações intra e inter espécies e às limitações de dados (tabela 2) (20). Por outro lado, foi também estabe-



artigos breves\_ n. 1

lecido o VG<sub>rec</sub>, correspondendo à exposição por ingestão de água durante atividades recreativas em massas de água superficiais. Neste caso, o cálculo do VG baseou-se num cenário de exposição de crianças (15 Kg) às toxinas, através de ingestão acidental (0,25 L) de água bruta contaminada (tabela 2) (19,20).

À luz do conhecimento atual não é possível determinar um VG<sub>crónico</sub> para a saxitoxina, uma vez que não há evidência de efeitos nocivos decorrentes da exposição continuada a este grupo de toxinas (21). O VG<sub>agudo</sub> foi determinado com base no LOAEL de 1,5 µg STX<sub>eq</sub>/kg<sub>pc</sub>, de acordo com dados epidemiológicos referentes a casos de intoxicação humana com bivalves contaminados com este grupo de toxinas (25). Porém, e contrariamente às outras cianotoxinas, o VG foi derivado para bebés (5 Kg), considerando que são o sub-grupo mais sensível da população, podendo estar expostos através da alimentação por biberão (0,75 L), e atendendo a que a margem de segurança poderia ser muito baixa (21).

Neste caso aplicou-se um fator de incerteza de 3, por se usar o LOAEL em vez do NOAEL. O cálculo do VG<sub>rec</sub> para a saxitoxina foi determinado com base na exposição de crianças, tal como no caso da microcistina e da cilindrospermopsina (tabela 2) (21).

A informação toxicológica disponível sobre a anatoxina-a não permite calcular um valor de NOAEL ou LOAEL, nem avaliar a exposição, de forma a calcular um VG<sub>crónico</sub>, VG<sub>agudo</sub> e VG<sub>rec</sub> (22). De facto, os estudos de toxicidade aguda em animais induziram a morte dos indivíduos testados e os estudos de toxicidade subcrónica não permitiu identificar uma dose não letal mas com efeitos adversos duradouros (22). Porém, assumindo um resultado inconclusivo de um dos estudos em animais, poderá considerar-se um valor de NOAEL de 98 µg/kg<sub>pc</sub> por dia, (26) e calcular um valor indicativo baseado nos efeitos observados (tabela 2). Este valor não é um verdadeiro VG e não pode ser usado para derivar limites regulamentares. Pode, no entanto, orientar medidas preventivas e de gestão

Tabela 2: ↓ Parâmetros usados no cálculo do valor guia de cianotoxinas, em diferentes cenários de exposição.

Cianotoxina	Tipo de exposição	NOAEL (µg/kg <sub>pc</sub> /dia)	LOAEL (µg/kg <sub>pc</sub> /dia)	pc (kg)	fi	fa	c (L)	DDA (µg/kg <sub>pc</sub> /dia)
Microcistina	Crónica na água para consumo	40	-	60	1000	0,8	2	0,04
	Aguda na água para consumo	40	-	60	100	1	2	0,4
	Atividade recreativa	40	-	15	100	-	0,25	0,4
Cilindrospermopsina	Crónica na água para consumo	30	-	60	1000	0,8	2	0,03
	Aguda na água para consumo	30	-	60	300	1	2	0,1
	Atividade recreativa	30	-	15	300	-	0,25	0,1
Saxitoxina	Aguda na água para consumo	-	1,5	5	3	1	0,75	0,5
	Atividade recreativa	-	1,5	15	3	-	0,25	0,5
Anatoxina	Aguda na água para consumo	98	-	60	100	1	2	0,98
	Atividade recreativa	98	-	15	100	-	0,25	0,98



artigos breves\_ n. 1

de risco. Trata-se de um valor abaixo do qual não se esperam efeitos adversos nos adultos, mas deve evitar-se a exposição de crianças, visto que estas ingerem um volume de água por peso corporal superior ao dos adultos (22).

Na tabela 3 indicam-se os novos VG estabelecidos pela OMS para as cianotoxinas.

### Implicações para a monitorização de cianobactérias e cianotoxinas

No âmbito das novas recomendações da OMS, a monitorização de cianobactérias e toxinas associadas deverá ser alvo de algumas modificações, uma vez que a existência de VG para várias cianotoxinas implica alterações do sistema de alerta de cianobactérias e cianotoxinas.

Este sistema de alerta consiste numa sequência de procedimentos de monitorização e de gestão, organizado na forma de “árvore de decisão”, que permite delinear respostas imediatas e graduais no decurso da ocorrência de blooms cianobacterianos (14).

O primeiro nível de alerta (nível de vigilância), é acionado quando a densidade de cianobactérias é superior a 10 colónias ou 50 filamentos por mililitro, estão presentes espécies potencialmente tóxicas, a profundidade de Secchi é inferior a 2 m e/ou são detetados COVs (14). Ou seja, a determinação

deste nível de alerta pressupõe a realização de procedimentos de monitorização (identificação e quantificação de cianobactérias por microscopia, utilização do disco de Secchi e deteção de COVs cianobacterianos), contrariamente ao que estava estabelecido anteriormente para este nível de alerta, que exigia apenas a deteção visual de acumulações verdes ou de animais mortos nas massas de água (27).

Para o nível de vigilância, recomenda-se a monitorização semanal (em vez de regular, como previamente) e sempre que possível a quantificação de cianotoxinas. Para as microcistinas e cilindrospermopsina são considerados os novos VG da exposição crónica (tabela 3). Para a saxitoxina e anatoxina-a, consideram-se valores 10x abaixo do valor para a exposição aguda (tabela 3). Relativamente à biomassa cianobacteriana, é sugerido um valor mais elevado de biovolume do que as anteriores recomendações (0,3mm<sup>3</sup>/L em vez de 0,2 mm<sup>3</sup>/L), com base no pressuposto de que existe um rácio de 3:1 entre a quantidade de microcistinas (µg) e o volume celular (mm<sup>3</sup>). Se a biomassa cianobacteriana for expressa com base na clorofila-a, pressupõe-se um rácio de 1:1 entre a quantidade de microcistinas (µg) e de clorofila-a (µg). O valor de biovolume e de clorofila-a implicam, por isso, níveis de microcistinas no limiar do VG da exposição crónica (14). Para as outras cianotoxinas, não existe informação suficiente para determinar os rácios toxina/biomassa, mas assume-se que são similares aos das microcistinas.

Tabela 3: ↓ Valores-guia da OMS para cianotoxinas em águas para consumo humano e recreativas (19-22).

Cianotoxina	Valor Guia OMS (µg/L)		
	Água para consumo humano		Água bruta
	Exposição crónica	Exposição aguda	Exposição em atividades recreativas
Microcistinas	1	12	24
Cilindrospermopsina	0,7	3	6
Saxitoxina	---	3	30
Anatoxina	---	30*	60*

\* Valor indicativo baseado nos efeitos sobre a saúde



artigos breves\_ n. 1

Se estes parâmetros forem ultrapassados, é acionado o nível de alerta 1 (tabela 4), que já prevê a quantificação de cianotoxinas e, quando possível, a implementação de planos de contingência que envolvem normalmente a inclusão de etapas de tratamento de água mais avançadas, que permitam a remoção eficaz das toxinas (14). Comparativamente às recomendações anteriores, adotou-se uma abordagem mais conservadora relativamente aos limites para acionar o nível de alerta seguinte. Assim, o nível de alerta 2 (tabela 4), que corresponde a um nível de risco elevado para a saúde humana, é acionado quando o biovolume apresenta valores superiores a 4 mm<sup>3</sup>/L (versus 10 mm<sup>3</sup>/L, anteriormente) e a clorofila-a atinge 12 µg/L (versus 50 µg/L, anteriormente). Este nível de alerta corresponde aos valores de exposição aguda às cianotoxinas indicados na tabela 3. Nesta fase, os planos de contingência devem ser aplicados e medidas de gestão, tais como o tratamento avançado da água ou a procura de pontos de recolha da água alternativos, devem ser implementadas.

É de ressaltar que o sistema de alerta proposto pode (e deve) adaptar-se à situação particular de cada massa de água. De referir, também, que não obstante os níveis de alerta já não serem baseados na densidade celular (nas recomendações anteriores, 2000 cél/mL correspondiam ao alerta 1 e 100000 cél/mL ao alerta 2 (27)), a concentração de cianobactérias continua a revelar-se um parâmetro útil na monitorização.

A utilização preferencial do biovolume, em detrimento da densidade, está relacionada com a variabilidade do tamanho celular. Este fator tem implicações significativas na quantidade de toxina produzida por célula e por espécie. Aplicando os novos valores de biovolume, a três espécies do mesmo género – *Microcystis* – podemos verificar que existe uma variação de uma ordem de grandeza (14). Para o mesmo valor de biovolume (0,3 mm<sup>3</sup>/L) obtemos densidades entre 2400-20000 cél/mL. Por outro lado, considerando as cianobactérias de reduzidas dimensões, tal como a *Aphanocapsa holsatica*, 0,3 mm<sup>3</sup>/L de biovolume (nível de alerta 1) corresponde a 170000 cél/mL, para o qual seria anteriormente considerado o nível de alerta 2. Por outro lado, o valor de nível de alerta 2 (4 mm<sup>3</sup>/L) pode corresponder a 2000000 cél/mL (*A. holsatica*) ou 10000 cél/mL (*Dolichospermum crassum*) (tabela 5).

No caso das águas balneares, a anterior recomendação da OMS distinguia 2 níveis de referência baseados na densidade de cianobactérias ou na concentração de clorofila-a (27). As novas orientações propõem um sistema de alerta específico para águas balneares com 3 níveis (14). O nível de vigilância é atingido quando, por inspeção visual se observa uma profundidade de Secchi inferior a 1-2 m ou quando as análises laboratoriais revelam valores de biovolume de 1-4 mm<sup>3</sup>/L de clorofila-a 3-12 µg/L, sempre com a dominância de cianobactérias comprovada por observação microscópica.

Tabela 4: ⚠ Níveis de alerta para água para consumo humano e recreativa baseados na biomassa cianobacteriana (19-22).

Nível de Alerta	Biomassa cianobacteriana	
	Biovolume (mm <sup>3</sup> /L)	Clorofila-a (µg/L)
Nível de Alerta 1 para água de consumo	0,3	1
Nível de Alerta 2 para água de consumo	4	12
Nível de Alerta 1 para águas recreativas	4	12
Nível de Alerta 2 para águas recreativas	8	24



**Tabela 5:** Comparação entre densidades celulares e biovolumes de géneros de cianobactérias tóxicas com diferentes dimensões celulares.

Espécie	Nível de alerta 1 (0,3 mm <sup>3</sup> /L BV)	Nível de alerta 2 (4 mm <sup>3</sup> /L BV)	Volume celular do táxon
	Densidade (células/mL)		(µm <sup>3</sup> )
<i>Aphanocapsa holsatica</i>	170000	2000000	1,8
<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	20000	250000	15
<i>Microcystis aeruginosa</i>	4500	65000	65
<i>Microcystis wesenbergii</i>	2400	32000	125
<i>Dolichospermum crassum</i>	750	10000	412

Neste nível, é sugerida a intensificação da frequência de monitorização, a avaliação do potencial de formação de *blooms* e a avaliação da presença de cianobactérias tóxicas, assim como a informação às autoridades competentes. A passagem do nível de vigilância para os níveis de alerta, depende da observação de valores de biovolume até 4-8 mm<sup>3</sup>/L ou 12-24 µg/L de clorofila-a (nível de alerta 1). As cianotoxinas, omissas nas recomendações anteriores, são aqui consideradas para distinguir os níveis de alerta 1 e 2: Concentrações até 24 µg/L de microcistinas, 6 µg/L de cilindrospermopsina, 60 µg/L de anatoxina ou 30 µg/L de saxitoxina para o nível 1 e superiores a estas para o nível de alerta 2 (14).

Quando os níveis de alerta são acionados nas áreas utilizadas para atividades recreativas, as autoridades de saúde locais devem ser informadas e devem ser implementadas medidas de proteção da saúde pública, tais como a interdição de atividades que impliquem o contacto com a água. Este sistema de alerta, à semelhança do utilizado para águas de consumo, considera também o biovolume em detrimento da densidade celular. As cianotoxinas, omissas na recomendação anterior, foram agora incluídas na “árvore de decisão” uma vez que foram estabelecidos VG relativamente à exposição recreativa.

### Considerações finais

O estabelecimento de valores-guia para várias cianotoxinas e de critérios mais objetivos nas recomendações da Organização Mundial da Saúde são uma ferramenta importante para a interpretação dos resultados da monitorização de cianobactérias e toxinas associadas.

Consequentemente, facilita a tomada de decisão na prevenção e gestão de riscos associados aos *blooms* cianobacterianos.

Por outro lado, estas novas orientações permitirão caracterizar de forma mais abrangente a ocorrência de cianotoxinas e contribuir para o conhecimento sobre a ocorrência de cianobactérias tóxicas nas águas doces superficiais portuguesas contribuindo assim para antecipar e prevenir situações de risco que coloquem em causa a saúde pública, animal e ambiental.

### Referências bibliográficas:

- (1) Agência Portuguesa do Ambiente. Plano Nacional da Água (PNA), 2015. <https://www.apambiente.pt/agua/plano-nacional-da-agua>
- (2) Churro C, Dias E, Paulino S, et al. Importância da monitorização de cianobactérias em albufeiras portuguesas. Boletim Epidemiológico Observações. 2013;2(4):18-20. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1541>
- (3) O’Neil JM, Davis TW, Burford MA, et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. Harmful Algae. 2012; 14:313-34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>



artigos breves\_ n. 1

- (4) Huisman J, Codd GA, Paerl HW, et al. Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Aug;16(8):471-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- (5) Suurnäkki S, Gomez-Saez GV, Rantala-Ylinen A, et al. Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds. *Water Res.* 2015 Jan 1;68:56-66. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.037>
- (6) He X, Liu YL, Conklin A, et al. Toxic cyanobacteria and drinking water: impacts, detection, and treatment. *Harmful Algae.* 2016 Apr;54:174-193. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.001>
- (7) Pereira P, Li R, Carmichael W, et al. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *Eur J Phycol.* 2010;39:361-368. <https://doi.org/10.1080/09670260410001714723>
- (8) Dias E, Pereira P, Franca S. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 (CYANOBACTERIA) *J. Phycol.* 2002;38:705-12. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01146.x>
- (9) Osswald J, Rellán S, Gago-Martínez A, et al. Production of anatoxin-a by cyanobacterial strains isolated from Portuguese fresh water systems. *Ecotoxicology.* 2009 Nov;18(8):1110-5. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0375-5>
- (10) Moreira C, Mendes R, Azevedo J, et al. First occurrence of cylindrospermopsin in Portugal: a contribution to its continuous global dispersal. *Toxicon.* 2017 May;130:87-90. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.024>
- (11) Menezes C, Churro C, Dias E. Risk Levels of Toxic Cyanobacteria in Portuguese Recreational Freshwaters. *Toxins (Basel).* 2017 Oct 18;9(10):327. <https://doi.org/10.3390/toxins9100327>
- (12) World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. (2010). WHO human health risk assessment toolkit: chemical hazards. Geneva: WHO, 2010. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44458>
- (13) World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2, Health criteria and other supporting information, 2nd ed. (Addendum). Geneva: WHO, 1998. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38551>
- (14) Chorus I, Welker M. Exposure to cyanotoxins: Understanding it and short-term interventions to prevent it. In Chorus I, Welker, M (eds). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* Geneva: World Health Organization, 2021, pp. 295-400. <https://www.who.int/publications/m/item/toxic-cyanobacteria-in-water---second-editionle/10665/38551>
- (15) American Water Works Association, Water Research Foundation. *A Water Utility Manager's Guide to Cyanotoxins.* Denver, CO: AWWA/WRF 2015. <https://www.awwa.org/Portals/0/AWWA/Government/WaterUtilityManagersGuideToCyanotoxins.pdf?ver=2018-12-13-101839-130>
- (16) Ibelings BW, Backer LC, Kardinaal WE, et al. Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. *Harmful Algae.* 2015 Dec;49:63-74. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.10.002>
- (17) Chorus I (ed). *Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment. Risk Management and Regulations in Different Countries.* Dessau-Roßlau: Federal Environment Agency, 2021. <http://www.uba.de/uba-info-medien-e/4390.html>
- (18) Newcombe G (ed). *International guidance manual for the management of toxic cyanobacteria.* London: Iwa publishing, 2012. (GWRC Report Series). <https://www.iwapublishing.com/books/9781780401355/international-guidance-manual-management-toxic-cyanobacteria>
- (19) World Health Organization. Cyanobacterial toxins: microcystins: background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments. Geneva: WHO, 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338066/WHO-HEP-ECH-WSH-2020.6-eng.pdf>
- (20) World Health Organization. Cyanobacterial toxins: cylindrospermopsins: background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments. Geneva: WHO, 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338063/WHO-HEP-ECH-WSH-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- (21) World Health Organization. Cyanobacterial toxins: saxitoxins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments. Geneva: WHO, 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338069/WHO-HEP-ECH-WSH-2020.8-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- (22) World Health Organization. Cyanobacterial toxins: anatoxin-a and analogues: background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments. Geneva: WHO, 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338060/WHO-HEP-ECH-WSH-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- (23) Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, et al. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Hum Exp Toxicol.* 1999 Mar;18(3):162-7. <https://doi.org/10.1177/096032719901800305>
- (24) Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol.* 2003 Apr;18(2):94-103. <https://doi.org/10.1002/tox.10104>
- (25) European Food Safety Authority. Marine biotoxins in shellfish: saxitoxin group. *EFSA J.* 2019;7(4):1019. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1019>
- (26) Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE, et al. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II anatoxin-a. *Hum Exp Toxicol.* 1999 Mar;18(3):168-73. <https://doi.org/10.1177/096032719901800306>
- (27) Bartram J, Burch M, Falconer IR, et al. Situation assessment, planning and management. In: Chorus I, Bartram J (eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* Geneva: World Health Organization, 1999. [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resourcesquality/toxcyanbegin.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxcyanbegin.pdf)

## **\_As novas *guidelines* da Organização Mundial de Saúde para águas balneares, a qualidade das areias e a Bandeira Azul: que impacto esperar da monitorização dos fungos?**

*The new World Health Organisation guidelines on recreational water quality, sand quality and the Blue Flag: what to expect from fungal monitoring?*

João Brandão<sup>1</sup>, Konstantina Sarioglou<sup>1</sup>, Susana Silva<sup>2</sup>, Helena Rebelo<sup>1</sup>

joao.brandao@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### **\_Resumo**

Em 2021, a 'Bandeira Azul' introduziu a qualidade das areias das praias como critério-guia para atribuição do galardão. Seguindo a recomendação das novas *guidelines* da Organização Mundial de Saúde para as águas balneares, o novo critério para areias baseia-se na quantificação do número de unidades formadoras de colónias (UFC), por grama de areia, de todos os fungos, enterococos e, adicionalmente, *Escherichia coli*. Estes dois últimos são também indicadores de qualidade da água balnear, já que a sua presença indica contaminação de origem fecal. O valor de referência para os fungos totais é de 490 UFC/g. Este estudo pretende fazer uma análise previsiva do que a implementação do novo critério-guia do galardão Bandeira Azul poderá implicar em termos de não-conformidades relativamente ao parâmetro fúngico. A análise (cega) de 105 amostras de areia recebidas no laboratório do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge durante o ano de 2020 revelou uma mediana de 29 UFC/g, um intervalo interquartil entre 5 e 79 UFC/g. Apenas 3 amostras (cerca de 3%) excederam o valor de referência para fungos. Não se espera assim um grande impacto negativo na classificação das zonas balneares designadas utilizando este critério de avaliação.

### **\_Abstract**

In 2021, the 'Blue Flag' added the sand quality of beaches as a guide-criterion for the award. Following the recommendation of the new guidelines for recreational waters from the World Health Organization, the new criterion is based on the quantification, per gram of sand, of the number of colony forming units (CFU) of all fungi and enterococci, but testing also *Escherichia coli*. These last two are indicators of bathing water quality, and their presence indicates faecal contamination. The reference value for all fungi is 490 CFU/g. This study aims at making a predictive assessment of what the implementation of the new Blue Flag criterion may implicate regarding the fungal parameter. The (blind) analysis of 105 sand samples received in the laboratory of the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge during the year 2020 revealed a median of 29 CFU/g, with an interquartile range of 5 to 79 CFU/g. Only 3 samples (about 3%) exceeded the reference value for fungi. Therefore, large negative impacts are not expected on the classification of designated bathing areas based on this assessment criterion.

### **\_Introdução**

As *guidelines* da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a qualidade das águas balneares e proteção da saúde humana, publicadas em 2003, consideravam as areias das praias como um assunto de interesse na proteção da saúde humana (1). Consequentemente, na versão de 2021, o capítulo dedicado a este tema refere os vários grupos biológicos e a sua importância em praias de qualquer região do mundo; desde os atuais parâmetros de qualidade das águas balneares (indicadores de contaminação fecal) a parâmetros tipicamente presentes na ecologia das areias (2). Refere ainda parâmetros endémicos em zonas específicas do mundo, como é o caso da pesquisa de helmintas na Lituânia, em que a areia das praias é uma conhecida matriz de contaminação inter-humana (3). Também as moscas da areia na zona do médio Oriente e parasitas transdérmicos em algumas zonas tropicais são referidas, assim como abordagens de gestão, prevenção e remediação (2). A nova versão das *guidelines* recomenda então a monitorização de parâmetros fúngicos genéricos e bacterianos de origem fecal, com valores-guia para fungos totais e de segurança para enterococos.

No entanto, não basta recomendar. É necessário criar todo um sistema de avaliação dos resultados da monitorização que operacionalize a classificação das praias com base na qualidade das areias. Os valores agora recomendados são provisórios até que se confirmem através de estudos epidemiológicos. De referir que, relativamente aos enterococos, o limite foi extrapolado com base no cálculo de risco quantitativo microbiano (QMRA, na sigla em inglês) a partir do valor de 200 UFC/100 ml para águas balneares, o que



## artigos breves\_ n. 2

corresponde a um risco de desenvolvimento de doença pós-exposição de até 5%. Relativamente aos fungos, a discriminação de alguns grupos é pertinente, mas não se conhece a influência na saúde desses parâmetros individuais para poder determinar valores-limite (4). Exemplos de parâmetros individuais são: *Candida albicans*, uma levedura oportunista de origem quase exclusivamente fecal humana (5); *Rhodotorula* spp., conhecida por causar endocardites em imunocomprometidos; dermatófitos, fungos patogénicos responsáveis por infeções cutâneas, como a tinha e o pé de atleta ou onicomicoses; e os fungos filamentosos indiferenciados, sempre bastante presentes em amostras ambientais e frequentes causadores de alergias e infeções invasivas em hospedeiros suscetíveis (6).

### O Galardão Bandeira Azul

A Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE) atribui um galardão classificativo de qualidade baseado em 32 critérios, imperativos ou guia, de segurança, conforto e de educação ambiental (7). Tendencialmente os critérios-guia antecedem os critérios imperativos e têm como objetivo a sua inclusão de forma suave. Dessa lista de critérios fazem parte a qualidade da água, a exposição pública dos seus resultados na praia, instalações e equipamentos em boa qualidade e quantidade apropriada ao bom funcionamento da zona balnear, acessibilidade à praia em segurança e particularmente, pelo menos uma praia por conselho, terá de assegurar acesso especialmente orientado para deficientes motores. Cerca de metade das zonas balneares designadas são anualmente galardoadas em Portugal.

Baseada nas novas recomendações da OMS, a ABAE entendeu integrar a qualidade da areia das praias, já na época balnear de 2021, como critério-guia para atribuição do galardão. Para a sua monitorização, o novo critério baseia-se na quantificação, por grama de areia, do número de unidades formadoras de colónias (UFC) de todos os fungos, enterococos e *Escherichia coli*. Estes dois últimos são também indicadores de qualidade da água balnear e a sua presença revela contaminação de origem fecal. Os valores de referência são 490 UFC/g para os fungos totais (correspondente ao percentil 80 encontrado no estudo internacional *Mycosands* que envolveu 13 países e vários climas, com uma mediana de 89 UFC/g (6));

67 UFC/g para enterococos (correspondentes ao limite de segurança de 200 UFC/100ml em águas balneares calculados por avaliação de risco microbiano quantificado – QMRA) (2) e 25 UFC/g de *E. coli* (resultante de um estudo realizado no ano 2000 e que representa a mediana nacional (8)).

### \_Objetivo

Este estudo pretende fazer uma análise previsiva do que a implementação do novo critério-guia do galardão Bandeira Azul poderá implicar em termos de não-conformidades relativamente ao parâmetro fúngico.

### \_Materiais e métodos

No estudo exploratório do impacto da implementação do novo critério para atribuição do galardão relativamente à presença de fungos nas areias das praias, estimaram-se, para estes microrganismos, a mediana, o mínimo, o máximo e o intervalo interquartil de 105 amostras de areia de 22 praias, analisadas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, entre junho e novembro de 2020.

A análise fúngica realizou-se por “lavagem” de 40 g de areia com 40 mL de água destilada estéril sob agitação orbital (100 rotações por minuto). 200 µL do sobrenadante foram espalhados em placas de Petri com agar de malte (contendo extrato de malte e cloranfenicol para crescimento e identificação de fungos filamentosos e leveduras) e em placas de Petri com agar micobiótico (com actidiona e cloranfenicol para crescimento e identificação de dermatófitos). Realizaram-se três réplicas de cada inoculação por meio. A incubação foi feita a 27.5 (+/- 2.5) °C durante 5 a 7 dias para as placas de malte e 15 a 20 dias para as de agar micobiótico.

As colónias isoladas foram contadas e identificadas em cada meio com base nas seguintes características: cor do lado frontal das colónias, cor do reverso, morfologia, textura e aspeto geral e meio cromogénico para as leveduras. A identificação microscópica realizou-se utilizando o corante com azul de lactofenol e ampliação de 400x. Foram registadas médias aritméticas dos triplicados de cada um dos meios (fungos filamentosos e leveduras do agar de malte e dermatófitos do agar micobiótico).



artigos breves\_ n. 2

## \_Resultados

A análise (cega) revelou uma mediana de 29 UFC/g e um intervalo interquartil entre 5 e 79 UFC/g. A contagem máxima encontrada foi de 834 UFC/g, tendo apenas 3 amostras (cerca de 3%) excedido o valor de referência. O **gráfico 1** mostra a distribuição de valores obtidos pelas contagens em UFC/g por número de amostra.

A distribuição discriminada de fungos evidencia que o grupo que mais contribui para a contagem total de fungos são os filamentosos esporulantes, onde se incluem as espécies mais frequentemente isoladas no laboratório e que pertencem aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Fusarium*. O **gráfico 2** mostra a relação entre os vários parâmetros: fungos filamentosos, *Candida albicans*, *Rhodotorula* spp, dermatófitos e leveduras.

## \_Discussão

A implementação da nova diretiva europeia relativa à qualidade das águas balneares (9) obrigou a enormes investimentos dos Estados-Membros (EM), com a coparticipação de fundos de coesão comunitários. O grande objetivo deste investimento foi a redução substancial da poluição fecal que chegava às águas costeiras dos EM. Este processo conduziu a uma redução substancial dos indicadores de contaminação fecal presentes nas águas e areias, e dos fungos mais associados a doença humana através das areias, melhorando bastante a qualidade de ambas as matrizes. Este efeito é evidente ao comparar resultados de uma avaliação das areias das costas portuguesas de 2000 e de 2010, 4 anos após o início deste processo. As médias dos indicadores analisados reduziram substancialmente: as leveduras baixaram de

Gráfico 1: ▾ Distribuição das contagens por número de amostra com representação do valor de referência a tracejado (UFC/g).

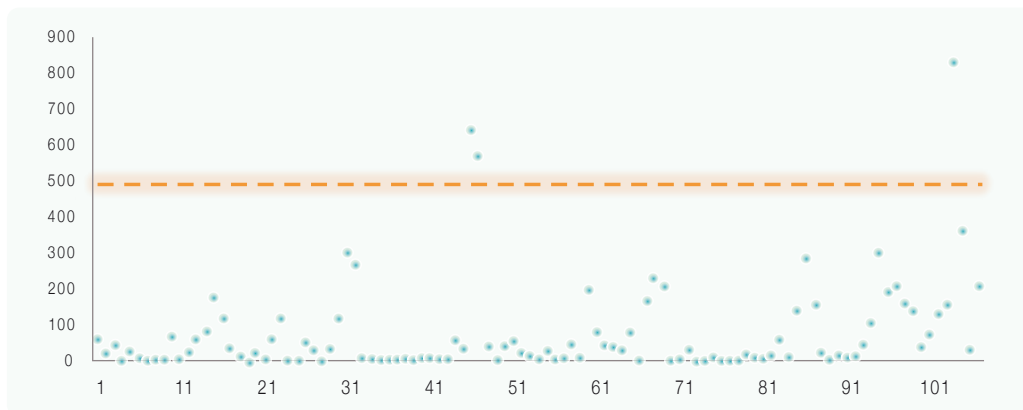
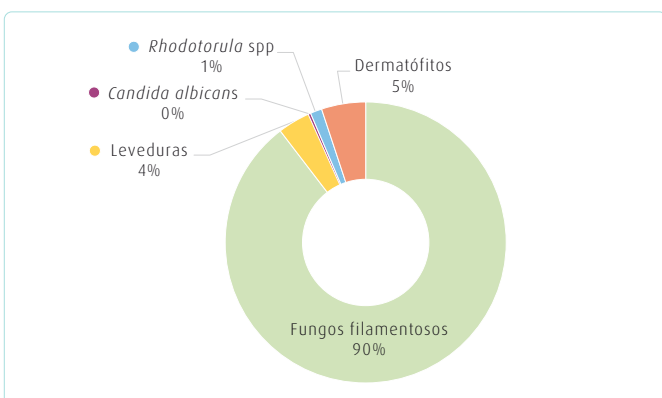


Gráfico 2: ▾ Contribuição dos potenciais parâmetros fúngicos determinados laboratorialmente (UFC/g).



60 UFC/g para 15 UFC/g, os fungos filamentosos de 85 UFC/g para 17 UFC/g e os dermatófitos de 15 UFC/g para 8 UFC/g (8,10). Não considerando parâmetros fúngicos discriminados, o valor médio situava-se, em 2000, entre 300 e 560 UFC/g quando o percentil 80 no estudo Mycosands é de 490 UFC/g. Este valor parece estar, contudo, de acordo com os dados de 2000, apesar das reduções verificadas nos parâmetros individuais. Possivelmente a redução de poluição fecal levou, não a uma redução da quantidade de flora fúngica, mas a uma alteração da sua composição. No entanto, são desconhecidas atualmente quais as taxa mais prevalentes na sequência de um episódio de poluição fecal em areias.



## artigos breves\_ n. 2

Este estudo pretendeu fazer uma análise previsiva do que a implementação do novo critério-guia do galardão Bandeira Azul poderá implicar em termos de não-conformidades relativamente ao parâmetro fúngico. O impacto dos parâmetros bacteriológicos não foi estudado por estar já descrito anteriormente (8,10).

### Conclusão

Considerando que o novo critério-guia exige que 80% das amostras de uma praia, analisadas mensalmente desde o mês anterior ao início da época balnear até final da época, se situem com contagens de fungos por grama de areia abaixo do valor de referência de 490 UFC/g, a probabilidade de uma praia ser desqualificada seria muito baixa em 2020 (cerca de 3%). Entende-se assim ser pertinente e de baixo impacto negativo na classificação das praias, a abordagem decidida pela Associação Bandeira Azul da Europa para a monitorização das areias das praias para atribuição do galardão Bandeira Azul.

### Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and fresh waters. Geneva: WHO, 2003. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42591>
- (2) World Health Organization. Guidelines on recreational water quality: volume 1: coastal and fresh waters. Geneva: WHO, 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342625>
- (3) Republic of Lithuania. Ministry of Health. Lithuanian hygiene standard HN 92: 2018 "Beaches and their quality of bathing water". 2007 (versão consolidada de 01.05.2018 a 25/07/2019). <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.311976/wTyZKkKTr>
- (4) Weiskerger CJ, Brandão J. Fungal contaminants in water and sand: a new frontier for quantitative microbial risk assessment. *Curr Opin Environ Sci & Health*. 2020 Aug;16:73-81. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.03.001>
- (5) Angebault C, Djossou F, Abélanet S, et al. Candida albicans is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians. *J Infect Dis*. 2013 Nov 15;208(10):1705-16. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit389>
- (6) Brandão J, Gangneux JP, Arikan-Akdagli S, et al. Mycosands: Fungal diversity and abundance in beach sand and recreational waters - Relevance to human health. *Sci Total Environ*. 2021 Aug 10;781:146598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146598>
- (7) Associação Bandeira Azul da Europa. Critérios de atribuição da Bandeira Azul para as Praias [online]. [consult. 22/7/2021]. Disponível em: <https://bandeiraazul.abae.pt/plataforma/index.php?p=criteria&s=beaches>
- (8) Sabino R, Veríssimo C, Cunha MA, et al. Pathogenic fungi: an unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal. *Mar Pollut Bull*. 2011 Jul;62(7):1506-11. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.008>
- (9) Comissão Europeia. Diretiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Fevereiro de 2006, relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Diretiva 76/160/CEE. JO 4.3.2006: L 64/37-51. <http://data.europa.eu/eli/dir/2006/7/oj>
- (10) Brandão J, Veríssimo C, Rosado ML, et al. Qualidade microbiológica de areias de praias litorais: relatório final. Alfragide: Instituto do Ambiente, 2002. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4917.7441>



## **\_Deteção de vírus entéricos por real-time RT-qPCR em águas superficiais, subterrâneas, de consumo e águas residuais**

*Real-time RT-qPCR detection of enteric viruses in superficial, underground, drinking waters and wastewater sources*

*Pedro Teixeira, Filipa Costa Ferreira, Raquel Rodrigues, Elisabete Valério*

*elisabete.valerio@insa.min-saude.pt*

*Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal*

### **\_Resumo**

A água é essencial à vida, e por isso torna-se absolutamente necessário protegê-la e assegurar a sua disponibilidade e qualidade para os diversos fins a que se destina. De uma perspetiva microbiológica, a avaliação e monitorização da qualidade da água são usualmente efetuadas recorrendo a bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) como *Escherichia coli* ou *Enterococcus* spp., atuando como potenciais indicadores da presença de agentes patogénicos. No entanto, a ocorrência destes indicadores nem sempre se correlaciona com a presença de agentes patogénicos. Por esta razão, e considerando a importância do uso sustentável dos recursos hídricos, as atuais normas e legislação necessitam de uma revisão que garanta a salvaguarda da saúde pública, em particular no contexto de utilização de água residual tratada. Neste estudo foi desenvolvida uma metodologia para a preparação de amostras e extração de RNA para a pesquisa e quantificação de vírus entéricos - norovírus (NoV) genogrupos I (GI) e II (GII) e vírus da Hepatite A, através de RT-PCR quantitativo em tempo real, além de terem sido avaliados alguns dos tradicionais indicadores microbiológicos. Foram colhidas e analisadas amostras de água naturais (superficiais e subterrâneas) e de consumo; e águas residuais em três fases distintas de tratamento – afluente bruto não tratado, efluente com tratamento secundário por lamas ativadas e efluente sujeito a tratamento terciário por filtração com areias e exposição a radiação ultravioleta (UV). O trabalho desenvolvido permitiu detetar e quantificar os vírus entéricos em estudo e ainda demonstrar que a ausência de FIB não implica a ausência de microrganismos patogénicos, nomeadamente NoV GI e GII em águas residuais sujeitas a tratamento terciário nas ETAR. Os resultados obtidos indicam assim que podem persistir riscos para a saúde pública na utilização de águas residuais tratadas, mesmo com tratamento terciário como a utilização de UV.

### **\_Abstract**

*Water is essential for life. It is therefore mandatory to protect it and to ensure its availability and quality for its different purposes. From a microbiological perspective, water quality assessment and monitoring are usually carried out using fecal contamination indicator bacteria (FIB) such as *Escherichia coli* or *Enterococcus* spp., acting as indicators for pathogen presence. However, the occurrence of these indicators is not always correlated with the presence of pathogens. For this reason and considering the importance of the sustainable use of water resources, current norms and legislation need to be revised to ensure*

*the safeguard of public health, particularly in the context of the use of treated wastewater. In this study, a methodology was developed for sample preparation and RNA extraction for the search and quantification of enteric viruses – Norovirus (NoV) genogroups I (GI) and II (GII) and Hepatitis A virus, using real-time quantitative RT-PCR, in addition to evaluating some of the traditional microbiological indicators. Samples of natural and drinking waters were collected and analyzed; and also, wastewater at three different treatment stages – raw untreated influent, effluent with secondary treatment by activated sludge and effluent subjected to tertiary treatment by sand filtration and ultraviolet radiation (UV) exposure. The work developed allowed to detect and quantify the enteric viruses under study and to demonstrate that the absence of FIB does not imply the absence of pathogenic microorganisms, namely NoV GI and GII in wastewater subjected to tertiary treatment in the WWTP. The results obtained thus indicate that risks to public health may persist with the use of treated wastewater, even with tertiary treatment such as the use of UV.*

### **\_Introdução**

A presença de microrganismos patogénicos nas águas ambientais pode ter origem, por exemplo, em esgotos sem qualquer tipo de tratamento ou resultar de um tratamento ineficiente das águas residuais antes da sua libertação no ambiente, o que pode condicionar a qualidade da água e afetar a saúde pública.

Hoje em dia, a disponibilidade de água, quer em quantidade quer em qualidade, encontra-se ameaçada. Existe atualmente uma preocupação crescente com a necessidade de utilizar águas residuais tratadas para usos não potáveis, como parte da solução para a crise global de escassez de água. Uma gestão eficiente e sustentável dos recursos hídricos permite, portanto, que seja utilizada água residual tratada (ART) para usos não potáveis, tais como rega de jardins, assim como



artigos breves\_ n. 3

lavagem de ruas ou contentores do lixo, os quais representam uma parte significativa do consumo de água nas cidades. Neste contexto, as atuais normas e legislação requerem uma revisão urgente para garantir a segurança desta água tratada a ser reutilizada. Contudo, para que as normas e legislação possam ser alteradas, é necessário criar evidências de quais as alterações que necessitam de ser incluídas, nomeadamente quais os indicadores de qualidade que devem ser contemplados de forma a assegurar a salvaguarda da saúde pública.

As estações de tratamento de águas residuais (ETAR) reduzem a concentração dos microrganismos, mas podem não os eliminar completamente. Considerando que a concentração remanescente de microrganismos depende do nível de tratamento do efluente <sup>(1)</sup>, uma seleção apropriada do processo de desinfecção para um sistema de irrigação específico deve, portanto, ser tida em consideração.

No entanto, deve-se ter em mente que monitorizar todos os agentes patogénicos possivelmente presentes na água não é uma opção tecnologicamente viável para além de ser muito dispendiosa <sup>(2)</sup>. Dado que não é exequível analisar todos os possíveis contaminantes das águas, recorre-se à utilização

de organismos indicadores como substitutos de agentes patogénicos em testes de rotina de águas de consumo, de recreio e ambientais, para a proteção da saúde pública. As bactérias indicadoras habitualmente usadas para estes fins são a *Escherichia coli* e *Enterococcus*, mas que nem sempre se correlacionam com a presença de agentes patogénicos (ver referências em <sup>(2)</sup>), em particular de vírus entéricos <sup>(3)</sup> uma vez que estes são mais resistentes à desinfecção (<http://www.cdc.gov/safewater/effectiveness-on-pathogens.html>) e, portanto, mais persistentes no meio ambiente.

Os vírus entéricos são excretados na urina e nas fezes dos hospedeiros. Estes são encontrados com frequência no ambiente, sendo responsáveis por um elevado número de gastroenterites em todo o mundo. Nas águas, os vírus mais comuns são: norovírus (NoV), enterovírus, rotavírus, vírus da hepatite A (HepA), vírus da hepatite E (HepE), adenovírus e poliomavírus.

As ETAR são importantes para reduzir a transmissão de NoV, HepA, HepE e outros vírus entéricos no ambiente fora do hospedeiro e para prevenir novos ciclos de infeção humana (figura 1). Uma vez que muitos desses vírus têm uma alta resistência aos processos de tratamento <sup>(4)</sup>, é de extrema im-

Figura 1: ⚡ Esquema representativo das várias fases de tratamento das águas residuais para a produção de água residual tratada (ART).



Nota: O tratamento terciário não é, em muitos casos, usado para fazer a desinfecção para descarregar em meio receptor.



## artigos breves\_ n. 3

portância avaliar a eficácia dos tratamentos de águas residuais na sua remoção, principalmente para fins de utilização de ART. Até o momento, não existem muitos estudos sobre as concentrações dos vírus NoV, HepA e HepE em todo o sistema de águas residuais após cada tratamento, particularmente em águas residuais tratadas com tratamento terciário (2).

### \_Objetivo

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a presença de vírus entéricos (NoV GI e GII e vírus da HepA), em várias matrizes de águas naturais, águas de consumo e ao longo das várias fases de tratamento numa ETAR, usando a metodologia de *real-time reverse transcription quantitative PCR* (RT-qPCR), de modo a detetar e quantificar estes vírus entéricos.

### \_Métodos

Foi estruturado um plano de trabalho que incluiu a colheita e análise de amostras de água de consumo, superficiais e subterrâneas; e águas residuais em três fases diferentes de tratamento – afluente bruto não tratado, efluente com tratamento secundário por lamas ativadas e efluente sujeito a tratamento terciário por filtração com areias e exposição a radiação ultravioleta (UV). Foi desenvolvida uma metodologia para a preparação de amostras e extração de RNA para a pesquisa e quantificação de vírus entéricos – NoV GI e GII e vírus da HepA, através de RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), baseado na Norma ISO 15216-2:2019 – *Método horizontal para a deteção de Vírus da Hepatite A e Norovírus em alimentos pela técnica de RT-PCR em tempo real* (5). Esta metodologia indica se estes vírus se encontram ou não presentes na água e se os tratamentos atualmente utilizados nas ETAR são eficientes, garantindo assim que as águas residuais tratadas se encontram isentas destes agentes patogénicos.

As águas são muitas vezes matrizes complexas em que os vírus pesquisados podem estar presentes em baixas concentrações, pelo que a deteção dos vírus entéricos em amostras de águas requer a prévia concentração dos vírus presen-

tes nas amostras. O método desenvolvido é também aplicável a outras matrizes de água, nomeadamente minerais, de nascente engarrafadas, águas balneares salinas ou águas de processo.

Adicionalmente, foram ainda determinados diversos parâmetros microbiológicos – coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e enterococos.

### \_Resultados

Os resultados obtidos demonstraram que o vírus da HepA foi detetado apenas numa amostra de afluente bruto (não tratado) de águas residuais domésticas, ao contrário dos NoV (GI/GII) que foram detetados em afluente bruto (100/100%), efluente com tratamento secundário (47/73%) e terciário (33/20%), apesar das concentrações significativamente reduzidas, ou até ausência aparente de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) detetadas nas águas residuais com tratamento terciário (tabela 1).

Foram ainda analisadas as correlações entre os parâmetros microbiológicos em cada fase de tratamento, sendo que a única correlação positiva entre FIB e vírus entéricos foi identificada no afluente bruto, não tratado, entre NoV GI e coliformes fecais.

Relativamente a águas de consumo, subterrânea e superficial, não foi detetada a presença de vírus entéricos em nenhuma das amostras, apesar de, em alguns casos, ter sido detetada a presença de outros indicadores microbiológicos de contaminação. A relação entre a presença de FIB e os vírus entéricos em estudo não demonstra, deste modo, resultados coerentes em águas residuais, por oposição aos resultados para águas “limpas”, *i.e.*, de consumo subterrâneas e superficiais, em que a ausência de FIB coincide com a ausência de vírus entéricos.



**Tabela 1:** ↓ Resultados microbiológicos (mediana) obtidos para afluente bruto não tratado (WW1), efluente com tratamento secundário (WW2) e com tratamento terciário por filtração com areias e UV (WW3).

	WW1 (n=15)	WW2 (n=15)	WW3 (n=15)	<i>p</i> <sup>*</sup>	Comparações interpare <sup>**</sup>
Coliformes totais (NMP /100 mL)	7.70E+07	9.80E+04	<LD	<0.001	a,b,c
<i>E. coli</i> (NMP /100 mL)	1.66E+07	2.14E+04	<LD	<0.001	a,b,c
Coliformes fecais (NMP /100 mL)	1.19E+07	1.58E+04	<LD	<0.001	a,b,c
Enterococos (NMP/100 mL)	3.99E+06	8.80E+03	<LD	<0.001	a,b,c
NoV GI (CG /100 mL)	6.67E+07	8.34E+06	8.81E+05	<0.001	a,b,c
NoV GII (CG /100 mL)	4.86E+07	2.29E+06	9.69E+05	<0.001	a,b
HepA (CG /100 mL)	3.99E+06	ND	ND	NA	NA

\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; \*\* Comparações múltiplas com correção de Bonferroni.

a = diferença estatisticamente significativa entre WW1 e WW2; b = diferença estatisticamente significativa entre WW1 e WW3; c = diferença estatisticamente significativa entre WW2 e WW3; NMP = número mais provável; CG = cópias genómicas; ND = não detetado; N = número total de amostras analisadas; LD (limite de deteção) = 1 MPN/mL; NA = não aplicável.

Adaptado de Teixeira *et al.*, 2020 (3).

## \_Conclusões

O trabalho desenvolvido permitiu demonstrar que a ausência de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) não implica a ausência de microrganismos patogénicos, nomeadamente NoV GI e GII em águas residuais sujeitas a tratamento terciário nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR).

Os resultados obtidos indicam, assim, que podem persistir riscos para a saúde pública na utilização de águas residuais tratadas, mesmo com tratamento terciário como a utilização de radiação ultravioleta (UV).

Além disso, foi constatado que a relação entre a presença de FIB e vírus entéricos não demonstra resultados coerentes em águas residuais por comparação a águas “limpas”, *i.e.*, de consumo, subterrâneas e superficiais. Estudos adicionais são necessários, que incluam um maior número de

amostras, outras ETAR e, sobretudo, que confirmem se os vírus encontrados se mantêm infecciosos após os tratamentos a que estas águas são sujeitas nas ETAR, de modo a adaptar as atuais normas e legislação aplicáveis à utilização de água residual tratada (ART).

## Perspetivas futuras

A demanda de água para usos não potáveis como rega de jardins ou agricultura, assim como lavagem de ruas ou contentores do lixo tem aumentado cada vez mais. Uma vez que um dos efeitos das alterações climáticas são períodos de seca mais alargados, existe atualmente uma preocupação crescente com a necessidade de utilizar águas residuais tratadas para dar resposta a estas necessidades. Como tal, e considerando os resultados do presente estudo, a pesquisa de vírus entéricos – particularmente os mais infecciosos e ambientalmente resistentes como os NoV – deve



ser incluída na monitorização e avaliação da qualidade da água, em particular no contexto de utilização de ART.

O Laboratório de Microbiologia de Águas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) contribui para a qualidade da água de várias formas, através de investigação aplicada e prestação de serviços acreditados de monitorização da qualidade da água nas suas diversas utilizações. A pesquisa dos vírus entéricos aqui abordados (vírus da hepatite A, norovirus GI e GII) fazem já parte dos serviços disponíveis à comunidade.

#### Referências bibliográficas:

- (1) ISO 16075-1:2015. Guidelines for treated wastewater use for irrigation projects - Part 1: The basis of a reuse project for irrigation
- (2) Teixeira P, Salvador D, Brandão J, et al. Environmental and Adaptive Changes Necessitate a Paradigm Shift for Indicators of Fecal Contamination. *Microbiol Spectrum*. 2020 Mar 27;8(2):ERV-0001-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ERV0001-2019>
- (3) Teixeira P, Costa S, Brown B, et al. Quantitative PCR Detection of Enteric Viruses in Wastewater and Environmental Water Sources by the Lisbon Municipality: A Case Study; *Water*. 2020;12(2):544. <https://doi.org/10.3390/w12020544>
- (4) Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens*. 2015 May 21;4(2):307-34. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020307>
- (5) ISO 15216-2:2019. Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR - Part 2: Method for detection

## Monitorização de trihalometanos e halocetonas em amostras de água

### Monitoring of trihalomethanes and haloketones in water samples

Sílvia S. José, Helena Rebelo

*silvia.jose@insa.min-saude.pt*

Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

#### \_Resumo

A água é um recurso essencial e indispensável a todas as formas de vida. No entanto para assegurar as condições de potabilidade e qualidade microbiológica é frequentemente necessário proceder à sua desinfeção. O desinfetante mais utilizado é o hipoclorito de sódio, embora possam também ser utilizados o cloro gasoso, o dióxido de cloro, o bromo, entre outros. A maioria dos desinfetantes pode reagir com a matéria orgânica, eventualmente presente na água, originando a formação de uma mistura complexa de produtos indesejáveis, potencialmente tóxicos, designados por subprodutos da desinfeção. Este trabalho teve como principal objetivo estudar, em amostras de água da rede pública de abastecimento e de tanques recreativos (piscina e jacúzis), a presença de alguns subprodutos da desinfeção: trihalometanos (clorofórmio, bromofórmio, bromodichlorometano, diclorobromometano) e halocetonas (1,1-dicloropropanona-2; 2-brpropanona e 1,1,1-tricloropropanona). Os trihalometanos (THMs) são compostos cuja monitorização está prevista nos normativos relativos à qualidade da água para consumo humano e nos quais estão estabelecidos valores limite. Os teores de halocetonas (HKs) não estão legislados, pelo que não são conhecidos valores limite. Os THMs e HKs foram determinados por cromatografia gasosa (GC) com detetor de captura eletrónica (ECD) após concentração por micro extração em fase sólida (SPME). Neste estudo exploratório não foram registados teores de THMs considerados de risco face aos referenciais existentes. No que se refere às HKs, dado que não existem valores guia definidos, permanece em aberto o nível de risco para as concentrações encontradas.

#### \_Abstract

Water is an essential and indispensable resource for all forms of life. However, to ensure potability conditions and microbiological quality, it is often necessary to disinfect them. The most used disinfectant is sodium hypochlorite, although gaseous chlorine, chlorine dioxide, bromine, among others, can also be used. Most disinfectants can react with organic matter, which may be present in the water, resulting in the formation of a complex mixture of undesirable, potentially toxic products, called disinfection by-products. The main objective of this work was to study, in samples of public water supply and recreational tanks (swimming pool and Jacuzis), the presence of some disinfection byproducts: trihalomethanes (chloroform, bromoform, bromodichloromethane, dichlorobromomethane) and haloketones (1, 1-dichloropropanone-2; 2-brpropanone and 1,1,1-trichloropropanone). Trihalomethanes (THM) are compounds whose monitoring is provided for in regulations relating to the quality of water for human consumption and in which limit values are established. Haloketone (HKs) contents are not legislated, so no limit values are known.

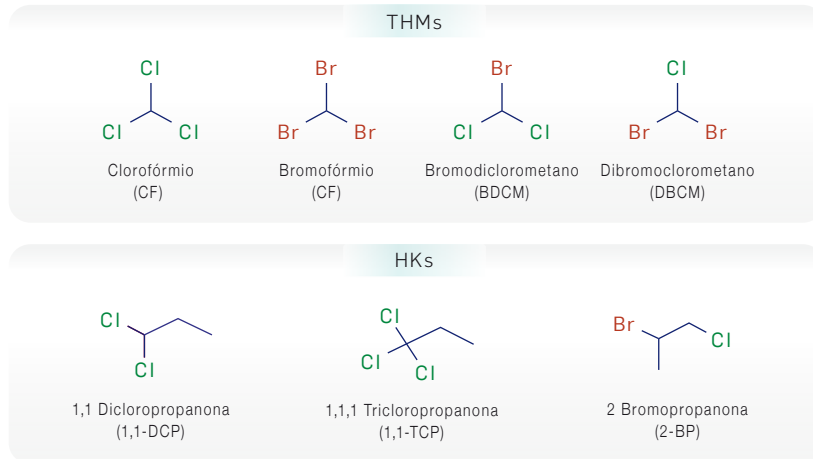
#### \_Introdução

A desinfeção é uma etapa importante no processo de tratamento da água de consumo humano ou de tanques recreativos, sendo o cloro o desinfetante mais utilizado. Este composto, na presença de matéria orgânica, origina reações de halogenação e oxidação resultando na formação de subprodutos de desinfeção. Os trihalometanos (THMs) <sup>(1)</sup> são os compostos mais representativos deste grupo de contaminantes, e incluem o clorofórmio (CF), o bromodichlorometano (BDCM), o dibromoclorometano (DBCM) e o bromofórmio (BF). Os THMs têm como imposição legal não exceder o valor paramétrico (VP) de 100 µgL<sup>-1</sup> numa água destinada ao consumo humano (Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto, alterado pelo Decreto-Lei nº 152/2017 de 7 de dezembro). Para águas de piscina existem valores-guia fixados igualmente em 100 µgL<sup>-1</sup> (Norma Portuguesa 4542:2017). No entanto, existem também outros subprodutos que se podem formar no decurso da desinfeção das águas como por exemplo as halocetonas (HKs) <sup>(2,3)</sup>. Deste grupo de contaminantes fazem parte a 1,1-dicloropropanona (1,1-DCP), a 1,1,1-tricloropropanona (1,1-TCP) e a 2-bromopropanona (2-BP). A presença HKs não está regulamentada.

Por se tratar de compostos, com evidências científicas que os relacionam a problemas graves de saúde, nomeadamente efeitos mutagénicos e carcinogénicos, a sua monitorização é de particular importância na prevenção de riscos para a saúde humana. Sendo contaminantes voláteis, a exposição a estes compostos pode ocorrer por ingestão, inalação ou contacto dérmico. Estudos epidemiológicos, relacionam a exposição humana e a presença de THMs com a incidência de problemas oncológicos (cancro do cólon, reto, bexiga, pulmão, problemas de desenvolvimento e alterações reprodutivas). Relativamente às HKs, existe pouca



Figura 1: Estruturas químicas dos compostos em estudo, trihalometanos (THMs) e halocetonas (HKs).



informação sobre os seus potenciais efeitos em humanos, mas as evidências de efeitos carcinogénicos e mutagénicos em ratinhos, pressupõe a possibilidade de efeitos adversos em humanos (4-6). Os THMs são classificados pela Agência de Investigação para o Cancro (IARC, na sigla em inglês) no grupo 2B (possivelmente carcinogénico para humanos) e 3 (não carcinogénico para humanos) (7,8).

Na figura 1 encontram-se representadas as estruturas químicas dos compostos estudados.

### \_Objetivo

Este trabalho teve como principal objetivo estudar, em amostras de água da rede pública de abastecimento e de tanques recreativos (piscina e jacúzis), a presença de alguns subprodutos da desinfecção: trihalometanos (clorofórmio, bromofórmio, bromodichlorometano, diclorobromometano) e halocetonas (1,1 dicloropropanona-2; 2-bropropanona e 1,1,1-tricloropropanona).

### \_Materiais e métodos

Este estudo considerou um total de 54 amostras de água, sendo 38 da rede pública de abastecimento e 16 de tanques recreativos (piscina e jacúzis).

Os THMs e HKs foram determinados por cromatografia gasosa (GC) com detetor de captura eletrónica (ECD) após concentração por micro extração em fase sólida (SPME).

Para os THMs foi utilizada na microextração uma fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS) como fase estacionária e para as HKs uma fibra de Carboxen/ Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS). O tipo de fibra a usar, é escolhida de acordo com a afinidade (polaridade) dos compostos que se pretende analisar. O detetor de captura eletrónica é específico para a determinação e quantificação de iões eletronegativos, como o cloro e bromo. A identificação dos compostos é baseada no tempo de retenção.

### \_Resultados

Os resultados obtidos estão representados no gráfico 1.

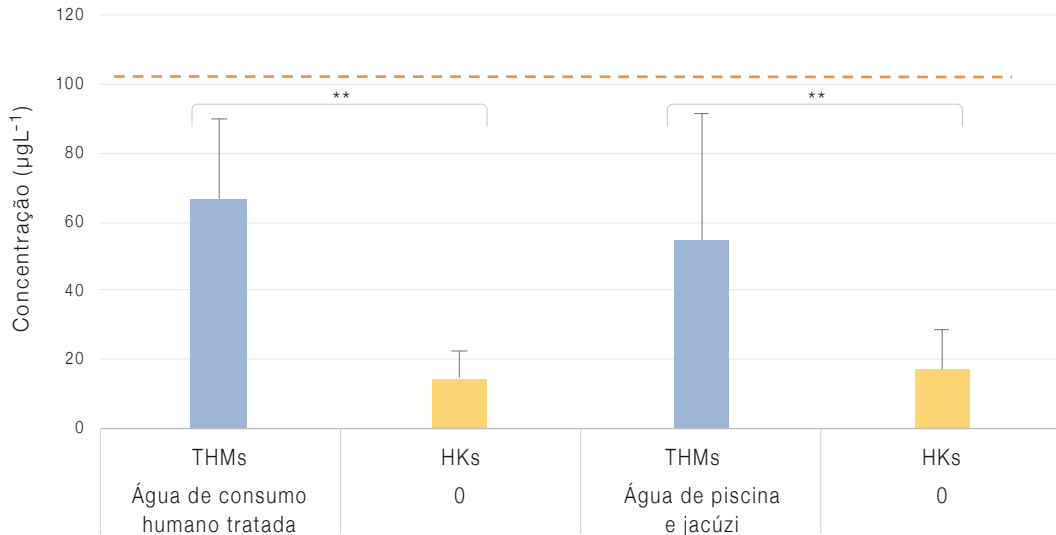
Como referido na literatura (9), as HKs apresentam valores de concentração mais baixos comparativamente aos THMs, observando-se, por aplicação do teste t, uma diferença significativa entre a concentração de THMs e de HKs formados em ambas as matrizes estudadas, com um nível de significância  $p = 0,01$  (\*\*).

Todas as amostras estudadas cumpriram o valor paramétrico de  $100 \mu\text{gL}^{-1}$  para THMs em água de consumo (média =  $66,4 \mu\text{gL}^{-1}$ ) e o valor guia de  $100 \mu\text{gL}^{-1}$  nas águas de tanques recreativos (média =  $54,6 \mu\text{gL}^{-1}$ ).

Analisando os resultados obtidos para cada composto individualmente (gráfico 2), verifica-se que o clorofórmio é a espécie mais abundante, sendo o composto que mais contribui para o teor de THMs totais.

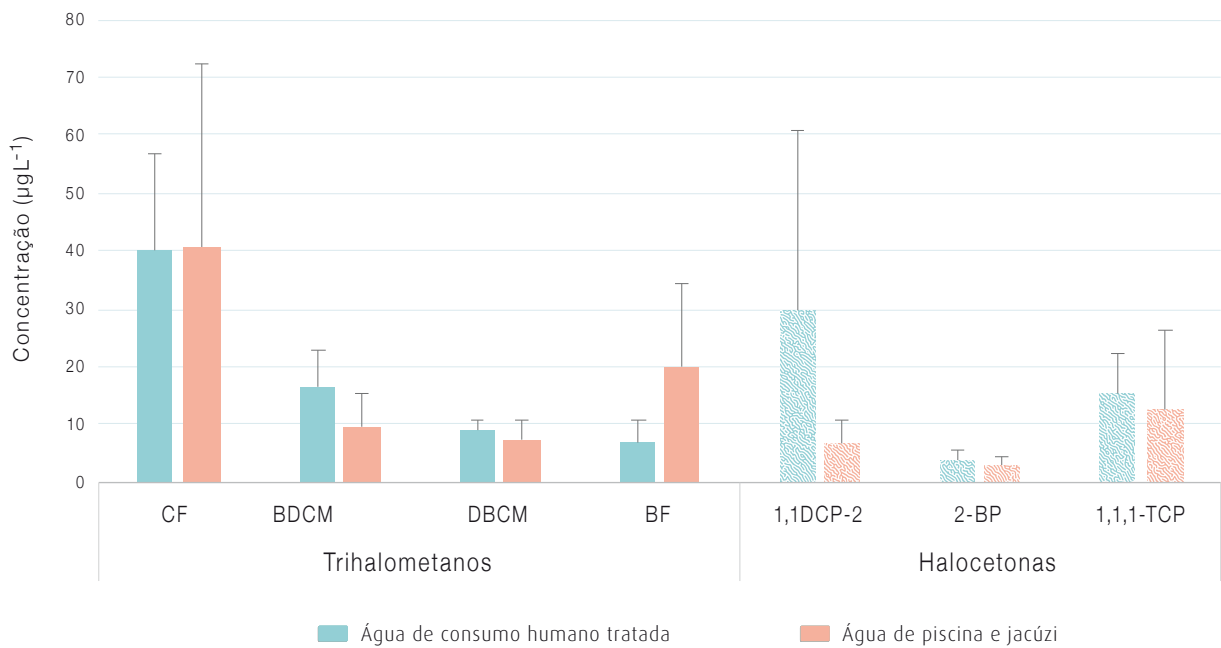


Gráfico 1: Concentração de trihalometanos (THMs) e halocetonas (HKs) (totais) em água de consumo humano tratada e água de piscina e jacúzi.



\*\* nível de significância  $p = 0,01$  (\*\*) para teste t.

Gráfico 2: Concentração dos compostos individuais dos trihalometanos (THMs) e halocetonas (HKs) em água de consumo humano tratada e água de piscina e jacúzi.



Os valores representam o valor médio para cada composto.

CF - clorofórmio; BDCM - bromodiclorometano; DBCM - dibromoclorometano; BF - bromofórmio

1,1-DCP - 1,1-dicloropropanona; 2-BP - 2-bromopropanona; 1,1,1-TCP - 1,1,1-tricloropropanona.



artigos breves\_ n. 4

No caso das HKs, o valor médio encontrado nas águas de consumo humano analisadas foi de  $14,4 \mu\text{gL}^{-1}$  e nas águas de tanques recreativos foi de  $17,1 \mu\text{gL}^{-1}$ . As espécies identificadas maioritariamente foram a 1,1 DCP-2 e a 1,1,1-TCP, o que está também de acordo com a literatura (3,6).

A **tabela 1** apresenta os valores médios obtidos para os parâmetros: carbono orgânico total (COT), cloro residual livre, temperatura e pH nas amostras estudadas.

A formação de THMs é favorecida pelo aumento de COT, cloro residual livre, temperatura e pH, enquanto a formação de HKs é privilegiada por reações de cinética rápida, de modo a minimizar a decomposição, e pH inferior a 8.

De acordo com os dados bibliográficos, o composto 1,1 DCP-2 é de formação muito rápida durante o processo de desinfeção, no entanto, é uma espécie que, por ação do cloro livre, pode ser gradualmente oxidada a 1,1,1- TCP. Por outro lado, esta espécie pode ser gradualmente hidrolisada a clorofórmio, o que se traduz numa diminuição das HKs totais e num aumento de THMs totais.

**Tabela 1:** Valores médios obtidos para os parâmetros carbono orgânico total (COT), cloro livre residual, temperatura e pH nas amostras estudadas.

Valores médios			
COT (mgL <sup>-1</sup> )	Cloro livre residual (mgL <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	pH (escala Sorensen)
8,6	1,3	26,7	7,5

### Conclusões

Este estudo permitiu perceber que além do grupo mais expressivo de subprodutos de desinfeção, os THMs, se formam também outros compostos em menor concentração, mas que podem, eventualmente representar malefícios para a saúde humana, pelo que a sua presença não deve ser negligenciada apesar de não existir, de momento, nenhuma restrição normativa.

Neste estudo exploratório não foram registados teores de THMs considerados de risco face aos referenciais existentes. No que se refere às HKs, dado que não existem valo-

res guia definidos, permanece em aberto o nível de risco para as concentrações encontradas.

Dado que a formação de subprodutos da desinfeção depende, entre outros, dos teores de matéria orgânica e desinfetante residual (cloro e/ou bromo) e ainda da temperatura, é importante o controlo destes fatores durante o processo de desinfeção, quer em águas de consumo humano quer em águas de piscina/jacúzi a fim prevenir eventuais fatores de risco para a saúde.

### Agradecimentos:

Os autores deste trabalho agradecem a colaboração da equipa de amostragem da Unidade de Água e Solos do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa na recolha das amostras, fundamentais para a elaboração deste estudo.

### Referências bibliográficas:

- (1) Sá CS, Boaventura RA, Pereira IB. Analysis of trihalomethanes in water and air from indoor swimming pools using HS-SPME/GC/ECD. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2011;46(4):355-63. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.542385>
- (2) Wang X, M I GL, Zhang X, et al. Haloacetic acids in swimming pool and spa water in the United States and China. *Front Environ Sci Eng.* 2014;8:820-24. <https://doi.org/10.1007/s11783-014-0712-7>
- (3) Nikolaou AD, Lekkas TD, Kostopoulou MN, et al. Investigation of the behaviour of halo ketones in water samples. *Chemosphere.* 2001 Aug;44(5):907-12. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(00\)00536-1](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(00)00536-1)
- (4) Xu X, Weisel CP. Inhalation exposure to haloacetic acids and halo ketones during showering. *Environ Sci Technol.* 2003 Feb 1;37(3):569-76. <https://doi.org/10.1021/es025747z>
- (5) Cortés C, Marcos R. Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters: a review of recent literature. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2018 Jul;831:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.04.005>
- (6) Yang X, Shang C, Westerhoff P. Factors affecting formation of haloacetonitriles, halo ketones, chloropicrin and cyanogen halides during chloramination. *Water Res.* 2007 Mar;41(6):1193-200. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.004>
- (7) Zhang L, Tang X, Rothman N, et al. Occupational exposure to formaldehyde, hematotoxicity, and leukemia-specific chromosome changes in cultured myeloid progenitor cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Jan;19(1):80-8. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0762>
- (8) List of Classifications : Formaldehyde [Internet]. In: IARC Monographs on the Identifications of Carcinogenic Hazards to Humans : Agents Classified by the IARC Monographs, volumes 1–129. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>
- (9) Nikolaou AD, Golfopoulou SK, Lekkas TD, et al. Factores affecting the formation of organic by-products during water chlorination: a bench-scale study. *Water Air Soil Pollut.* 2004;159:357-71. <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000049189.61762.61>
- (10) Guilherme S, Rodriguez MJ. Occurrence of regulated and non-regulated disinfection by-products in small drinking water systems. *Chemosphere.* 2014 Dec; 117:425-32. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.002>

## \_Exposição profissional a benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), entre 2015 e 2020

*Occupational exposure to benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX), between 2015 and 2020*

Ana Filipa Pires, Aida Pais, Tiago Faria, Sílvia Santos, Anabela Oliveira, Joana Amado, Hermínia Pinhal, Ana Nogueira

ana.nogueira@insa.min-saude.pt

Unidade de Ar e Saúde Ocupacional. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

A exposição profissional a benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) tem efeitos nocivos para saúde (tóxicos para o sistema nervoso central e reprodução, cancerígenos, mutagénicos), que levaram a União Europeia e Portugal a estabelecer valores-limite de exposição, de cumprimento obrigatório (benzeno) ou com carácter indicativo (etilbenzeno, tolueno e xilenos), que visam proteger os trabalhadores no desenvolvimento das suas atividades profissionais. Entre os anos de 2015 e 2020, no âmbito das suas atividades de rotina de avaliação de exposição profissional a agentes químicos, os técnicos da Unidade de Ar e Saúde Ocupacional do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Lisboa) procederam à colheita e análise de 273 amostras de ar para determinação de BTEX. O presente estudo teve como objetivo analisar os resultados obtidos nas amostras de ar realizadas, de modo a retratar a realidade no que respeita à exposição a cada um destes agentes. Verificou-se que 98% dos resultados são inferiores valor-limite de exposição.

### \_Abstract

*Occupational exposure to benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) has relevant effects on health (toxic to the central nervous system and reproduction, carcinogens, mutagens). In order to protect workers in the development of their professional activities the European Union and Portugal established exposure limit values, which are mandatory (benzene) or indicative (ethylbenzene, toluene and xylenes). Between 2015 and 2020, as part of their routine activities to assess professional exposure to chemical agents, technicians from the Air and Occupational Health Unit of Department of Environmental Health of National Institute of Health Dr Ricardo Jorge (Lisbon, Portugal) had the opportunity to collect and analyse 273 air samples for BTEX determination. This study aimed to analyse the results obtained in the air samples taken, in order to portray the reality observed regarding exposure to each of these agents. 98% of the results are below the exposure limit value.*

### \_Introdução

Os hidrocarbonetos aromáticos são um grupo específico de produtos petrolíferos, compostos de átomos de carbono e hidrogénio que contêm um ou mais anéis de benzeno, sendo o mais simples o benzeno. Os compostos usados como solventes geralmente contêm um único anel de benzeno, com uma ou mais cadeias laterais, como tolueno, xilenos, etilbenzeno. São líquidos, voláteis à temperatura ambiente, por regra incolores, com odor agradável e perceptível a concentrações no ar entre 1 ppm (xilenos) e 12 ppm (benzeno). São pouco solúveis em água, mas miscíveis com a maioria dos solventes orgânicos e óleos minerais, vegetais ou animais <sup>(1)</sup>.

Em contexto profissional, a exposição a benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) pode ocorrer por inalação, mas também por absorção através da pele e mucosas. Os efeitos tóxicos da exposição repetida a este grupo de solventes incluem irritação da pele e das mucosas ocular e respiratória, danos neurológicos progressivos, que se manifestam principalmente por problemas de memória e comportamento. Associam-se ainda suspeitas, em alguns casos confirmadas, de ação cancerígena, mutagénica e/ou tóxica para a reprodução <sup>(1,2)</sup>.

O benzeno apresenta toxicidade específica significativa para as células sanguíneas, podendo levar a reduções no número de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos ou plaquetas, bem como leucemias por exposição repetida. É oficialmente reconhecido na União Europeia (UE) como cancerígeno e mutagénico, estando a sua utilização limitada ao uso profissional. Nos países da UE está essencialmente presente em combustíveis e reagentes de laboratório, sendo utilizado nas indústrias de manufatura e transformação destes produtos e



## artigos breves\_ n. 5

também na indústria de manufatura de produtos derivados do petróleo (1,3).

Os solventes etilbenzeno, tolueno e xilenos estão presentes em produtos de utilização profissional e não profissional, como tintas, vernizes, óleos, produtos de revestimento, adesivos, produtos de limpeza, reagentes de laboratório, entre outras, muitas vezes em simultâneo. O tolueno causa danos às células auditivas, podendo levar a deficiência auditiva, é suspeito de ser cancerígeno, mutagénico e tóxico para a reprodução (1,2,4-6).

Portugal tem legislação que visa a proteção dos trabalhadores contra os efeitos adversos destas substâncias, fixando valores-limite de exposição de caráter indicativo, para o etilbenzeno, tolueno e xilenos, e de cumprimento obrigatório para o benzeno.

Entre 2015 e 2020, no âmbito de estudos de avaliação de exposição profissional a agentes químicos, a Unidade de Ar e Saúde Ocupacional do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em Lisboa, realizou um total de 1466 amostras de ar a acompanhar trabalhadores realizando tarefas com exposição a produtos contendo solventes orgânicos. Destas, 273 foram dirigidas à determinação de BTEX.

### \_Objetivo

O presente estudo tem como objetivo analisar os resultados obtidos nas amostras de ar realizadas pela Unidade de Ar e Saúde Ocupacional do INSA, entre 2015 e 2020, de modo a retratar a realidade e verificar se a exposição individual a cada um dos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) se encontra controlada face aos atuais valores-limite de exposição.

### \_Material e métodos

Em cada estudo de avaliação de exposição profissional, a seleção dos agentes químicos a quantificar na atmosfera dos locais de trabalho teve por base a solicitação e informação dos seus responsáveis, relativa às tarefas realizadas e aos produtos manipulados, assim como a informação constante das fichas de dados de segurança dos referidos produtos.

Para a presente caracterização selecionaram-se, de entre as 1466 amostras dirigidas a solventes orgânicos no ar colhidas entre 2015 e 2020, apenas as relativas aos hidrocarbonetos aromáticos BTEX, num total de 273, sobre as quais se realizaram 513 determinações de concentração no ar. Na quantificação seguiram-se procedimentos internos de amostragem e determinação laboratorial, baseados no método NIOSH 1501:2003 (7).

Colheram-se amostras de ar pessoais ou estáticas, na zona respiratória dos trabalhadores ou à altura média da mesma, acompanhando tarefas com duração entre 15 minutos e 5 horas, com exposição potencial aos BTEX. A colheita realizou-se em tubos contendo carvão ativo (skc 226 01), utilizando bombas de amostragem pessoais ajustadas a 100 ml/min ou 200 ml/min, para um volume de ar amostrado entre 2 L e 30 L.

Em laboratório, as amostras foram desadsorvidas à temperatura ambiente com sulfureto de carbono, durante 30 minutos, e analisadas por cromatografia em fase gasosa equipada com injeção automática, coluna capilar e detetor de ionização de chama. A análise permite a separação, identificação e quantificação dos solventes presentes nas amostras.

Os resultados de concentração nas amostras/determinações selecionadas foram comparados com os valores-limite de exposição constantes na legislação nacional aplicável presentemente em vigor, Decreto-Lei n.º 102-A/2020, de 9 de dezembro, e Decreto-Lei n.º 1/2021, de 6 de janeiro, tendo em vista verificar do seu cumprimento.

Sendo o propósito da presente caracterização averiguar sobre o cumprimento dos valores-limite de exposição fixados para cada um dos BTEX, não são tidos em consideração os efeitos da exposição simultânea a estes agentes,



artigos breves\_ n. 5

nem a outros agentes químicos eventualmente presentes na atmosfera dos locais de trabalho. Nos estudos originais de avaliação de exposição a agentes químicos, sempre que se observou a presença simultânea dos BTEX foi considerada na avaliação a possibilidade de os efeitos da exposição conjunta serem aditivos, uma vez que têm efeitos tóxicos semelhantes na saúde humana.

### \_Resultados

Como se pode observar no **gráfico 1**, as 273 amostras de BTEX realizadas distribuem-se em três tipos de atividade: atividades com exposição a derivados do petróleo (51%), atividades com exposição a tintas, vernizes e outros produtos de base solvente (30%) e atividades laboratoriais (18%). As 513 determinações realizadas nas amostras seguem um padrão de distribuição semelhante: atividades com exposição a derivados do petróleo (52%), atividades com exposição a tintas, vernizes e outros produtos de base solvente (32%) e atividades laboratoriais (15%).

No **gráfico 2** pode observar-se a distribuição dos BTEX determinados por tipo de atividade considerada. Nas atividades com exposição a derivados do petróleo 50% das determinações realizadas foram de benzeno, seguindo-se tolueno e xilenos, 19%, e etilbenzeno, 12%. Nas atividades com exposição a tintas, vernizes e outros produtos de base solvente apenas se observa uma determinação de benzeno (1%), predominando as determinações de xilenos, 44%, seguidas de etilbenzeno, 34%, e tolueno, 21%. Nas atividades laboratoriais predominam as determinações de xilenos (59%), seguidas de etilbenzeno (37%) e tolueno (4%), sem pesquisa de benzeno. Esta distribuição vai ao encontro do descrito pela *European Chemicals Agency Substance Information (ECHA)* relativamente à utilização dos BTEX na União Europeia (3-6).

Os resultados das concentrações de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos obtidos nas amostras de ar colhidas entre 2015 e 2020, paralelamente com a linha que corresponde à concentração do valor-limite de exposição (VLE) estabelecido na legislação em vigor, apresentam-se no **gráfico 3**.

Gráfico 1: ▾ Distribuição de amostras (a) e determinações (b) realizadas entre 2015 e 2020, por tipo de atividade.

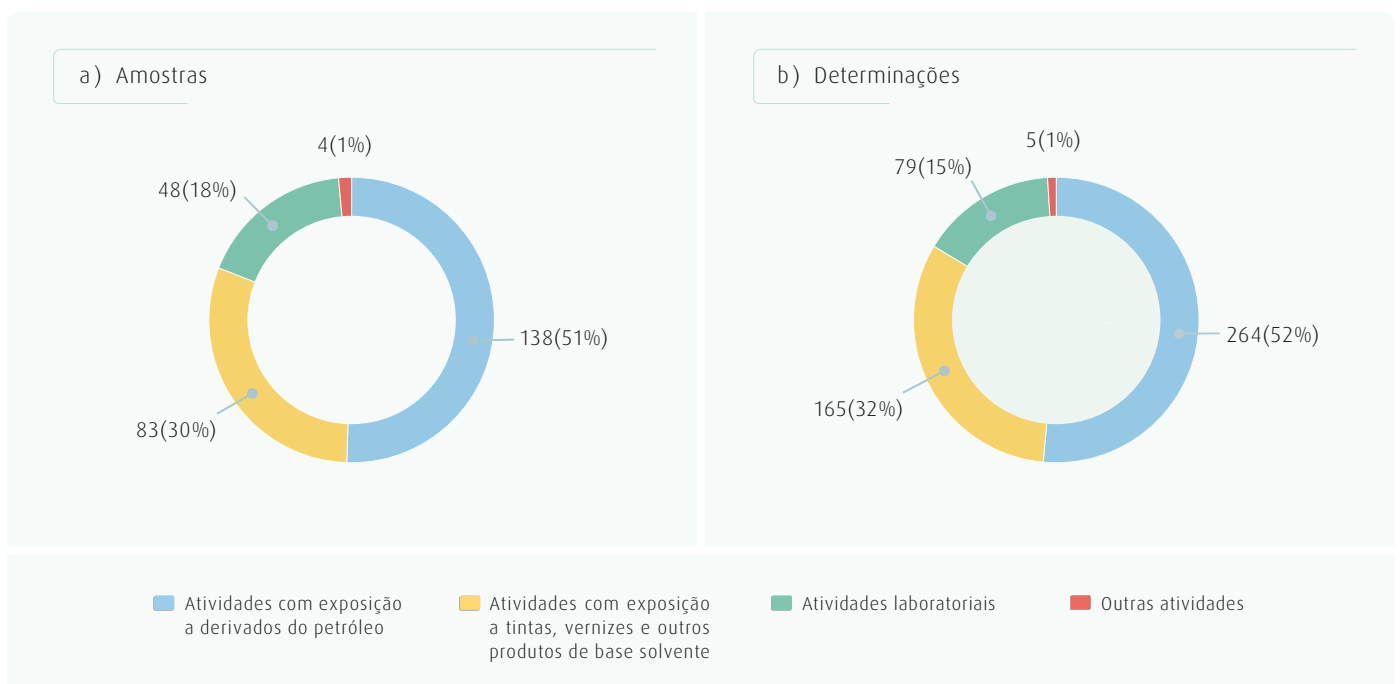




Gráfico 2 (a-d): Distribuição dos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) determinados entre 2015 e 2020, por tipo de atividade.





Gráfico 3: Concentração de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) no ar, entre 2015 e 2020.



Num total de 513 determinações de BTEX, 505 (98%) estiveram abaixo do respetivo valor-limite de exposição e 8 (2%) excederam esse valor.

Como se pode observar no gráfico 3, as concentrações de tolueno e etilbenzeno estão claramente abaixo dos valores-limite de exposição atualmente em vigor em Portugal. As concentrações mais elevadas em 88 determinações de tolueno e 121 determinações de etilbenzeno foram, respetivamente, 29 ppm e 13 ppm, obtidas em amostras colhidas durante atividades com exposição a tintas, vernizes e outros produtos de base solvente.

A concentração de benzeno excedeu o valor-limite de exposição de 1 ppm em 5 (4%) das 133 amostras colhidas, sendo a concentração máxima determinada de 3 ppm. Estas amostras realizaram-se em atividades com exposição a derivados do petróleo.

Relativamente à concentração de xilenos, num total de 170 amostras de ar colhidas observa-se que o valor-limite de exposição foi excedido em 3 (2%) amostras, com uma concentração máxima de 58 ppm. Estas amostras realizaram-se em atividades com exposição a tintas, vernizes e outros produtos de base solvente.



## **\_Conclusões**

O presente estudo permitiu analisar os resultados das amostras de ar colhidas entre 2015 e 2020 para determinação de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos).

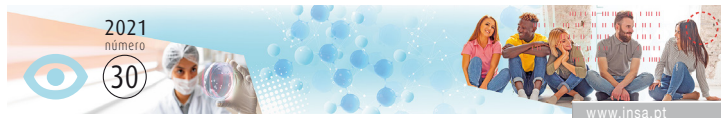
Conclui-se que as amostras colhidas se distribuem em três grupos de atividade, atividades com exposição a derivados do petróleo (51%), atividades com exposição a tintas, vernizes e outros produtos de base solvente (30%) e atividades laboratoriais (18%). A determinação de benzeno foi quase exclusivamente realizada em amostras do primeiro grupo de atividades. A determinação dos outros agentes é equilibrada no segundo grupo de atividades, predominando os xilenos nas atividades laboratoriais.

No que respeita às concentrações obtidas, conclui-se que na generalidade (98%) cumprem os valores-limite de exposição individuais aplicáveis, à data, em legislação nacional relativa à proteção da saúde dos trabalhadores. A este facto não será alheio o crescente investimento em medidas de proteção geral dos trabalhadores, que garantem o decréscimo da volatilização destas substâncias para a atmosfera dos locais de trabalho.

Não obstante, porque estas substâncias são absorvidas não só por via inalatória, mas também através da pele e das mucosas, considera-se de particular relevância a utilização de equipamento de proteção individual que permita eliminar ou minimizar também esta via de exposição.

## **Referências bibliográficas:**

- (1) Institut National de Recherche et de Sécurité. Les hydrocarbures aromatiques (fiche solvants, ED 4226, 2011). <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%204226>
- (2) Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho. Relatório sobre o estado atual do conhecimento no domínio das substâncias tóxicas para a reprodução. Luxemburgo: Serviço das Publicações da União Europeia, 2016. <https://osha.europa.eu/pt/publications/summary-state-art-report-reproductive-toxicants>
- (3) European Chemicals Agency Substance Information. Brief Profile-ECHA. Benzene, 17/07/2021
- (4) European Chemicals Agency Substance Information. Brief Profile-ECHA. Toluene, 17/07/2021.
- (5) European Chemicals Agency Substance Information. Brief Profile-ECHA. Ethylbenzene. 22/07/2021.
- (6) European Chemicals Agency Substance Information. Brief Profile-ECHA. Xylene. 22/07/2021.
- (7) Hydrocarbons, Aromatic: Method 1501. In: NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), 4th ed. Issue 3, 2003. <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/1501.pdf>



## **Contributo da dieta vegetariana para o aporte mineral no adulto**

### *Contribution of vegetarian diet to mineral intake in adults*

Rita Bárbara<sup>1</sup>, Dina Ribeiro<sup>1</sup>, Adriana Costa<sup>1</sup>, Nelson Tavares<sup>1</sup>, Marta Ventura<sup>2</sup>, Ana Cláudia Nascimento<sup>2</sup>, Isabel Castanheira<sup>2</sup>, Ana Rito<sup>2</sup>, Mariana Santos<sup>2</sup>, Susana Santiago<sup>2</sup>

ritaantunes14@gmail.com

(1) Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona, Lisboa, Portugal

(2) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

#### **\_Resumo**

Apesar de considerada um padrão alimentar saudável, a dieta vegetariana apresenta risco de défice de ingestão de diversos nutrientes, entre eles os minerais Fe, Zn e Ca. O papel dos minerais no organismo humano é fundamental, e, por essa razão, o seu estudo no âmbito da dieta vegetariana é tão relevante. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o contributo da dieta vegetariana para o aporte mineral no adulto. Foram determinados os minerais Fe, Zn, Mg, Ca, Na, P e K em 16 amostras compostas de alimentos que se incluem na dieta vegetariana, através de ICP-OES. Verificou-se que, por 100 g de alimento, as sementes de chia fornecem as doses diárias recomendadas de P. Observou-se ainda que o Fe, o Zn e o K foram os minerais menos presentes em quantidade significativa nas amostras estudadas. Salienta-se a necessidade de realizar um planeamento alimentar diário cuidado e destaca-se a importância de recorrer a alimentos fortificados ou suplementação quando necessário, de forma a assegurar uma nutrição adequada.

#### **\_Abstract**

*Despite being considered a healthy dietary pattern, the vegetarian diet presents a risk of deficit in the intake of several nutrients, including the minerals Fe, Zn and Ca. The role of minerals in the human organism is fundamental, so its study in the context of the vegetarian diet is so relevant. Thus, the aim of this study was to evaluate the contribution of the vegetarian diet to mineral intake in adults. The minerals Fe, Zn, Mg, Ca, Na, P and K were determined in 16 composed samples of foods that are included in the vegetarian diet, by ICP-OES. It was found that, per 100 g of food, chia seeds provide the dietary reference intakes of P. It was also observed that Fe, Zn and K were the least present minerals in a significant amount in the studied samples. The need to carry out careful daily food planning is emphasized, and the importance of using fortified foods or supplementation when necessary is highlighted in order to ensure adequate nutrition.*

#### **\_Introdução**

A dieta vegetariana é um padrão alimentar baseado no consumo de alimentos de origem vegetal, sendo considerada saudável quando bem planeada. Caracteriza-se pela abstenção do consumo de carne e derivados, aves, peixe e marisco (1,2). Apresenta uma vertente mais restrita, a *vegan*, que exclui qualquer produto de origem animal, e outros tipos que podem incluir ovos e/ou laticínios como os ovovegetarianos, lactovegetarianos e ovolactovegetarianos (3,4). Hoje em dia verifica-se um crescimento na adesão à dieta vegetariana, relacionado com preocupações morais, ambientais e de saúde (1). Sabe-se que a dieta vegetariana apresenta um risco de défice de ingestão de diversos nutrientes, entre eles a proteína, a vitamina B12, a vitamina D, os ácidos gordos essenciais (ómega-3), e os minerais ferro (Fe), zinco (Zn), cálcio (Ca) e iodo (I), sendo que o valor energético também deve ser garantido. Por essa razão é muito importante um planeamento alimentar diário cuidado (4-6).

Dado o papel fundamental dos minerais no organismo humano, a compreensão do contributo da dieta vegetariana para o aporte mineral no adulto denota grande importância (7). O Fe, o Zn e o Ca são minerais essenciais, atuando a nível funcional, estrutural, catalítico e/ou regulador (8). Têm como principais fontes alimentares produtos de origem animal, e uma vez que estes alimentos estão parcial ou totalmente excluídos da dieta vegetariana, existe um maior risco de um aporte de quantidades inadequadas destes minerais (6,8). Acresce ainda o facto de o Fe e o Zn apresentarem menor biodisponibilidade em alimentos de origem vegetal, o que significa que serão menos absorvidos pelo organismo, comparativamente com fontes alimentares de origem animal (6).



## artigos breves\_ n. 6

Assim, para compensar esta diferença de biodisponibilidade entre as fontes de origem vegetal e animal, recomenda-se que os indivíduos vegetarianos adultos consumam mais 80% das doses diárias recomendadas (DDR) de Fe e até mais 50% das DDR de Zn (9). Para além disso, em relação ao Ca, é também importante destacar que apesar de estar presente nos alimentos vegetais, encontra-se em quantidades reduzidas (à exceção dos hortícolas de folha verde escura, sementes e leguminosas) e por vezes com menor biodisponibilidade, podendo haver uma ingestão inferior à recomendada. Por essa razão, deve praticar-se uma alimentação equilibrada e variada, e realizar-se um planeamento alimentar diário adequado às necessidades individuais (6).

### \_Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o contributo da dieta vegetariana para o aporte mineral no adulto através da determinação dos minerais ferro (Fe), zinco (Zn), magnésio (Mg), cálcio (Ca), sódio (Na), fósforo (P) e potássio (K), por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), em alimentos que podem ser incluídos neste padrão alimentar.

### \_Materiais e métodos

Neste trabalho laboratorial foram analisadas 16 amostras compostas (bagas de goji, sementes de chia, proteína texturizada de soja, queijo fresco de vaca meio-gordo, queijo fresco de vaca magro, queijo fresco de cabra, iogurte grego com fruta, "iogurte" de soja, iogurte grego natural sem açúcar, trigo sarraceno, bulgur de trigo, farinha de espelta, salsicha de soja, seitan, sobremesa de soja e castanha do Brasil) que se podem enquadrar no padrão alimentar vegetariano. Os alimentos estudados foram selecionados, em concordância com respostas dos indivíduos vegetarianos ao Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF) 2015-2016 e as amostras adquiridas foram selecionadas de acordo com as quotas de mercado. Foram produzidas 16 amostras compostas, cada uma constituída por 12 porções individuais de 100 g de diferentes marcas de alimentos, quando possível. Em alguns casos, dentro da mesma amostra composta,

foram utilizadas várias porções da mesma marca por dificuldade em obter 12 marcas diferentes, tendo-se adquirido um total de 124 alimentos para este estudo. Para concluir a elaboração das amostras compostas, estas foram homogeneizadas conforme o tipo de matriz do alimento.

As amostras foram sujeitas a uma digestão ácida por microondas e os teores dos minerais Fe, Zn, Mg, Ca, Na, P e K, em mg/ 100 g de alimento, foram determinados por ICP-OES. O método analítico utilizado encontra-se validado e acreditado segundo a Norma NP ISO/IEC 17025 para matrizes alimentares como leite e produtos lácteos, cereais e derivados e alimentos confeccionados.

### \_Resultados e discussão

Para a análise de resultados, de forma a garantir que tanto indivíduos do género masculino como feminino conseguiriam alcançar as DDR correspondentes ao seu género, considerou-se como DDR o valor mais elevado entre géneros, para cada mineral. Foi ainda tida em conta a recomendação para vegetarianos de mais 80% de Fe e 50% de Zn (6,9).

Na **tabela 1** apresentam-se os resultados da determinação do teor de minerais nas amostras, expressos em mg/100 g de alimento. Observa-se que as sementes de chia fornecem mais do que a DDR de P por 100 g de alimento. Contudo, é de notar que 100 g de alimento é um valor teórico, não sendo, por vezes, o utilizado na prática – as sementes de chia, por exemplo, têm uma recomendação de ingestão máxima de 15 g por dia.

Na **tabela 2** apresenta-se o resultado para cada mineral expresso em percentagem da DDR, por 100 g de alimento. Segundo o Regulamento (UE) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011, um mineral encontra-se em quantidade significativa num alimento se apresentar pelo menos 15% da sua DDR, por 100 g de alimento (10). Já o Regulamento (CE) nº 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de dezembro de 2006, refere que o facto de um alimento conter um mineral em quantidade significativa, ou no dobro desta quantidade, por 100 g de alimento, permite alegar, respetivamente, que os



artigos breves\_ n. 6

alimentos são “fonte de” ou têm “elevado teor de” o mineral em questão (11). Desta forma, na **tabela 2** destacam-se os minerais presentes nos alimentos em quantidade significativa e os minerais presentes em pelo menos o dobro da quantidade significativa. Assim, verifica-se que, nesta gama de amostras, as sementes de chia e a proteína texturizada de soja são as que apresentam mais minerais em quantidade significativa, por 100 g de alimento.

No que diz respeito aos minerais, observa-se que o Fe, o Zn e o K são os que estão menos presentes em quantidade significativa, como descrita no Regulamento (UE) nº 1169/2011 (10), nos alimentos estudados. Isto era expectável uma vez que as amostras analisadas não são representativas das principais

fontes alimentares destes minerais, que consistem em alimentos de origem animal no caso do Fe e Zn, e em leguminosas, oleaginosas e fruta, no caso do K. Quanto ao Ca, as suas principais fontes alimentares são os laticínios que, se forem excluídos, como acontece nos tipos mais restritos da dieta vegetariana, podem levar a um maior risco de défice de ingestão deste mineral, se não for realizado um bom planeamento alimentar (6,8). Por outro lado, o P é o mineral encontrado mais frequentemente em quantidade significativa nas amostras analisadas, o que também era de esperar uma vez que o P está muito presente na generalidade dos alimentos (8).

**Tabela 1:** ↓ Teores de minerais determinados por ICP-OES nos alimentos estudados (n=16), expressos em mg/100 g de alimento.

		Fe	Zn	Mg	Ca	Na	P	K
DDR		32,4	16,5	420	1200	1500	700	4700
Alimentos	Bagas de goji	4,2	1,0	72	48	418	177	1410
	Sementes de chia	7,7	5,7	320	579	<8,0*	761 <sup>a</sup>	711
	Proteína texturizada de soja	8,3	4,6	278	277	<8,0*	654	2230
	Queijo fresco de vaca meio-gordo	<0,2*	1,6	18	385	270	273	152
	Queijo fresco de vaca magro	<0,2*	1,7	25	482	329	348	251
	Queijo fresco de cabra	<0,2*	1,4	26	429	394	301	156
	logurte grego com fruta	<0,2*	0,3	9,0	95	33	80	146
	"logurte" de soja	0,2	0,2	14	93	36	65	109
	logurte grego natural sem açúcar	<0,2*	0,3	8,0	101	32	97	141
	Trigo sarraceno	2,4	1,8	191	15	<8,0*	370	423
	Bulgur de trigo	1,9	2,1	68	28	10	213	330
	Farinha de espelta	3,0	2,8	89	26	<8,0*	308	336
	Salsicha de soja	1,3	0,6	15	43	637	80	59
	Seitan	1,3	1,0	13	20	191	53	30
	Sobremesa de soja	1,0	0,3	18	132	37	95	167
	Castanha do Brasil	2,5	4,0	377	165	<8,0*	677	611

Doses diárias recomendadas (DDR), mg/dia; <sup>a</sup> Valor superior às DDR consideradas (valor referente ao género que necessita de maior aporte), incluindo as recomendações para vegetarianos de mais 80% Fe e 50% Zn, por 100 g de alimento (6,9); \*Teor no alimento inferior ao limite de quantificação do método.



Tabela 2: ↓ Percentagem da dose diária recomendada para cada mineral, por 100 g de alimento.

Alimentos	Fe	Zn	Mg	Ca	Na	P	K
Bagas de goji	13	6	17	4	28	25	30
Sementes de chia	24	34	76	48	-	109	15
Proteína texturizada de soja	26	28	66	23	-	93	48
Queijo fresco vaca meio gordo	-	10	4	32	18	39	3
Queijo fresco vaca magro	-	10	6	40	22	50	5
Queijo fresco cabra	-	8	6	36	26	43	3
logurte grego com fruta	-	2	2	8	2	11	3
"logurte" de soja	-	1	3	8	2	9	2
logurte grego natural sem açúcar	-	2	2	8	2	14	3
Trigo sarraceno	7	13	45	1	-	53	9
Bulgur de trigo	6	12	16	2	1	30	7
Farinha de espelta	9	17	21	2	-	44	7
Salsicha de soja	4	3	4	4	42	11	1
Seitan	4	6	3	2	13	8	1
Sobremesa de soja	3	2	4	11	2	14	4
Castanha do Brasil	8	24	90	14	-	97	13

Resultados em percentagem (%) do valor da dose diária recomendada (DDR) considerado (valor referente ao género que necessita de maior aporte), incluindo as recomendações para vegetarianos de mais 80% Fe e 50% Zn, por 100 g de alimento (6,9). Preenchimento a azul, mineral em quantidade significativa ( $\geq 15\%$  DDR/ 100 g alimento); Preenchimento a verde, mineral em pelo menos o dobro da quantidade significativa ( $\geq 30\%$  DDR/ 100 g alimento).

## \_Conclusão

Em suma, verifica-se que os minerais Fe e Zn são os que se apresentam menos vezes em quantidade significativa ao longo desta gama de amostras de alimentos que podem ser incluídos na dieta vegetariana. Se excluirmos os laticínios, como acontece nos tipos mais restritos deste padrão alimentar, o mesmo se verifica para o Ca. Por fim, salienta-se a necessidade de alargar este estudo a outros alimentos que se incluam na dieta vegetariana, de forma a assegurar um conhecimento fidedigno da sua composição e assim promover escolhas alimentares mais informadas.

## Financiamento:

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto Infraestrutura para a Promoção da Metrologia na Fase Preparatória de Ali-

mentos e Nutrição (METROFOOD-PP) (Programa de Pesquisa e Inovação Horizonte 2020 da União Europeia, acordo de subvenção n.º 871083).

## Referências bibliográficas:

- (1) Leitzmann C. Vegetarian nutrition: past, present, future. *Am J Clin Nutr.* 2014 Jul;100 Suppl 1:496S-502S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071365>
- (2) Dinu M, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Sofi F. Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Nov 22;57(17):3640-49. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1138447>
- (3) Craig WJ. Health effects of vegan diets. *Am J Clin Nutr.* 2009 May;89(5):1627S-1633S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736N>
- (4) Melina V, Craig W, Levin S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *J Acad Nutr Diet.* 2016 Dec;116(12):1970-80. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.09.025>



artigos breves\_ n. 6

- (5) Craig WJ. Nutrition concerns and health effects of vegetarian diets. *Nutr Clin Pract.* 2010 Dec;25(6):613-20. <https://doi.org/10.1177/0884533610385707>
- (6) Silva SCG, Pinho JP, Borges C, et al. Linhas de Orientação para uma Alimentação Vegetariana Saudável. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Lisboa: PNPAS.DGS, 2015. <https://nutrimento.pt/manuais-pnpas/linhas-de-orientacao-para-uma-alimentacao-vegetariana-saudavel/>
- (7) Candeias V, Morais C. Sais Minerais. Lisboa: Divisão de Promoção e Educação para a Saúde. Direcção-Geral da Saúde, 2017. <https://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-1/alimentacao-minerais-pdf.aspx>
- (8) Gibney MJ, Lanham-New SA, Cassidy A, et al. (eds). *Introduction to human nutrition.* 2nd ed. The Nutrition Society: Wiley-Blackwell, 2009.
- (9) Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc.* Washington (DC): National Academies Press (US), 2001.
- (10) União Europeia. Regulamento (UE) N.o 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.o 1924/2006 e (CE) n.o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.o 608/2004 da Comissão JO 22.11.2011:L 304/18–63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (11) Comissão Europeia. Rectificação ao Regulamento (CE) n.o 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de dezembro, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. JO 18.1.2007:L 12/3-18. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:012:0003:0018:PT:PDF>

## \_Exposição do trato gastrointestinal à aflatoxina B<sub>1</sub>: um impacto negligenciado?

### *Exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> in the gastrointestinal tract: an overlooked impact?*

Inês Serrenho<sup>1,2</sup>, Ricardo Assunção<sup>1,3,4</sup>, Paula Alvito<sup>1,3</sup>

paula.alvito@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(4) Centro de Investigação em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

A exposição humana a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) através da ingestão de alimentos contaminados e o seu impacto no trato gastrointestinal (TGI) constitui um domínio de crescente interesse científico. Para além do conhecido potencial carcinogénico, os estudos experimentais em linhas celulares, em animais e em populações humanas têm evidenciado um relevante impacto desta micotoxina no TGI, incluindo no sistema imunitário do intestino, órgão responsável por cerca de 70% das defesas do organismo. A AFB<sub>1</sub> tem a capacidade de provocar alterações na barreira intestinal afetando o seu equilíbrio e dinâmica, o que pode induzir o aparecimento de inflamações intestinais crónicas, entre outras patologias. Estas alterações podem afetar a população em geral, contudo podem constituir uma preocupação acrescida para populações vulneráveis como grávidas e crianças, em virtude da transferência de AFB<sub>1</sub> através da placenta. Assim, o presente trabalho tem como objetivo sensibilizar a comunidade científica para o potencial impacto da micotoxina AFB<sub>1</sub> no intestino e contribuir para alertar e capacitar os profissionais de saúde com conhecimento científico, por forma a atuarem, da forma mais adequada, face ao eventual aumento das patologias associadas ao TGI, que poderão ocorrer em virtude do maior número de ocorrências de contaminação alimentar por AFB<sub>1</sub>, expectável como consequência das alterações climáticas.

### \_Abstract

Human exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) through contaminated food ingestion and its impact on the gastrointestinal tract (GIT) is a field of scientific growing interest. In addition to the recognized carcinogenic potential, experimental studies on cell lines, animals and human populations have shown a relevant impact of this mycotoxin on GIT, including on the innate immunity of the intestine, the organ responsible for about 70% of the body's defenses. AFB<sub>1</sub> has the ability to disrupt the intestinal barrier affecting its balance and dynamics, and could promote the development of chronic intestinal inflammation, among other pathologies. These conditions may affect the general population and could constitute a matter of increased concern for vulnerable populations, such as pregnant women and children, due to the AFB<sub>1</sub> transfer across the placenta. Therefore, this study aims to sensitize the scientific community for the potential impact of the mycotoxin AFB<sub>1</sub> in the GIT and to contribute to alert and empower the health professionals to act based on a deeper scientific knowledge, when faced with a possi-

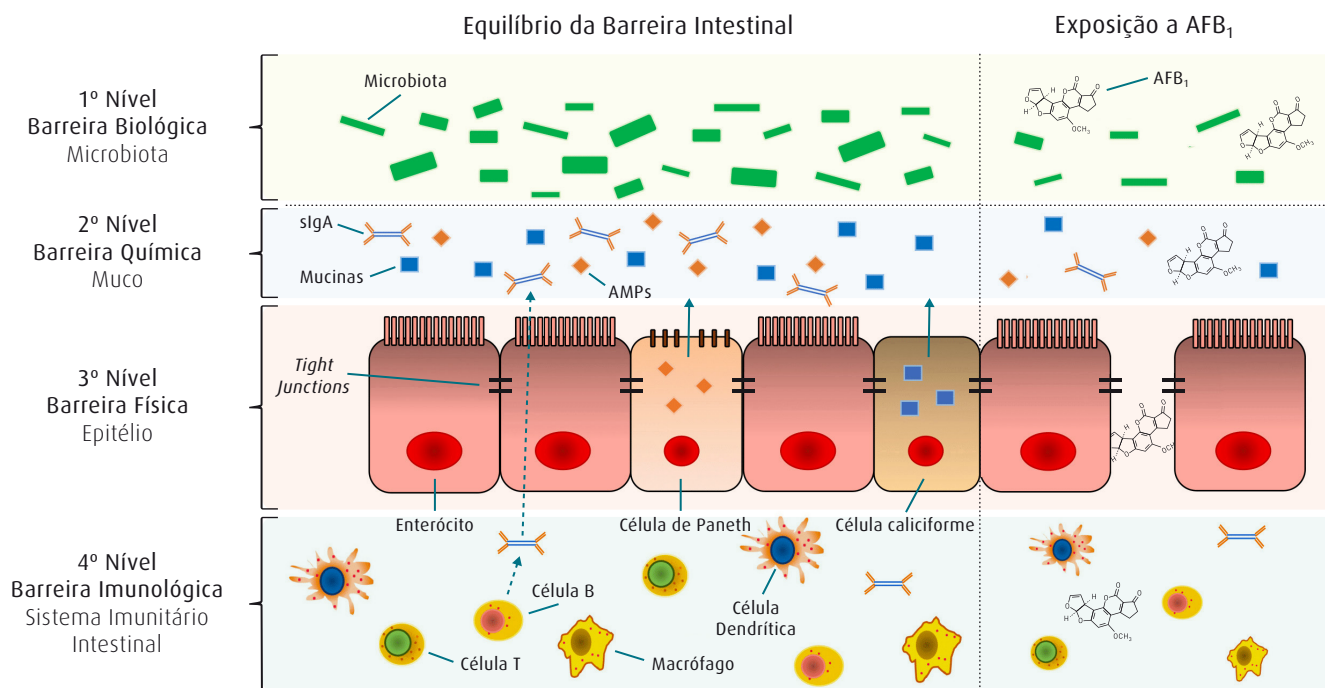
ble increase in the number of pathologies associated to the GIT, which could occur as a result of the expected increase of food contamination by AFB<sub>1</sub> as a consequence of climate change.

### \_Introdução

O intestino é um dos primeiros órgãos a contactar com os alimentos, após a sua ingestão. A absorção de contaminantes presentes nos alimentos, como as micotoxinas (metabólitos tóxicos produzidos por fungos) ocorre principalmente no intestino delgado (onde se efetua 90% da absorção total do que se ingere). É ainda neste órgão que ocorrem os níveis de exposição de contaminantes mais elevados (1-6). O intestino representa também a primeira linha de defesa contra possíveis infeções intestinais formando uma barreira entre o lúmen (meio externo) e a corrente sanguínea (meio interno) (4-11). A barreira intestinal está dividida em quatro níveis de proteção conforme se representa na figura 1: 1) microbiota (barreira biológica), constituída por bactérias comensais presentes no lúmen intestinal, com um papel fundamental na homeostase da saúde intestinal, 2) muco (barreira química) constituído por mucinas (MUC) e peptídeos antimicrobianos (AMPs), produzidos pelas células caliciformes e pelas células de Paneth, respetivamente, impedindo que as bactérias luminas estabeleçam um contacto direto com o epitélio, 3) epitélio (barreira física) constituído por uma monocamada de células epiteliais semipermeáveis (enterócitos) que se encontram ligadas por junções de oclusão (*tight junctions*) constituídas por proteínas transmembranares, moléculas de adesão juncional (JAMs), claudinas e ocludinas, que regulam seletivamente a passagem de nutrientes e água e impedem a passagem de moléculas nocivas, através da via paracelu-



Figura 1: Representação esquemática da barreira intestinal numa situação de homeostase (normal) e numa situação de exposição à micotoxina AFB<sub>1</sub> (adaptado de Gao, et al., 2020) (12).



slgA = imunoglobulina A secretora; AMPs = peptídeos antimicrobianos

lar e transcelular no intestino, e 4) sistema imunitário intestinal (barreira imunológica) constituído por células imunes (células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e T) e mediadores imunológicos (citocinas e imunoglobulina A secretora (slgA)), que regulam as respostas inflamatória e imune (4,7-10,12-16).

Uma barreira intestinal equilibrada e dinâmica é essencial para que exista uma proteção eficiente. Ao afetar a barreira intestinal, a AFB<sub>1</sub> vai perturbar este equilíbrio fazendo com que haja uma disrupção da barreira e tornando o organismo mais suscetível a inflamações intestinais crónicas, alterações imunológicas e metabólicas que levam ao aparecimento de doenças inflamatórias, principalmente em indivíduos geneticamente predispostos, como é o caso da doença celíaca e de Crohn ou da colite ulcerosa (1,3,14,17-23).

Em virtude dos efeitos adversos para a saúde, o grupo das aflatoxinas (AFs) foi incluído no Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que estabelece valores máximos de AFs em alimentos, destinados a crianças e adultos (1-3,24). Estas são produzidas por diversas espécies de fungos do género *Aspergillus* e incluem as aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>),

G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) e M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), metabolito de AFB<sub>1</sub> que pode ser encontrado no leite de mamíferos. A AFB<sub>1</sub> é o mais potente carcinogéneo hepático conhecido em mamíferos, estando por isso incluída no grupo 1 (carcinogénico para humanos), segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC, na sigla em inglês), para além disso, apresenta ainda propriedades mutagénicas, teratogénicas e imunossupressoras (11,13,16,25). Esta micotoxina está presente numa grande variedade de alimentos como é o caso dos amendoins, frutos de casca rija, frutos secos, cereais e ainda especiarias (25). Em Portugal a exposição a AFB<sub>1</sub> através do consumo de cereais foi considerada uma potencial preocupação para a saúde das crianças até aos 3 anos, em particular, as que consumiam elevadas quantidades deste grupo de alimentos (26,27). Face à evidência de que a AFB<sub>1</sub> tem a capacidade de atravessar a placenta e de ser transferida para o feto durante a gestação, tornando-o suscetível aos potenciais efeitos decorrentes desta exposição, será importante conhecer o impacto da exposição precoce a esta micotoxina. Este objetivo integra-se no âmbito do projeto earlyMYCO, que visa avaliar a exposição



artigos breves\_ n. 7

a micotoxinas de pares mãe-filho(s) através da biomonitorização, avaliar o impacto das micotoxinas no sistema imunitário intestinal e na microbiota intestinal através de estudos *in vivo* e caracterizar o risco desta exposição (28).

Os principais efeitos agudos decorrentes da ingestão de aflatoxinas são as aflatoxicoses, que correspondem a hepatites agudas associadas a vômitos, dores abdominais e edemas, podendo, nos casos mais graves, levar à morte. Contudo um dos maiores problemas associados a esta micotoxina, é a exposição crónica podendo contribuir para o aparecimento de cancro hepático (13). Na Europa, e em particular nos países da região mediterrânica como Portugal, prevê-se um aumento de contaminação dos cereais (particularmente no milho) por AFB<sub>1</sub> em virtude da subida de temperatura decorrente das alterações climáticas, permitindo o desenvolvimento de espécies fúngicas toxigénicas em temperaturas próximas dos 33 °C, como é o caso da espécie *Aspergillus flavus*, produtor de AFB<sub>1</sub> (29,30).

É por isso importante contribuir para disseminar o conhecimento científico relativo aos efeitos adversos da exposição a AFB<sub>1</sub>, em especial para o intestino, visto a principal via de exposição a esta micotoxina ser a ingestão de alimentos, por forma a contribuir para a proteção da saúde humana e, em especial, das populações mais vulneráveis.

### \_Objetivo

Este trabalho tem como objetivo sensibilizar a comunidade para o potencial impacto da micotoxina AFB<sub>1</sub> no intestino, contribuindo para alertar e capacitar os profissionais de saúde com conhecimento científico neste domínio, por forma a gerir, da forma mais adequada, um eventual aumento das patologias associadas ao TGI. Estas poderão afetar, num futuro próximo, a população em geral, mas, em particular, as populações vulneráveis como grávidas e crianças, em virtude das alterações climáticas e do aumento da contaminação dos alimentos por AFB<sub>1</sub>, previstos para a Europa.

### \_Materiais e métodos

A pesquisa bibliográfica para este estudo foi realizada em 2021, através das bases bibliográficas *Web of Science* e *PubMed*, tendo sido efetuadas sete pesquisas individuais

incluindo os termos “Aflatoxin B<sub>1</sub>” (comum a todas as buscas) e “Caco-2 cells”, “Intestinal integrity”, “Transport”, “Intestinal immunity”, “Microbiota”, “Antimicrobial response”, “Proteins expression and tight junctions”, para o período 2000-2020. De um total de 265 referências encontradas, foram excluídas 208 (correspondendo a duplicados e estudos fora do contexto pretendido) e analisadas 57.

### \_Resultados e discussão

Face à importância das potenciais consequências nefastas para a saúde humana, decorrentes da exposição a AFB<sub>1</sub>, em particular do impacto no trato gastrointestinal (TGI), têm sido realizados diversos estudos sobre a absorção e transporte desta micotoxina no intestino, nomeadamente ao nível do muco e epitélio intestinal, aplicando metodologias *in vitro*, como a cultura e cocultura de células epiteliais intestinais humanas (5,16,31,32). Neste âmbito são descritos dois modelos de culturas celulares maioritariamente utilizados: 1) Células Caco-2, originalmente isoladas de um adenocarcinoma de cólon humano e 2) coculturas de células Caco-2 e HT29-MTX, também isoladas de um carcinoma colorrectal. As células Caco-2 são reconhecidas como modelo de referência pela *Food and Drug Administration* (FDA) mimetizando a camada epitelial do intestino delgado (enterócitos) (4,6,10). As coculturas de células Caco-2/HT29-MTX, representam um aperfeiçoamento do modelo de células Caco-2 visto que as células HT29 são capazes de produzir muco através das células caliciformes simulando de forma mais eficiente o intestino delgado nos estudos de absorção, inflamação e toxicidade (5,6).

Ao nível dos estudos da microbiota e do sistema imunitário intestinal, realizaram-se na sua maioria, estudos *in vivo* (19,20,34-36) usando ratos, mas também outras espécies, como os porcos, devido à semelhança anatómica do TGI com o dos humanos (6,23,33).

No quadro 1 encontra-se uma descrição sumarizada dos principais efeitos decorrentes da exposição a AFB<sub>1</sub>, nos quatro níveis da barreira intestinal, observados em estudos *in vitro* e *in vivo*, efetuados nas últimas duas décadas.



**Quadro 1:** ↓ Resumo dos principais efeitos da micotoxina AFB<sub>1</sub> na barreira intestinal (microbiota, muco, epitélio e sistema imunitário intestinal) obtidos através de estudos *in vitro* e *in vivo* efetuados entre 2000-2020.

Nível da barreira intestinal	Tipo de estudo/ espécie	Principais efeitos	Referências
Microbiota	<i>In vivo</i> – Ratos ( <i>Rattus</i> e <i>Mus musculus</i> )	Redução da diversidade microbiana no cólon Efeitos adversos na população de bactérias ácido-lácticas Proporção de <i>Firmicutes</i> e <i>Bacteroidetes</i> inalterada	(21,22)
	<i>In vivo</i> – Galinhas ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Aumento no número total de bactérias gram-negativas Alterações nos padrões de fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(33)
	<i>In vivo</i> – Leitões ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Aumento da abundância relativa dos filos <i>Bacteroidetes</i> e <i>Proteobacteria</i> Diminuição da abundância do filo <i>Firmicutes</i>	(23)
Muco (feito em AFM <sub>1</sub> )	<i>In vitro</i> – cocultura Caco-2/HT29-MTX	Modulação do mRNA e da produção das proteínas MUC2, MUC5AC e MUC5B Redução dos níveis de transcrição de MUC5B e MUC5AC	(38)
	<i>In vitro</i> – cocultura Caco-2/HT29-MTX	Alteração significativa da expressão e produção das mucinas e da abundância de proteínas Aumento significativo de proteínas MUC2 e MUC5B seguido de uma regulação negativa das mucinas	(39)
Epitélio	<i>In vitro</i> – células Caco-2	Comprometimento da permeabilidade da barreira das células epiteliais intestinais Diminuição da área de absorção Ocorrência de inflamações e lesões intestinais	(13,25)
	<i>In vitro</i> – células Caco-2	Diminuição dos valores de resistência transepitelial (TEER) Aumento da permeabilidade paracelular	(13,25)
	<i>In vitro</i> – células Caco-2	Morte celular Danos no DNA de células diferenciadas e não diferenciadas Diminuição da expressão do mRNA de claudina-3 e ocludina	(13,15,25, 31,40-42)
Sistema imunitário intestinal	<i>In vivo</i> – Galinhas ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Aumento da suscetibilidade de galinhas a infeções intestinais por <i>S. typhimurium</i> e <i>Salmonella</i> spp. Aumento, no jejuno e no íleo, do número de macrófagos e células CD8+ e diminuição das células CD4+	(19)
	<i>In vivo</i> – Humanos ( <i>Homo sapiens</i> )	Aumento da suscetibilidade a infeções bacterianas e parasitárias Alteração da imunidade adquirida	(37)
	<i>In vitro</i> – Monócitos humanos	Diminuição da fagocitose e atividade microbicida dos monócitos da secreção de IL-1, IL-6 e do fator de necrose tumoral	(37)
	<i>In vivo</i> – Peru doméstico ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	Respostas inflamatórias levam a infiltração de monócitos Alterações na expressão de citocinas pro-inflamatórias	(35)
	<i>In vivo</i> – Aves de capoeira ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Regulação significativa dos transcritos de diversos genes de resposta à IL-2 Inibição da atividade dos linfócitos T e B e da produção de anticorpos e de macrófagos Alterações nos fenótipos das células T Diminuição da percentagem de células B Inibição do fator de necrose tumoral-α (TNF-α), IFN-γ e das interleucinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17	(20,36)
<i>In vivo</i> – camarão ( <i>L. vannamei</i> )	Aumento da expressão relativa de Toll, proPO, Rab, GST e IMD (genes imunes representativos importantes no intestino), seguindo-se uma diminuição total da expressão dos mesmos	(34)	



## 1. Microbiota

A maioria dos estudos sobre o efeito da AFB<sub>1</sub> na microbiota (barreira biológica) foi efetuada usando animais tendo sido referido, de uma forma geral, que existem diferenças significativas entre a composição da microbiota intestinal dos grupos controlo em comparação com as dos grupos experimentais, existindo uma maior abundância do número de espécies de bactérias e de bactérias em cada espécie, nos grupos controlo, tanto a nível do filo como do género (14,21-23,33).

## 2. Muco

A literatura disponível neste domínio foi escassa tendo sido identificados só dois estudos sobre os efeitos da micotoxina AFM<sub>1</sub> no muco (barreira química). Os resultados evidenciaram uma modulação significativa dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e produção de proteínas das mucinas MUC<sub>2</sub>, MUC5A e MUC5B, pela AFM<sub>1</sub> (metabolito da AFB<sub>1</sub>) refletindo a influência direta das AFs na composição (proteínas) e função (proteção) do muco, podendo levar a inflamações gastrointestinais e até mesmo ao aparecimento de cancros (38,39).

## 3. Epitélio

Na figura 1 representa-se esquematicamente o efeito da AFB<sub>1</sub> nas células epiteliais intestinais Caco-2 evidenciando um aumento da permeabilidade paracelular (entre duas células adjacentes) traduzida na alteração da resistência transepitelial (TEER), diminuição da área de absorção, e desencadeando processos inflamatórios e lesões intestinais (13,25). Verificou-se ainda que após a exposição, ocorria morte celular (em função do tempo e concentração), danos do ácido desoxirribonucleico (DNA) de células diferenciadas e não diferenciadas e diminuição da expressão do mRNA de claudina-3 e ocludina, nas proteínas de junção oclusiva (13,15,25,31,40-42).

## 4. Sistema imunitário intestinal

No que diz respeito aos efeitos da AFB<sub>1</sub> no sistema imunitário intestinal, verifica-se que estes são bastante complexos e a bibliografia escassa. Os seis estudos publicados revelaram, de um modo geral, um aumento da suscetibilidade dos animais e humanos (crianças) a infeções bacterianas e para-

sitárias (19,37), alteração da população de macrófagos e células imunitárias, alteração na expressão de citocinas pré-inflamatórias, inibição da atividade dos linfócitos B e T e diminuição total dos genes imunes, no intestino (20,34-37).

## \_Conclusões

Com os resultados descritos neste trabalho, evidencia-se o forte impacto que a micotoxina AFB<sub>1</sub> poderá provocar nos quatro níveis da barreira intestinal, comprometendo a imunidade do intestino e consequentemente, de todo o organismo.

A manutenção do equilíbrio intestinal é de extrema importância visto que contribui para a saúde do organismo e, por isso, perturbações, como a disfunção da barreira intestinal, podem originar efeitos adversos para a saúde humana, como é o caso das doenças inflamatórias intestinais.

Dado que se torna cada vez mais evidente que a exposição precoce a contaminantes químicos pode levar ao aparecimento de doenças no adulto, tais como infeções, cancro, diabetes e doenças autoimunes, torna-se, pois, importante desenvolver estudos que visem avaliar a importância do ambiente intrauterino e dos primeiros anos de vida na saúde da criança e do futuro adulto.

## Financiamento:

Os autores agradecem à FCT/MCTES pelo financiamento com fundos nacionais relativos ao projeto earlyMYCO (PTDC/MEDTOX/28762/2017) e ao CESAM (UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020). R.A. agradece pelo FCT Individual CEEC 2018 Assistant Researcher Grant CEECIND/01570/2018.

## Referências bibliográficas:

- (1) Maresca M, Fantini J. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicol.* 2010 Sep 1;56(3):282-94. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.04.016>
- (2) Vidal A, Ouhibi S, Ghali R, Hedhili A, De Saeger S, De Boevre M. The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food Chem Toxicol.* 2019 Jul;129:249-56. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>
- (3) Grenier B, Applegate TJ. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins (Basel).* 2013 Feb 21;5(2):396-430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>



artigos breves\_ n. 7

- (4) Gao Y, Li S, Wang J, et al. Modulation of Intestinal Epithelial Permeability in Differentiated Caco-2 Cells Exposed to Aflatoxin M1 and Ochratoxin A Individually or Collectively. *Toxins (Basel)*. 2017 Dec 27;10(1):13. <https://doi.org/10.3390/toxins10010013>
- (5) Pan F, Han L, Zhang Y, et al. Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int J Food Sci Nutr*. 2015;66(6):680-5. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077792>
- (6) Markus J, Landry T, Stevens Z, et al. Human small intestinal organotypic culture model for drug permeation, inflammation, and toxicity assays. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2021 Feb;57(2):160-73. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00526-6>
- (7) Pinton P, Nougayrède JP, Del Rio JC, et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 May 15;237(1):41-8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.003>
- (8) Assunção R, Alvito P, Kleiveland CR, et al. Characterization of in vitro effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. *Toxicol Lett*. 2016 May 27;250 251:47-56. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.007>
- (9) Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jul;124(1):3-20; quiz 21-2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- (10) Pal S, Singh N, Ansari KM. Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicol Res (Camb)*. 2017 Aug 9;6(6):764-71. <https://doi.org/10.1039/c7tx00138j>
- (11) Caloni F, Cortinovis C, Pizzo F, et al. Transport of Aflatoxin M(1) in Human Intestinal Caco-2/TC7 Cells. *Front Pharmacol*. 2012 Jun 11;3:111. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00111>
- (12) Gao Y, Meng L, Liu H, et al. The Compromised Intestinal Barrier Induced by Mycotoxins. *Toxins (Basel)*. 2020 Sep 28;12(10):619. <https://doi.org/10.3390/toxins12100619>
- (13) Robert H, Payros D, Pinton P, et al. Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2017;20(5):249-75. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1326071>
- (14) Wang Y, Wang B, Liu M, et al. Aflatoxin B1 (AFB1) induced dysregulation of intestinal microbiota and damage of antioxidant system in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 2018;495:940-47. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.065>
- (15) Romero A, Ares I, Ramos E, et al. Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: Protective effect of illite mineral clay. *Toxicology*. 2016 Apr 15;353-354:21-33. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.003>
- (16) Akbari P, Braber S, Varasteh S, et al. The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Arch Toxicol*. 2017 Mar;91(3):1007-29. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1794-8>
- (17) Liu Q, Li F, Zhuang Y, et al. Alteration in gut microbiota associated with hepatitis B and non-hepatitis virus related hepatocellular carcinoma. *Gut Pathog*. 2019 Jan 18;11:1. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0281-6>
- (18) Fang H, Wang B, Jiang K, et al. Effects of *Lactobacillus pentosus* HC-2 on the growth performance, intestinal morphology, immune-related genes and intestinal microbiota of *Penaeus vannamei* affected by aflatoxin B1. *Aquaculture*. 2020;525:735289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735289>
- (19) Kraieski AL, Hayashi RM, Sanches A, et al. Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeria vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. *Poult Sci*. 2017 May 1;96(5):1078-87. <https://doi.org/10.3382/ps/pew397>
- (20) Park SH, Kim D, Kim J, et al. Effects of Mycotoxins on mucosal microbial infection and related pathogenesis. *Toxins (Basel)*. 2015 Oct 30;7(11):4484-502. <https://doi.org/10.3390/toxins7114484>
- (21) Yang X, Liu L, Chen J, et al. Response of Intestinal Bacterial Flora to the Long-term Feeding of Aflatoxin B1 (AFB1) in Mice. *Toxins (Basel)*. 2017 Oct 12;9(10):317. <https://doi.org/10.3390/toxins9100317>
- (22) Wang J, Tang L, Glenn TC, et al. Aflatoxin B1 Induced Compositional Changes in Gut Microbial Communities of Male F344 Rats. *Toxicol Sci*. 2016 Mar;150(1):54-63. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv259>
- (23) Grosu IA, Pistol GC, Taranu I, et al. The Impact of Dietary Grape Seed Meal on Healthy and Aflatoxin B1 Afflicted Microbiota of Pigs after Weaning. *Toxins (Basel)*. 2019 Jan 8;11(1):25. <https://doi.org/10.3390/toxins11010025>
- (24) Comissão Europeia. Regulamento (CE) n.o 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. JO 20.12.2006: L 364/5-24. <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>
- (25) Buszewska-Forajta M. Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals. *Toxicon*. 2020 Jul 30;182:34-53. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.04.101
- (26) Assunção R, Martins C, Vasco E, et al. Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – An overview of risk assessment under MYCOMIX project. *Food Chem Toxicol*. 2018 Aug;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>
- (27) Assunção R, Vasco E, Nunes B, et al. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. *Food Chem Toxicol*. 2015 Dec;86:274-81. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.017>
- (28) Alvito P, Bastos-Amador P, Duarte EL, et al. Exposição precoce a micotoxinas: o contributo dos projetos MYCOMIX e earlyMYCO. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2020 maio-agosto;9(27):16-27. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7235>
- (29) Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, et al. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep*. 2016 Apr 12;6:24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- (30) Assunção R, Martins C, Viegas S, et al. Impacto das alterações climáticas na exposição da população portuguesa a aflatoxinas. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2018 maio-agosto;7(22):25-28. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5587>
- (31) Sobral MMC, Faria MA, Cunha SC, et al. Transport of mycotoxins across human gastric NCI-N87 and intestinal Caco-2 cell models. *Food Chem Toxicol*. 2019 Sep;131:110595. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110595>
- (32) Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(suppl):280-89. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.005>
- (33) Galarza-Seeber R, Latorre JD, Bielke LR, et al. Leaky Gut and Mycotoxins: Aflatoxin B1 Does Not Increase Gut Permeability in Broiler Chickens. *Front Vet Sci*. 2016 Feb 15;3:10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00010>
- (34) Wang Y, Wang B, Liu M, et al. Comparative transcriptome analysis reveals the different roles between hepatopancreas and intestine of *Litopenaeus vannamei* in immune response to aflatoxin B1 (AFB1) challenge. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2019 Aug;222:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.006>
- (35) Monson MS, Settlege RE, Mendoza KM, et al. Modulation of the spleen transcriptome in domestic turkey (*Meleagris gallopavo*) in response to aflatoxin B1 and probiotics. *Immunogenetics*. 2015 Mar;67(3):163-78. <https://doi.org/10.1007/s00251-014-0825-y>
- (36) Monson M, Coulombe R, Reed K. Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B1 in Poultry. *Agriculture*. 2015;5(3):742-77. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030742>
- (37) Turner PC, Moore SE, Hall AJ, et al. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ Health Perspect*. 2003 Feb;111(2):217-20. <https://doi.org/10.1289/ehp.5753>
- (38) Wu C, Gao Y, Li S, et al. Modulation of intestinal epithelial permeability and mucin mRNA (MUC2, MUC5AC, and MUC5B) expression and protein secretion in Caco-2/HT29-MTX co-cultures exposed to aflatoxin M1, ochratoxin A, and zearalenone individually or collectively. *Toxicol Lett*. 2019 Jul;309:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.010>



artigos breves\_ n. 7

- (39) Huang X, Gao Y, Li S, et al. Modulation of Mucin (MUC2, MUC5AC and MUC5B) mRNA Expression and Protein Production and Secretion in Caco-2/HT29-MTX Co-Cultures Following Exposure to Individual and Combined Aflatoxin M1 and Ochratoxin A. *Toxins (Basel)*. 2019 Feb 23;11(2):132. <https://doi.org/10.3390/toxins11020132>
- (40) Guerra MC, Galvano F, Bonsi L, et al. Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B1- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2). *Br J Nutr*. 2005 Aug;94(2):211-20. <https://doi.org/10.1079/bjn20051425>
- (41) Zhang J, Zheng N, Liu J, et al. Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2015 Sep;83:54-60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.020>
- (42) Sobral MMC, Faria MA, Cunha SC, et al. Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells. *Chemosphere*. 2018 Jul;202:538-48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.122>

## **Vigilância da qualidade nutricional de refeições hospitalares, entre 2017 e 2019**

### *Surveillance of the nutritional quality of hospital meals, between 2017 and 2019*

Ana Cristina Bento, Filipa Matias, Tânia Fontes, Maria João Pires, Ana Cláudia Nascimento, Susana Santiago, Mariana Santos, Isabel Castanheira

[a.cristina.bento@insa.min-saude.pt](mailto:a.cristina.bento@insa.min-saude.pt)

Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

#### **\_Resumo**

A alimentação em meio hospitalar tem vindo a ser objeto de debate junto dos profissionais de saúde, dado o papel determinante que desempenha no tratamento e recuperação do doente. O estudo teve como objetivo avaliar a qualidade nutricional de refeições hospitalares recolhidas entre 2017 e 2019. Foram analisadas laboratorialmente 32 refeições completas constituídas por prato de carne (53,1 %), prato de pescado (40,6%) e vegetariano (6,3%). A avaliação nutricional incluiu a quantificação dos valores de energia, hidratos de carbono, proteína, gordura total, fibra alimentar e sal e posterior estudo da adequabilidade nutricional, através da verificação dos desvios relativos às recomendações nutricionais estabelecidas para uma população que se considerou como sendo de doentes adultos na faixa etária entre os 19 e os 74 anos. As refeições constituídas por prato de carne apresentaram valores médios superiores de densidade energética, proteína, gordura e hidratos de carbono, comparativamente com as restantes refeições. As refeições com prato vegetariano foram as que revelaram um teor médio de sal mais baixo. Nos três tipos de refeições verificou-se um incumprimento das recomendações nutricionais relativamente aos teores de energia, proteína e sal. Este estudo vai ao encontro dos que consideram a vigilância nutricional periódica como uma forma de evidenciar tendências e identificar desvios, permitindo a implementação de ações corretivas apropriadas e atempadas para a melhoria da qualidade nutricional das refeições hospitalares.

#### **\_Abstract**

*The provision of hospital meals has been a topic of debate among health professionals, given the decisive role it plays in the treatment and recovery of patients. This study aimed to assess the nutritional quality of hospital meals collected between 2017 and 2019. A total of 32 complete meals consisting of meat dishes (53.1 %), fish dishes (40.6%) and vegetarian (6.3%) were laboratory analysed. The nutritional evaluation included the quantification of energy, carbohydrates, protein, total fat, dietary fibre and salt contents and subsequent study of nutritional adequacy, through the verification of the deviations relative to the nutritional recommendations established for a population, which was considered to be adult patients aged between 19-74 years. The meals consisting of a meat dish presented higher mean values of energy, protein, fat and carbohydrates when compared with the other meals. In the vegetarian meals, it was observed the lowest mean salt content. In all three types of meals, there was a lack of compliance with the nutritional recommendations in terms of energy, protein and salt content. This study is in accordance with those who consider periodic nutritional surveil-*

*lance as a way to highlight trends and identify deviations, allowing the implementation of appropriate and timely corrective actions to improve the nutritional quality of hospital meals.*

#### **\_Introdução**

A alimentação hospitalar é um tema que tem vindo a ganhar uma maior ênfase entre os profissionais de saúde e a comunidade científica. Uma oferta alimentar adequada aos doentes é uma parte determinante do seu tratamento e recuperação, melhorando a sua qualidade de vida, diminuindo o tempo de recuperação e internamento e a probabilidade de desenvolver complicações ou infeções (1).

A entidade hospitalar, como organização especializada na recuperação do estado de saúde dos seus pacientes, deve reconhecer a alimentação e a terapia nutricional como áreas determinantes no combate à desnutrição hospitalar (2).

A desnutrição do doente hospitalizado é um problema de saúde pública e resulta da prescrição de dietas desequilibradas e da pouca flexibilidade do serviço de alimentação hospitalar (2). Tem efeitos negativos na qualidade de vida e elevados custos para a sociedade e para o sistema de saúde (3).

A elaboração de um Manual das Dietas Hospitalares foi uma das estratégias encontradas pelos hospitais para melhorar a assistência nutricional ao doente hospitalizado. A maioria dos hospitais possui um Manual de Dietas, que difere de hospital para hospital, em termos de terminologia utilizada, tipologia de dietas, composição das refeições e respetivas capitações utilizadas (2).



## artigos breves\_ n. 8

A nível governamental, foi identificada como estratégia para um combate mais efetivo à desnutrição hospitalar, a uniformização e padronização de um Manual das Dietas Hospitalares de âmbito nacional (2).

Garantir, aos pacientes hospitalizados, uma adequada ingestão alimentar, seguindo as recomendações da Roda dos Alimentos Portuguesa e refletindo os princípios básicos de uma alimentação saudável, é fundamental para promover o suporte nutricional adequado à recuperação dos pacientes e da sua qualidade de vida (1). Neste sentido, a vigilância nutricional das refeições servidas em ambiente hospitalar pode ter um papel importante na avaliação de tendências e para alertar para a necessidade de implementação de ações corretivas apropriadas e atempadas, em benefício da refeição que é servida ao doente.

### \_Objetivo

Este estudo tem como objetivo apresentar uma análise dos dados de ocorrência da qualidade nutricional de refeições hospitalares, obtidos no âmbito dos protocolos de vigilância estabelecidos com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), no período compreendido entre 2017 e 2019.

### \_Materiais e métodos

No âmbito dos protocolos de vigilância estabelecidos com o INSA, no período compreendido entre 2017 e 2019, efetuaram-se visitas a unidades de alimentação coletiva, tendo as colheitas sido efetuadas sem aviso prévio e de acordo com a periodicidade estabelecida para cada Unidade. Neste período foram analisadas 32 refeições, classificadas, de acordo com o *Manual das Dietas Hospitalares*, em dieta geral, destinada a doentes que não requerem modificações alimentares específicas (n=28), dieta mole, destinada a doentes com dificuldade de mastigação e/ou deglutição e digestão (n=2), e em dieta vegetariana destinada a doentes que não consomem alimentos de origem animal ou seus derivados. (n=2) (tabela 1).

As porções de alimentos, por refeição, foram determinadas pelo pessoal da unidade, numa base de "como é servido", representando assim o que é fornecido a cada doente na refeição (almoço).

Todos os componentes da refeição completa (sopa, prato principal, sobremesa/fruta e uma unidade de pão) foram pesados no dia da receção no laboratório, de seguida foram triturados e homogeneizados constituindo uma *pool*, que representa a amostra da refeição a analisar. As amostras foram conservadas a -20° C até serem analisadas.

A avaliação da composição nutricional por refeição (parte edível) incluiu a determinação dos teores de proteína, gordura total, fibra alimentar e sódio por métodos internos desenvolvidos e validados pelo laboratório, e de acordo com normas europeias ou internacionais (4).

O teor de hidratos de carbono totais (disponíveis) foi calculado por diferença (100 g - (gordura + proteínas + cinzas + humidade + fibra)). O valor energético (kcal) e o teor de sal foram calculados de acordo com o Regulamento 1169/2011 da UE (União Europeia) (5).

As análises foram realizadas, em condições de garantia da qualidade cumprindo os requisitos descritos na Norma EN ISO/IEC 17025 (6).

Foram ainda analisados os desvios observados entre os resultados analíticos obtidos e as recomendações nutricionais estabelecidas. A referência foi definida para uma população de doentes adultos, na faixa etária dos 19 aos 74 anos que não requerem modificações alimentares específicas. Considerou-se ainda que a refeição do almoço deverá contribuir com 30% do valor energético diário (7).

Na análise estatística, a descrição das variáveis foi realizada por refeição e tipo de prato, com recurso a estatísticas de tendência central (média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo). Para avaliar a diferença entre grupos utilizou-se o teste Kruskal-Wallis e testes *post-hoc*, de comparações múltiplas com correção de Bonferroni. Todos os testes foram realizados com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics, versão 27.



artigos breves\_ n. 8

**\_Resultados e discussão**

No total das 32 refeições analisadas, 53,1% referem-se a refeições constituídas por prato de carne e 40,6% a refeições com prato de pescado. As refeições com prato vegetariano representam apenas 6,3% do total de refeições analisadas (tabela 1).

As tabelas 2 e 3 resumizam a composição nutricional dos três tipos de refeições hospitalares expressas por 100 g e por dose, respetivamente.

É nas refeições constituídas pelo prato de pescado que se observam, simultaneamente, os teores mais baixos de densidade energética e de gordura e os teores mais elevados de fibra alimentar e sal. Este teor elevado de fibra pode ser explicado pelos acompanhamentos fornecedores de hortícolas e leguminosas que normalmente compõem este tipo de refeições.

Quanto aos valores médios de densidade energética e de proteína, é na refeição constituída pelo prato de carne que

encontramos os valores mais elevados, comparativamente com as refeições de prato de pescado e vegetariano.

O teor de proteína mais baixo é observado na refeição constituída pelo prato vegetariano.

A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis indicou uma diferença estatisticamente significativa entre os três tipos de refeição para o valor de densidade energética ( $p=0,038$ ) e teor de proteína ( $p=0,011$ ), por 100 g. Em seguida, para determinar as refeições responsáveis pela diferença estatisticamente significativa verificada no teste Kruskal-Wallis, recorreu-se ao teste *Post-Hoc* (Comparações Pairwise) com a correção de Bonferroni. O teste indicou que as refeições com prato de carne e prato de pescado eram as que diferiam entre si para o valor de densidade energética e teor de proteína.

Relativamente aos resultados por dose (tabela 3), observou-se um padrão semelhante, com valores mais elevados de densidade energética, proteína, gordura e hidratos de carbono, nas refeições constituídas pelo prato de carne. É neste

Tabela 1: Caracterização das refeições hospitalares analisadas.

Tipo dieta <sup>1</sup>	Características <sup>1</sup>	Indicações principais <sup>1</sup>	Refeição ( <i>itens</i> )	Refeição completa analisada (n)
Geral	Dieta completa, equilibrada e variada, desenhada segundo os princípios da alimentação saudável	Destina-se a doentes que não requerem modificações alimentares específicas	Refeição completa: sopa, prato de carne, pão, sobremesa/fruta	17
			Refeição completa: sopa, prato de pescado, pão, sobremesa/fruta	11
Mole	Dieta completa cujos alimentos se apresentem numa consistência mole que permita uma fácil mastigação e deglutição.	Destina-se a doentes com dificuldade de mastigação e/ou deglutição e digestão. Utiliza-se na progressão pós-operatório.	Refeição completa: sopa, prato de pescado, pão, sobremesa/fruta	2
Vegetariana	Dieta completa, constituída exclusivamente por alimentos de origem vegetal	Destina-se a doentes que por motivos morais ou éticos, culturais, religiosos, crenças ou outros motivos de natureza pessoal, não consomem alimentos de origem animal ou seus derivados.	Refeição completa: sopa, prato vegetariano, pão, sobremesa/fruta	2

<sup>1</sup> Adaptado de Direção-Geral da Saúde, 2018 (2).



Tabela 2: Composição nutricional dos três tipos de refeições hospitalares (por 100 g).

	Refeição hospitalar*				Refeição hospitalar_ prato de carne				Refeição hospitalar_ prato de pescado				Refeição hospitalar_ prato vegetariano				p-value
	Mínimo	Máximo	Mediana	Média (DP)	Mínimo	Máximo	Mediana	Média (DP)	Mínimo	Máximo	Mediana	Média (DP)	Mínimo	Máximo	Mediana	Média (DP)	
Energia, Kcal	60	133	98	94 (19)	71	133	103	102 (18)	62	103	88	85 (13)	60	105	83	83 (34)	0,038 <sup>1</sup>
Proteína (g/ 100 g)	2,2	6,7	4,6	4,5 (1,3)	3,1	6,7	4,9	5,1 (1,0)	2,4	5,8	3,4	3,7 (1,0)	2,2	5,5	3,9	3,9 (2,3)	0,011 <sup>1</sup>
Gordura total (g/ 100 g)	0,6	5,8	2,2	2,4(1,3)	1,1	5,8	2,2	2,7 (1,4)	0,6	4,3	2,1	2,1 (1,1)	1,3	2,5	1,9	1,9 (0,8)	0,482
Hidratos de carbono totais (g/ 100 g)	8,3	18,2	12,9	12,7 (2,5)	8,3	18,2	13,3	13,4 (2,8)	8,6	13,8	11,7	11,8 (1,5)	9,0	14,1	11,6	11,5 (3,6)	0,203
Fibra alimentar (g/ 100 g)	0,8	3,9	1,8	1,8 (0,7)	0,8	2,8	1,6	1,6 (0,5)	0,8	3,9	2,0	2,0 (0,9)	2,0	2,2	2,1	2,1 (0,1)	0,090
Sal (g/ 100 g)	0,23	0,76	0,42	0,42 (0,10)	0,28	0,53	0,43	0,43 (0,07)	0,23	0,76	0,42	0,44 (0,15)	0,40	0,41	0,40	0,40 (0,007)	0,940

\* Inclui a refeição prato de carne, prato de pescado e prato vegetariano; <sup>1</sup> Diferença significativa para cada categoria de refeição (Kruskal-Wallis) ( $p < 0,05$ ). DP = Desvio Padrão.

Sombreado a azul = Valor mais baixo verificado nos três tipos de refeições hospitalares; Sombreado a laranja = Valor mais elevado verificado nos três tipos de refeições hospitalares.

Tabela 3: Composição nutricional dos três tipos de refeições hospitalares (por dose).

	Refeição hospitalar*				Refeição hospitalar_ prato de carne				Refeição hospitalar_ prato de pescado				Refeição hospitalar_ prato vegetariano				p-value
	Mínimo	Máximo	Mediana	Média (DP)	Mínimo	Máximo	Mediana	Média (DP)	Mínimo	Máximo	Mediana	Média (DP)	Mínimo	Máximo	Mediana	Média (DP)	
Energia, Kcal	381	1084	710	699 (156)	588	1084	740	753 (143)	381	800	679	643 (149)	441	753	597	597 (221)	0,304
Proteína (g/ 100 g)	53	15	34,7	33,3 (10,1)	25,1	53,0	39,4	42,1 (8,0)	15,0	44,0	24,5	28,1 (9,5)	16,2	39,4	27,8	27,8 (16,4)	0,0205 <sup>1</sup>
Gordura total (g/ 100 g)	3,5	47,3	17,3	17,8 (9,2)	9,5	47,3	19,0	19,8 (10,3)	3,5	27,5	14,7	15,9 (7,9)	9,6	17,9	13,8	13,8 (5,9)	0,551
Hidratos de carbono totais (g/ 100 g)	51,4	139,1	95,3	93,6 (21,3)	58,5	139,1	101,7	99,6 (21,4)	51,4	118,6	90,9	87,4 (19,9)	66,2	101,1	83,7	83,7 (24,7)	0,228
Fibra alimentar (g/ 100 g)	4,4	33,8	12,6	13,7 (6,3)	4,9	22,8	11,3	12,1 (4,8)	4,4	33,8	14,3	16,6 (8,0)	14,7	15,8	15,3	15,3 (0,77)	0,265
Sal (g/ 100 g)	1,43	5,4	3,26	3,17 (0,96)	1,43	4,32	3,4	3,09 (0,79)	1,75	5,40	3,2	3,29 (1,22)	2,90	3,01	2,96	2,95 (0,77)	0,883

\* Inclui a refeição prato de carne, prato de pescado e prato vegetariano; <sup>1</sup> Diferença significativa para cada categoria de refeição (Kruskal-Wallis) ( $p < 0,05$ ). DP = Desvio Padrão.

Sombreado a azul = Valor mais baixo verificado nos três tipos de refeições hospitalares; Sombreado a laranja = Valor mais elevado verificado nos três tipos de refeições hospitalares.



artigos breves\_ n. 8

tipo de refeição que encontramos, também, o valor mais baixo de sal, em comparação com as restantes refeições. Pelo teste de Kruskal-Wallis, nos resultados por dose, apenas se observa diferença estatisticamente significativa para o teor de proteína ( $p=0,0205$ ), nos três tipos de refeição. O teste *Post-Hoc* com a correção de Bonferroni indica que a diferença, para a variável teor de proteína, está entre a refeição com prato de carne e a refeição com prato de pescado.

Na **tabela 4** apresenta-se a análise dos valores por refeição relativos às recomendações nutricionais estabelecidas para uma população de doentes adultos, com idades compreendidas entre os 19 e os 74 anos, que não requerem modificações alimentares específicas, e, considerando que a refeição do almoço deverá contribuir com 30% do valor energético diário.

A existência de desvios relativos foi considerada sempre que os resultados estivessem abaixo ou acima dos valores mínimo e máximo referentes às recomendações estabelecidas para os nutrientes e valor de energia analisados (**tabela 4**).

O limite inferior foi usado como valor de referência para analisar os desvios que estavam abaixo do intervalo de referên-

cia. Da mesma forma, o limite superior foi usado como valor de referência para considerar os desvios que estavam acima do intervalo de referência. Qualquer valor dentro do intervalo de referência foi considerado como tendo 0% de desvio. Estabeleceu-se que houve alteração ao desvio relativo obtido quando esse desvio foi superior a 5%.

Na **tabela 4**, podemos verificar que as refeições constituídas pelo prato de carne, pescado e vegetariano não cumprem as recomendações nutricionais estabelecidas para o almoço, no que diz respeito aos teores de energia, proteína e sal. Os teores de gordura, hidratos de carbono e fibra alimentar estão conformes.

**\_Conclusão**

No total das 32 amostras analisadas, as refeições com prato vegetariano representaram apenas 6,3% do total de refeições escolhidas pelos utentes.

No período em estudo (2017-2019), as refeições com prato de carne apresentaram um padrão semelhante, com os valores médios mais elevados de densidade energética, proteína,

**Tabela 4:** Desvios relativos observados referentes às recomendações nutricionais definidas para a faixa etária em estudo.

Faixa etária	Parâmetros	Recomendações (8,9)	Refeição_almoço (4)	% Desvio relativo		
				Refeição_prato de carne	Refeição_prato de pescado	Refeição_prato vegetariano
19 - 74	Energia (E), kcal	2250	675 <sup>1</sup>	12,0	-5,0	-12,0
	Proteína (g)	Min. 50	15	>100	87	85
	Gordura (g)	50,0-87,5*	15,0-26,3 g	0,0	0,0	0,0
	Hidratos de carbono (g)	253-337*	75,9 - 101,1 g	0,0	0,0	0,0
	Fibra alimentar g/dia	25	7,5	a)	a)	a)
	Sal (g/dia)	5 <sup>2</sup>	1,5	>100	>100	97

Desvio relativo (%) = (Desvio observado/Valor referência) x100; \* Calculado como uma percentagem das necessidades energéticas (gordura 20-35 e%; hidratos de carbono 45-60 E%).

<sup>1</sup> Refeição do almoço deverá contribuir com 30% do valor energético diário; <sup>2</sup> Valor diário recomendado (sal).

Sombreado a verde = resultados de acordo com a recomendação. a) nutriente a promover, apesar de ser superior ao limite recomendado.

Sombreado a laranja = resultado não conforme.



artigos breves\_ n. 8

gordura e hidratos de carbono. A refeição com prato vegetariano foi a que revelou um teor médio de sal mais baixo, em comparação com as restantes refeições.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas no valor de densidade energética e no teor de proteína por 100 g ( $p=0,038$  e  $p=0,011$ , respetivamente) e no teor de proteína ( $p=0,0205$ ) por refeição completa, nos 3 tipos de refeição. Estas diferenças foram verificadas entre a refeição com prato de carne e a refeição com prato de pescado.

As recomendações nutricionais estabelecidas para o almoço não são cumpridas nos três tipos de refeição para o teores de densidade energética, proteína e sal.

A vigilância nutricional periódica, pode ter um papel importante na avaliação de tendências e na identificação de desvios permitindo a implementação de ações corretivas apropriadas e atempadas, em benefício da refeição que é servida ao doente.

#### Agradecimentos:

A todos os técnicos do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – Porto do Departamento de Alimentação do INSA que participaram na colheita das amostras no âmbito da vigilância nutricional.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Despacho n.º 5479/2017, de 12 de junho. DR n.º 120/2017, 2ª Série 2017/6/2017: 12753-54. Constitui um grupo de trabalho com o objetivo de garantir o fornecimento de uma alimentação nutricionalmente adequada, contribuindo para a qualidade dos cuidados de saúde prestados, nas entidades hospitalares do Serviço Nacional de Saúde (SNS). <https://dre.pt/application/conteudo/107550454>
- (2) Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Manual das dietas hospitalares, Portugal 2018. Lisboa: Direção-Geral da Saúde, 2018 (versão-audição pública). <https://www.dgs.pt/documentos-em-discussao-publica/manual-de-dietas-hospitalares-em-audicao-publica-ate-210120191.aspx>
- (3) Direção-Geral da Saúde. Norma organizacional n.º 017/2020, de 25/9/2020. Implementação da Nutrição Entérica e Parentérica no Ambulatório e Domicílio em Idade Adulta. <https://normas.dgs.min-saude.pt/wp-content/uploads/2021/05/i026689.pdf>
- (4) Latimer GW; Association of Official Analytical Chemists International. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Gaithersburg, MD: Association of Analytical Communities, 2016.
- (5) União Europeia. Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.º 608/2004 da Comissão JO 22.11.2011:L 304/18–63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (6) ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- (7) World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva: WHO, 2003. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42665>
- (8) Public Health England. Healthier and more sustainable catering: nutrition principles: the scientific principles for developing nutrient-based standards for planning nutritionally balanced menus. London: PHE, 2017. [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/648744/healthier\\_and\\_more\\_sustainable\\_nutrition\\_principles.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/648744/healthier_and_more_sustainable_nutrition_principles.pdf)
- (9) European Food Safety Agency. Dietary Reference Values for nutrients: summary report (Approved: 4/12/2017). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>

## **A inflamação intestinal como promotor da tumorigénese: pistas sobre a base molecular envolvida**

### *Intestinal inflammation promotes tumorigenesis: clues on the underlying molecular basis*

Joana F. S. Pereira, Cláudia Bessa, Paulo Matos, Peter Jordan

*peter.jordan@insa.min-saude.pt*

*Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal*

#### **\_Resumo**

A inflamação intestinal é uma doença crónica debilitante de origem multifatorial que afeta cerca de 25 000 portugueses. É também uma condição promotora para a tumorigénese no cólon. Um microambiente inflamatório fornece sinais de sobrevivência para as células cancerígenas, as quais respondem com mudanças no seu programa genético. RAC1B é um exemplo de um biomarcador que foi identificado num subconjunto de tumores colorretais, e cuja expressão está aumentada em amostras de doentes com doença inflamatória intestinal. Para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos, a expressão da proteína RAC1B foi analisada num modelo celular composto por uma camada epitelial de células colorretais Caco-2 cocultivadas simultaneamente com fibroblastos ou macrófagos. A mera adição da citocina CXCL2/MIP2α purificada, ou uma cocultura com macrófagos do tipo M1, responsáveis pela síntese de MIP2α *in vivo*, induziram um aumento significativo nos níveis da proteína RAC1B nas células colorretais. Este aumento foi ainda potenciado pela adição de fibroblastos derivados de carcinoma (CAFs) à cocultura com M1. Estes resultados permitiram identificar, molecularmente, como os sinais pró-inflamatórios do microambiente induzem alterações no programa genético das células tumorais colorretais, abrindo caminho para uma melhor compreensão do papel da inflamação na promoção de tumores.

#### **\_Abstract**

*Inflammatory bowel disease is a chronic disorder of multifactorial origin that currently affects around 25 000 Portuguese. It is also a condition for promoting the development of colorectal cancer. The inflammatory microenvironment provides survival signals for cancer cells, which respond with changes in their genetic program. RAC1B is an example for a biomarker previously identified in a subset of BRAF-mutated colorectal tumors, the expression of which was found increased in samples from patients with inflammatory bowel disease. In order to elucidate the underlying molecular mechanism, RAC1B expression was analyzed in a cell model composed of an epithelium-like layer of differentiated colorectal Caco-2 cells in co-culture with fibroblasts or macrophages. The presence of purified cytokine CXCL2/MIP2α, or a co-culture with M1-type macrophages (a source of MIP2α in vivo) induced a significant increase in RAC1B protein levels in colorectal cells. This increase was further potentiated when cancer-associated fibroblasts (CAFs) were added together with M1. The data identify a molecular link between pro-inflammatory signals from the microenvironment and alterations in the genetic program of colorectal tumor cells, paving the way for a better understanding of the role of inflammation in tumor promotion.*

#### **\_Introdução**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são provocadas pelo sistema imunitário e causam dor abdominal e diarreia recorrentes, tendo um impacto debilitante para a saúde do doente, incluindo a necessidade de intervenções cirúrgicas. A doença de Crohn pode manifestar-se em diferentes partes do trato gastrointestinal enquanto a colite ulcerosa afeta sobretudo o cólon. As causas são multifatoriais com influência de fatores genéticos e ambientais, e a incidência tem vindo a aumentar no Mundo Ocidental, sobretudo em pessoas entre os 20 e 39 anos, atingindo assim a faixa mais ativa da população, com um impacto socioeconómico correspondente. Atualmente, em Portugal, estima-se que cerca de 25 000 pessoas sofrem de DII (1), com uma incidência aproximada de 150 novos casos por ano.

Para além dos sintomas, as DII aumentam o risco para o desenvolvimento de cancro colorretal (2,3). Segundo os dados de 2020 da Agência Internacional de Investigação sobre Cancro (IARC, na sigla em inglês) (4), a incidência do cancro do cólon em Portugal ronda os 10 000 novos casos, causando cerca de 4 000 mortos, em ambos os sexos. A grande maioria destes casos são tumores esporádicos, sem história familiar associada, nos quais a influência do ambiente e dos hábitos de vida do doente tiveram um papel determinante. Vários fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de cancro foram reconhecidos em estudos epidemiológicos (5), incluindo a prevalência de DII.

A inflamação é uma resposta essencial do organismo em caso de infeção microbiana ou danos aos tecidos. Através de uma sequência de eventos altamente regulada, a produção inicial de fatores pró-inflamatórios elimina células dani-



## artigos breves\_ n. 9

ficadas ou infetadas, e é seguida por uma fase de fatores anti-inflamatórios que permitem o processo de regeneração subsequente. A desregulação desta fase anti-inflamatória, ou a presença contínua de um estímulo pró-inflamatório nocivo, resultam numa inflamação crónica que lesa continuamente os tecidos afetados (6,7).

Nos últimos anos, um microambiente inflamatório tem sido reconhecido como uma condição promotora do desenvolvimento tumoral (8-10), pois fornece sinais de sobrevivência às células tumorais. Por exemplo, as células tumorais têm recetores para as citocinas produzidas por fibroblastos e macrófagos pertencentes ao microambiente inflamatório, e respondem com alterações na sua expressão génica através da ativação de vias pro-proliferativas, como a via do STAT3 e do NF- $\kappa$ B (11). Com base nesta relação, é explicável o efeito anti-tumoral quimiopreventivo revelado pelas drogas anti-inflamatórias não-esteróides, tomados regularmente (12).

### \_Objetivo

A sobre-expressão da proteína RAC1B num subtipo de cancro do cólon foi identificado anteriormente em trabalhos de investigação realizados no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (13) e representa um potencial biomarcador de prognóstico, ou mesmo um novo alvo terapêutico. Sabe-se que níveis aumentados de RAC1B potenciam a sobrevivência de células tumorais, mas a origem da sua sobre-expressão permanece desconhecida. Dados de estudos recentes no INSA sugeriram que condições inflamatórias poderiam desencadear a sobre expressão de RAC1B no cólon (13,14). Com base nestes estudos, o objetivo deste trabalho foi validar a expressão de RAC1B em amostras de doentes com inflamação intestinal, e identificar, num modelo celular adequado, as moléculas inflamatórias envolvidas.

### \_Materiais e métodos

Cortes histológicos de amostras conservadas em parafina de doentes com doença inflamatória intestinal foram obtidos pelo biobanco do Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto (Prof. F. Magro e Prof.<sup>a</sup> F. Carneiro), o seu RNA

extraído pelo *kit* RNeasy FFPE (Qiagen) e reverse-transcrito em cDNA. Por RT-PCR quantitativo foram amplificados os transcritos de RAC1 total e RAC1B (variantes resultantes do mesmo gene pelo processo conhecido como *splicing* alternativo) e quantificados segundo o método  $\Delta\Delta$ Ct.

As células Caco-2 foram cultivadas sobre filtros de polietileno, com poros de 1  $\mu$ m, em meio RPMI suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino durante 10-15 dias, até atingirem uma resistência transepitelial de 1000 a 1200 Ohm. De seguida, os filtros foram transferidos para placas contendo as células controlo (Caco-2) ou do estroma (nomeadamente, fibroblastos (CT 5.3, linha derivada de um tumor) ou macrófagos (M1 ou M2, diferenciados *in vitro* a partir de monócitos THP-1)) e cocultivados durante 48 h. As citocinas segregadas para o meio de cultura estão a ser identificadas por incubação com o *array* de anticorpos AAH-INF-3-8 (RayBiotech Inc.) e visualizadas por quimioluminescência. Em alternativa, os filtros foram colocados em meio contendo a citocina CXCL2/MIP2 $\alpha$  purificada, adquirida comercialmente e previamente dissolvida em solução salina isotónica com albumina.

Para a análise de proteínas por *Western blot*, as células Caco-2 foram lisadas, os extratos separados por eletroforese em gel desnaturante, electro-transferidos para uma membrana, e as proteínas detetadas com anticorpos específicos. Os níveis de RAC1 total e de  $\alpha$ -tubulina serviram de controlo interno.

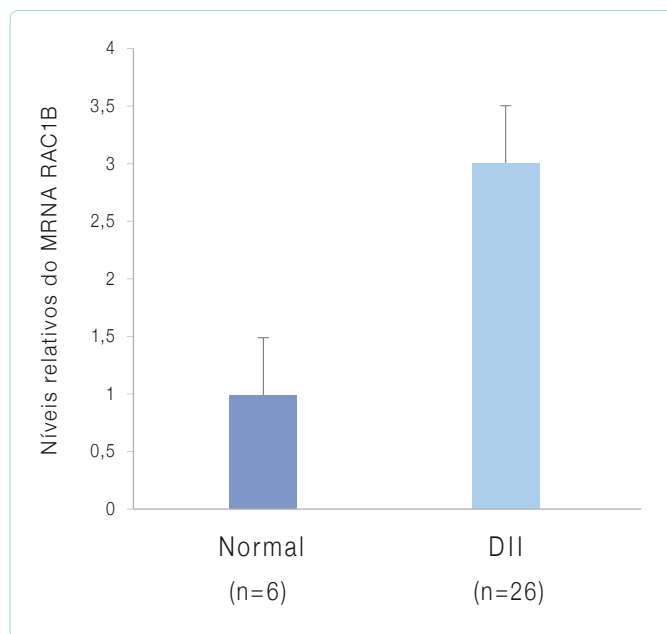
### \_Resultados e discussão

A análise de 26 amostras parafinadas de pacientes com doença inflamatória intestinal permitiu confirmar que existe uma tendência de sobre-expressão do RNA mensageiro de RAC1B nesta doença. Embora este estudo ainda conte com um número reduzido de amostras, os resultados sugerem que um ambiente inflamatório intestinal leva a um aumento da expressão de RAC1B nas células epiteliais do cólon (figura 1).

Para consolidar esta hipótese, tornou-se importante esclarecer quais os mecanismos moleculares subjacentes à indução



**Figura 1:** Quantificação por RT-PCR dos níveis de expressão do transcrito RAC1B em amostras em parafina de doentes com doença inflamatória intestinal.



da expressão de RAC1B em condições inflamatórias. Dado que uma análise *in situ* da mucosa do cólon iria fornecer uma imagem já resultante de um processo de evolução complexo, foi desenvolvido um modelo *in vitro* para analisar com maior precisão bioquímica, quais os intervenientes moleculares que estão na base do efeito observado.

O modelo recorreu à linha celular Caco-2, derivada de células tumorais de um doente com cancro colorretal, mas que mantém a capacidade de formar uma barreira eletrofisiológica comparável com as características da mucosa normal do cólon.

Como prova de princípio, foi adicionada ao meio das células Caco-2 a citocina CXCL2/MIP-2 $\alpha$  em forma purificada, pois foi demonstrado anteriormente num trabalho de colaboração do grupo que a expressão desta corelacionava, num modelo de ratinho para a inflamação crónica do cólon, com um aumento de RAC1B (15). As proteínas inflamatórias de macrófagos (MIPs) são citocinas quimiotáticas, produzidas por monócitos e macrófagos, que auxiliam no recrutamento

de neutrófilos para os locais de lesão ou infeção, mas também podem atuar sobre as células epiteliais (16). Na figura 2A mostra-se que a adição desta citocina ao meio de cultura de células Caco-2 polarizadas, sem presença de outras células pro-inflamatórias, era suficiente para induzir um aumento de RAC1B nas células Caco-2, mas isto não aconteceu com a adição do controlo escolhido, a citocina IL-11.

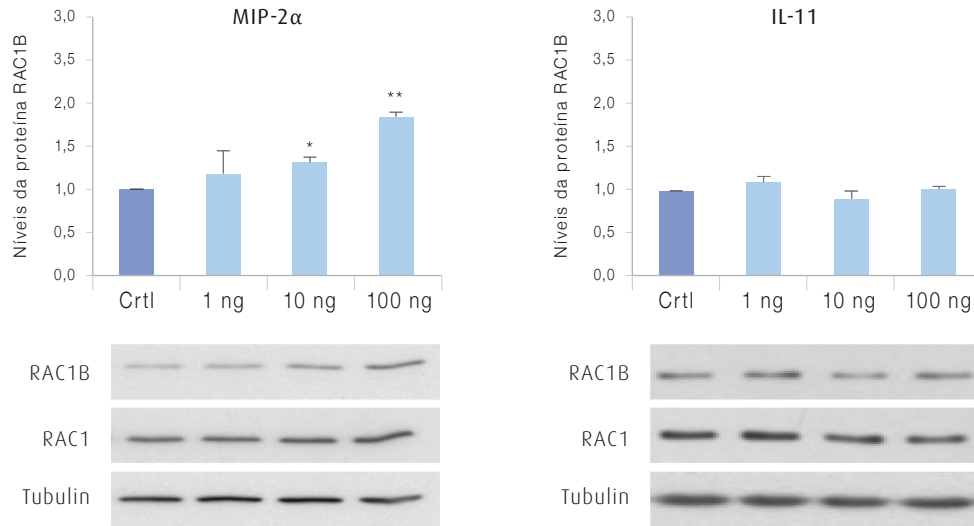
No sentido de mimetizar este efeito ectópico, estas células foram então cultivadas na presença de monócitos (THP1) e macrófagos diferenciados nos subtipos M1 (pro-inflamatório) ou M2 (imunossupressor) (figura 2B). Estas experiências revelaram que sobretudo a cocultura com macrófagos pró-inflamatórios M1 tinha a capacidade de induzir a produção da proteína RAC1B nas células Caco-2 (figura 2C), consistente com um efeito agonista das citocinas por estes segregadas. No entanto, sabe-se que outros tipos celulares também influenciam o perfil de citocinas presentes no microambiente tumoral. Assim, adicionou-se à cocultura com os macrófagos M1 também fibroblastos derivados de tumores (CAFs). Verificou-se que a adição deste terceiro tipo celular ao modelo, potenciava ainda mais a expressão da proteína pro-tumoral RAC1B nas células colorretais (figura 2C). Estes resultados, sugerem que é a intercomunicação entre macrófagos, CAFs e células epiteliais, que desencadeia a sobre-expressão de RAC1B. Para determinar quais as citocinas envolvidas, neste modelo de cocultura estabelecido, encontra-se atualmente em curso um estudo bioquímico mais pormenorizado para determinar o perfil de citocinas que medeia a comunicação entre as células CAF ou M1 pro-inflamatórias, e as Caco-2, recorrendo a um *array* de anticorpos selecionados.

Espera-se que os resultados obtidos neste modelo *in vitro* venham a revelar quais as citocinas aumentadas, permitindo a sua correlação com as que se encontram elevadas no soro e no intestino de doentes com DII (17), e o seu consequente papel na promoção do cancro associado à colite (18,19).

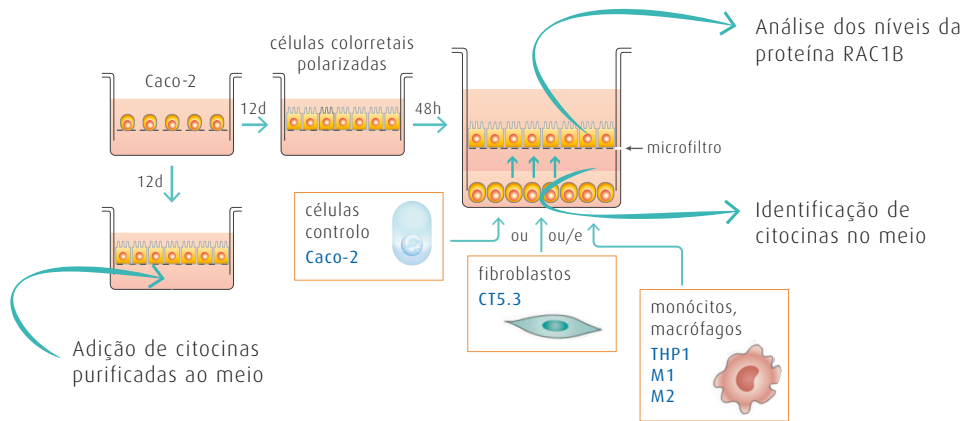


Figura 2: Identificação da base molecular envolvida na sobre-expressão de RAC1B em microambiente inflamatório.

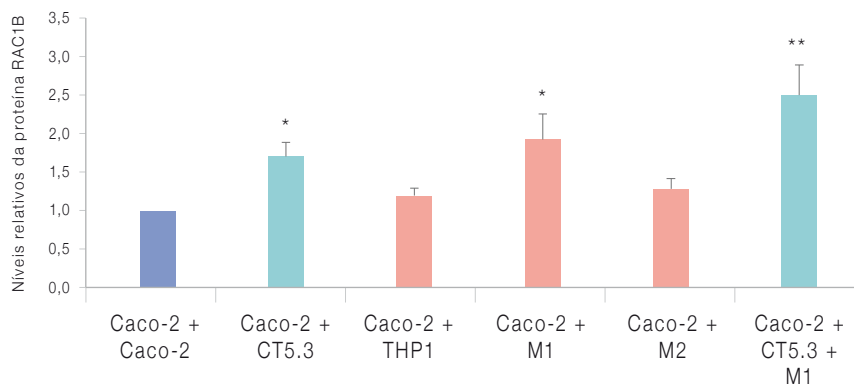
A — Níveis normalizados da proteína RAC1B nas células colorretais após incubação com as citocinas purificadas, MIP-2 $\alpha$  ou IL-11 (controlo).



B — Esquema resumo do modelo celular utilizado.



C — Níveis da proteína RAC1B detetada nas células colorretais sujeitas a diferentes coculturas.



\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .



## \_Conclusões

Este trabalho confirmou a sobre-expressão do biomarcador RAC1B em amostras de doentes com inflamação intestinal e identificou que citocinas geradas por um microambiente inflamatório podem desencadear, em células tumorais, essa sobre-expressão. Os resultados exemplificam molecularmente o efeito que a inflamação tem na progressão da doença oncológica, e sugerem que anticorpos terapêuticos, ou inibidores farmacológicos das vias associadas, poderão ter o potencial de reverter o efeito pro-tumorigénico observado, reduzindo a incidência de casos de cancro colorretal associado à DII.

## Financiamento:

Os autores agradecem o apoio financeiro da FCT (bolsa SFRH/BD/109162/2015 e verba UID/MULTI/04046/2019 atribuído ao BioISI), do Grupo de Estudo da Doença Inflamatória Intestinal (bolsa GEDII 2013), e da bolsa INSA BRJ-DGH 2012\_oncologia.

## Referências bibliográficas:

- (1) Santiago M, Magro F, Correia L, et al. What forecasting the prevalence of inflammatory bowel disease may tell us about its evolution on a national scale. *Ther Adv Gastroenterol*. 2019 Aug 21;12:1756284819860044. <https://doi.org/10.1177/1756284819860044>
- (2) Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol*. 2012 Aug 7;18(29):3839-48. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i29.3839>
- (3) Yalchin M, Baker A-M, Graham TA, et al. Predicting Colorectal Cancer Occurrence in IBD. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 10;13(12):2908. <https://doi.org/10.3390/cancers13122908>
- (4) Cancer Today - IARC - Estimated number of incident cases and deaths in Portugal in 2020, both sexes, all ages [online]. International Agency for Research on Cancer, 2021. [consult. 21/7/2021]. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=620&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_it\\_ems=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=620&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_it_ems=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D)
- (5) Sawicki T, Ruzkowska M, Danielewicz A, et al. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 22;13(9):2025. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- (6) Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):771-6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- (7) Camba-Gómez M, Gualillo O, Conde-Aranda J. New Perspectives in the Study of Intestinal Inflammation: Focus on the Resolution of Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 5;22(5):2605. <https://doi.org/10.3390/ijms22052605>
- (8) Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- (9) Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19;264(20):691-7. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
- (10) Terzić J, Grivennikov S, Karin E, et al. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2101-2114.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- (11) Pereira JFS, Jordan P, Matos P. A Signaling View into the Inflammatory Tumor Microenvironment. *Immuno*. 2021;1(2):91-118. <https://doi.org/10.3390/immuno1020007>
- (12) Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, et al. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005 Aug 24;294(8):914-23. <https://doi.org/10.1001/jama.294.8.914>
- (13) Matos P, Oliveira C, Velho S, et al. B-Raf(V600E) cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. *Gastroenterology*. 2008 Sep;135(3):899-906. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.052>
- (14) Matos P, Kotelevets L, Goncalves V, et al. Ibuprofen inhibits colitis-induced overexpression of tumor-related Rac1b. *Neoplasia*. 2013 Jan;15(1):102-11. <https://doi.org/10.1593/neo.121890>
- (15) Kotelevets L, Walker F, Mamadou G, et al. The Rac1 splice form Rac1b favors mouse colonic mucosa regeneration and contributes to intestinal cancer progression. *Oncogene*. 2018 Nov;37(46):6054-6068. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0389-7>
- (16) Phinney BB, Ray AL, Peretti AS, et al. MK2 Regulates Macrophage Chemokine Activity and Recruitment to Promote Colon Tumor Growth. *Front Immunol*. 2018 Sep 21;9:1857. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01857>
- (17) Florholmen J, Fries W. Candidate mucosal and surrogate biomarkers of inflammatory bowel disease in the era of new technology. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Dec;46(12):1407-17. <https://doi.org/10.3109/00365521.2011.627449>
- (18) Luo C, Zhang H. The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediat Inflamm*. 2017;2017:5126048. <https://doi.org/10.1155/2017/5126048>
- (19) Mager LF, Wasmer M-H, Rau TT, et al. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2016 Apr 19;6:96. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00096>

## \_Aplicação de métodos de aprendizagem automática em grafos de conhecimento para medicina personalizada

### *Application of machine learning methods for knowledge graphs to personalized medicine*

Joana Vilela<sup>1,2</sup>, Muhammad Asif<sup>1,2</sup>, Ana Rita Marques<sup>1,2</sup>, João Xavier Santos<sup>1,2</sup>, Célia Rasga<sup>1,2</sup>,  
Astrid Vicente<sup>1,2</sup>, Hugo Martiniano<sup>1,2</sup>

hugo.martiniano@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Biosystems and Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

#### \_Resumo

A medicina personalizada é um modelo de prática médica que utiliza o perfil fenotípico e genotípico do indivíduo para melhorar a precisão do diagnóstico, a eficácia terapêutica ou a prevenção de doenças. Neste sentido, a enorme quantidade de dados gerados ao longo dos últimos anos na área biomédica tem contribuído para uma melhor compreensão dos determinantes genéticos de várias patologias e, conseqüentemente, para a implementação de práticas de medicina personalizada em várias áreas, por exemplo na Oncologia e no âmbito das doenças raras. No entanto, ainda subsistem desafios significativos, nomeadamente no que diz respeito à integração de dados biomédicos oriundos de fontes heterogêneas e na obtenção de informação clinicamente relevante. Este trabalho descreve uma abordagem que usa métodos de aprendizagem automática aplicados a um Grafo de Conhecimento (GC) biomédico como um meio para integrar informação armazenada em bases de dados diversas. Este GC contém relações entre genes, doenças e outras entidades biológicas, extraídas de três bases de dados: Ensembl, DisGeNET e Gene Ontology. Neste trabalho exploramos o potencial dos métodos de aprendizagem automática em grafos para produzir informação clinicamente relevante e descrevemos a aplicação desta metodologia à previsão de associações gene-doença. Mostramos ainda que as principais associações gene-doença previstas por esta abordagem podem ser confirmadas em bases de dados externas ou já foram previamente identificadas na literatura.

#### \_Abstract

*Personalized medicine is a model of medical practice that uses an individual's phenotypic and genotypic profile to improve diagnostic accuracy, therapeutic efficacy or disease prevention. The huge amount of data generated over the last few years in the biomedical area has contributed to a better understanding of the genetic determinants of various pathologies and, consequently, to the implementation of Personalized Medicine practices in various areas, for example in Oncology and in the field of rare diseases. However, significant challenges remain, namely with regard to the integration of biomedical data from heterogeneous sources to obtain clinically relevant information. This work describes an approach that uses machine learning methods applied to a biomedical Knowledge Graph (KG) as a means to integrate information stored in different databases. To build the KG, three databases were used: Ensembl, DisGeNET and Gene Ontology. This KG contains relationships between*

*genes, diseases, and other biological entities. In this work, we explore the potential of automatic graph learning methods to produce clinically relevant information and describe the application of this methodology to the prediction of gene-disease associations. We show that the main gene-disease associations predicted by this approach can be confirmed in external databases or have been previously identified in the literature.*

#### \_Introdução

A medicina personalizada é uma prática médica emergente baseada na observação de que o contexto individual de doença é único, pois é moldado pelo perfil molecular e fisiológico do indivíduo, em articulação com fatores comportamentais e exposição ambiental (1,2). Compreender os determinantes genéticos de doenças é um passo essencial para a aplicação de abordagens de medicina personalizada. Neste trabalho, exploramos o uso de métodos de aprendizagem automática em grafos de conhecimento (GC) (3,5) como uma ferramenta para modelar as relações entre entidades biológicas, tais como genes e doenças, e obter informações sobre associações gene-doença que possam ser úteis em medicina personalizada. Um grafo  $G(V, E)$ , é uma estrutura matemática constituída por um conjunto de vértices ( $V$ ) e um conjunto de arestas ( $E$ ). Muitos conjuntos de dados são naturalmente representados por grafos, nomeadamente as redes, ou, mais genericamente, qualquer conjunto de entidades com ligações entre elas. Um GC é um multigrafo heterogéneo dirigido, onde cada vértice ( $v \in V$ ) representa uma entidade e cada aresta ( $e \in E$ ) uma relação. As entidades e as relações num GC são organizadas em conjuntos de tripletos ( $(h, r, t)$ ), onde  $h$  é a entidade principal,  $r$  é a relação e  $t$  é



a entidade final. Cada tripleto pode ser interpretado como a representação de um facto, no qual a entidade principal (ou sujeito) está relacionada com a entidade final (ou objeto) através de uma relação de determinado tipo. Na **figura 1** está representado um subconjunto dos vértices (entidades) e arestas (relações) de um GC. Os métodos de aprendizagem automática em grafos aprendem uma representação vetorial das entidades no grafo denominada “embedding”, de forma a que a representação no espaço reflita os seus relacionamentos com outras entidades no GC. As representações vetoriais das entidades e relações são otimizadas de modo a permitir prever os tripletos (ou factos) presentes no GC. Após o treino, as representações resultantes podem ser utilizadas para prever novos tripletos ou novos factos. Aqui demonstramos uma aplicação de métodos de aprendizagem automática em grafos a um GC biológico, relacionando entidades como genes, processos biológicos e doenças, e apresentamos a sua aplicação à previsão de associações gene-doença.

Esta figura contém uma representação gráfica de um conjunto de factos de um GC.

Os círculos (vértices) representam entidades e as ligações (arestas) representam relações entre estas. Neste caso as

cores denotam o tipo da entidade. Os círculos a laranja representam genes e os círculos a azul representam doenças. Estas entidades estão ligadas por relações do tipo “IS\_ASSOCIATED”, representadas na figura como setas direcionadas do gene para a doença.

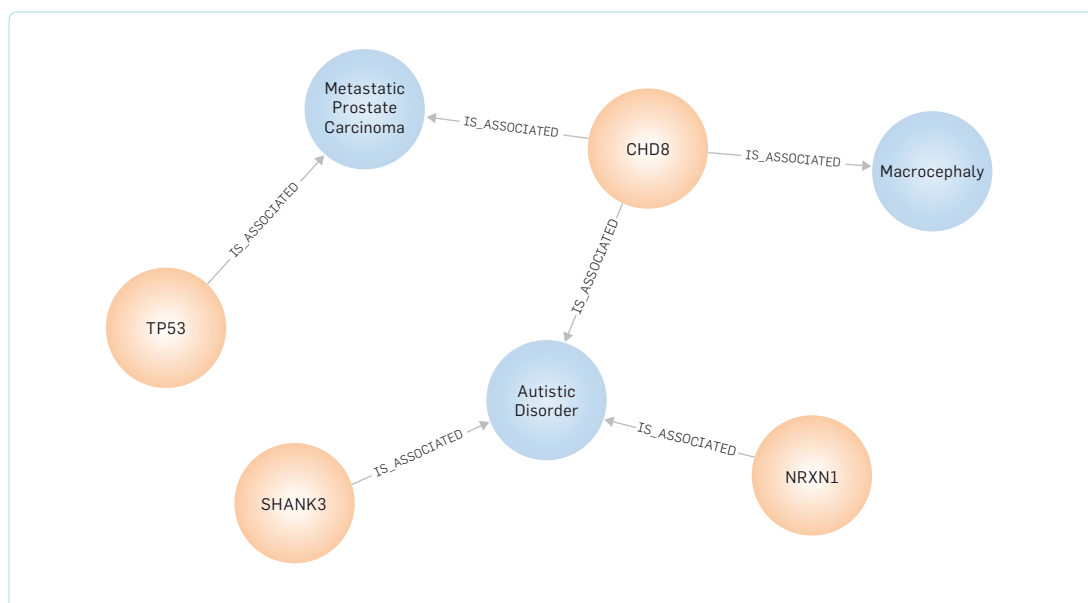
### **\_Objetivos**

O objetivo deste estudo é identificar novas associações gene-doença através do algoritmo desenvolvido e testar o seu desempenho na identificação de associações já descritas na literatura que não estejam presentes no conjunto de dados de treino do GC.

### **\_Material e métodos**

Numa primeira fase construímos um GC composto por uma série de entidades e as suas relações, extraídas de várias bases de dados biológicas. Este GC contém 7 tipos únicos de entidades: genes, doenças, fenótipos, grupos de doenças, funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos. Os genes são representados pelos seus identificadores do Ensembl (<https://ensembl.org>), as doenças, fenótipos e grupos de doenças são representados por identificadores do Sistema Médico Unificado (UMLS), con-

**Figura 1:** Representação de um grafo de conhecimento.





forme incluído na DisGeNET (<https://disgenet.org>), e termos da Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org>) para processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares, representados por seus respectivos identificadores GO. O GC tem 1.785.464 tripletos, compostos por 99.525 entidades únicas e 31 tipos de relacionamento. Essas entidades compreendem 25.450 genes, 21.623 doenças, 958 grupos de doenças, 7.409 fenótipos, 11.153 funções moleculares, 4.184 componentes celulares e 28.748 processos biológicos. O GC incorpora 901.472 associações gene-doença, 234.920 associações gene-fenótipo e 160.867 associações de gene-grupo, sendo o resto das relações anotações gene-GO (397.763) e relações entre termos da GO (90.442). Ao GC assim construído é possível aplicar algoritmos especialmente desenvolvidos para aprendizagem automática em grafos. Existem vários algoritmos para este efeito. Neste trabalho experimentamos três dos mais utilizados: ComplEx (6), DistMult (7) e TransE (8). Utilizamos as implementações do pacote *Deep Graph Library – Knowledge Embedding* (DGL-KE) (9). Este programa é orientado para aplicação em grafos de grande tamanho, com milhões de entidades e relações. Neste caso foi feita uma separação do GC em conjuntos de treino, teste e validação, de 80/10/10 por cento.

## \_Resultados

Através da previsão de novas associações gene-doença, foi possível identificar associações entre entidades do GC que não estavam presentes no conjunto de dados de treino. Calculamos os *scores* de todas estas previsões, e descartamos as associações já presentes nos dados de treino. As restantes associações são consideradas novas associações.

Destacamos na **tabela 1** as 20 principais associações gene-doença previstas. Paralelamente, verificámos as evidências já existentes que ligam estes genes às doenças associadas em duas bases de dados diferentes: *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) e Orphanet. Várias das novas associações são suportadas pelos registos encontrados nestas bases de dados e são indicados na última coluna da **tabela 1**.

Nos casos em que não encontramos uma associação explícita do gene à doença, foi possível estabelecer uma associação entre o gene e o órgão afetado (e.x. *COL17A1*/Alopecia), entre o gene e uma via metabólica relacionada (e.x. *HTR2A*/Dependência de Opiáceos), ou uma ligação do gene a uma síndrome que inclui o fenótipo associado (e.x. *PIGN*/Microcefalia). Os genes que resultam deste tipo de evidência constituem novos candidatos a serem considerados em estudos futuros direcionados para as doenças envolvidas nestas novas associações.



Tabela 1: Top 20 das novas associações gene-doença com score mais elevado.

Ensembl ID	Gene Symbol	Disease	DB accession
ENSG00000143632	<i>ACTA1</i>	Generalized amyotrophy	OMIM:102610
ENSG00000169083	<i>AR</i>	Gastrointestinal Carcinoid Tumor	—
ENSG00000102001	<i>CACNA1F</i>	Cone Dystrophy	OMIM:300476
ENSG00000065883	<i>CDK13</i>	Byzantine arch palate	—
ENSG00000152093	<i>CFC1B</i>	Left Atrial Isomerism	—
ENSG00000224318	<i>CHL1-AS2</i>	Scoliosis, Isolated, Susceptibility to, 3	—
ENSG00000065618	<i>COL17A1</i>	Alopecia	—
ENSG00000102468	<i>HTR2A</i>	Opiate Addiction	—
ENSG00000132740	<i>IGHMBP2</i>	Peripheral motor neuropathy	OMIM:182960
ENSG00000151704	<i>KCNJ1</i>	Metabolic alkalosis	OMIM:241200
ENSG00000163380	<i>LMOD3</i>	Pena-Shokeir syndrome type I	—
ENSG00000134571	<i>MYBPC3</i>	Tachycardia, Ventricular	ORPHA:54260
ENSG00000101247	<i>NDUFA5</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide coenzyme Q reductase deficiency	OMIM:618238
ENSG00000197563	<i>PIGN</i>	Strabismus	—
ENSG00000197563	<i>PIGN</i>	Microcephaly	—
ENSG00000148606	<i>POLR3A</i>	Strabismus	—
ENSG00000112619	<i>PRPH2</i>	Autosomal recessive retinitis pigmentosa	ORPHA:791
ENSG00000140522	<i>RLBP1</i>	Rod-Cone Dystrophy	OMIM:607475
ENSG00000170381	<i>SEMA3E</i>	Hirschsprung Disease	—
ENSG00000154743	<i>TSEN2</i>	Pontocerebellar hypoplasia	OMIM:612389

## \_Discussão

No top 20 das previsões deste estudo (tabela 1), identificámos a associação do gene *PIGN* que codifica uma proteína envolvida na biossíntese de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) à Microcefalia e ao Estrabismo. Outras associações envolvendo doenças oculares associam as distrofias do bastonete e do cone aos genes *CACNA1F* e *RLBP1*. Outra associação importante é a do gene *AR* ao cancro gastrointestinal, gene anteriormente associado ao cancro da próstata. O gene *CDK13* aparece associado a defeitos no palato, e foi anteriormente ligado a distorções faciais. É também nova a associação da Alopecia ao *COL17A1*, um gene anteriormente associado a doenças epidérmicas.

O algoritmo apresentou um bom desempenho na identificação de doenças associadas a RNAs. O *CHL1-AS2* é um RNA não codificante já associado à Escoliose Idiopática e surge aqui associado à suscetibilidade à escoliose. Foram também identificados novos genes candidatos para a dependência de opiáceos (*HTR2A*) e para a síndrome de Pena-Shokeir tipo I (ORPHA: 994), uma síndrome genética rara caracterizada por diminuição dos movimentos fetais, restrição do crescimento intrauterino, contraturas articulares ou hipoplasia pulmonar. A nova associação ao gene *LMOD3* pode constituir uma pista importante para o estudo destas patologias. Outra nova associação é a da doença de Hirschsprung (OMIM: 142623), caracterizada pela perda de motilidade do trato gastrointestinal, ao gene *SEMA3E*.



## \_Conclusões

A metodologia aplicada neste trabalho apresentou um bom desempenho na previsão de associações gene-doença já reportadas na literatura, e identificou novas associações que estão de acordo com evidências biológicas suportadas. A previsão de novos genes associados a doenças é uma ferramenta valiosa no contexto da medicina personalizada. Estudos futuros poderão ser desenvolvidos a partir destas novas associações, envolvendo a análise de mutações em genes candidatos resultantes destas previsões, o que poderá contribuir para novos desenvolvimentos na área do diagnóstico e para a definição de intervenções terapêuticas mais adequadas.

## Referências bibliográficas:

- (1) Vicente AM, Ballensiefen W, Jönsson JI. How personalised medicine will transform healthcare by 2030: the ICPeMed vision. *J Transl Med.* 2020 Apr 28;18(1):180. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02316-w>
- (2) Goetz LH, Schork NJ. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertil Steril.* 2018 Jun;109(6):952-963. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.006>
- (3) Wang Q, Mao Z, Wang B, et al. Knowledge graph embedding: a survey of approaches and applications. *IEEE Trans Knowl Data Eng.* 2017 Dec;29(12):2724-43. <https://doi.org/10.1109/TKDE.2017.2754499>
- (4) Mohamed SK, Nounu A, Nováček V. Biological applications of knowledge graph embedding models. *Brief Bioinform.* 2021 Mar 22;22(2):1679-1693. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa012>
- (5) Nicholson DN, Greene CS. Constructing knowledge graphs and their biomedical applications. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020 Jun 2;18:1414-1428. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.05.017>
- (6) Trouillon T, Welbl J, Riedel S, et al. Complex Embeddings for Simple Link Prediction. In: Balcan MF, Weinberger KQ (eds). *Proceedings of The 33rd International Conference on Machine Learning. Proceedings of Machine Learning Research.* 2016;48:2071-2080. <http://proceedings.mlr.press/v48/trouillon16.html>
- (7) Yang B, Yih W-t., He X, et al. Embedding Entities and Relations for Learning and Inference in Knowledge Bases. (arXiv:1412.6575 [cs.CL]) (v4 29 Aug 2015). <https://arxiv.org/abs/1412.6575>
- (8) Bordes A, Usunier N, Garcia-Duran A, et al. Translating Embeddings for Modeling Multi-relational Data. In: Burges CJC, Bottou L, Welling M, et al. (eds.) *Advances in Neural Information Processing Systems.* 2013;26:2787-95. <http://papers.nips.cc/paper/5071-translating-embeddings-for-modeling-multi-relational-data.pdf>
- (9) Zheng D, Song X, Ma C, et al. DGL-KE: Training Knowledge Graph Embeddings at Scale. In: *Proceedings of the 43rd International ACM SIGIR Conference on Research and Development in Information Retrieval.* New York NY, Association for Computing Machinery, 2020 pp. 739-48. <https://experts.umn.edu/en/publications/dgl-ke-training-knowledge-graph-embeddings-at-scale>

## Acidentes domésticos e de lazer ocorridos em pessoas com 65 e mais anos durante a pandemia da COVID-19: comparação entre 2019 e 2020

Home and leisure accidents in people aged 65 and over during the COVID-19 pandemic: comparison between 2019 and 2020

Tatiana Alves<sup>1</sup>, Emanuel Rodrigues<sup>2</sup>, Mariana Neto<sup>1</sup>, Ricardo Mexia<sup>1</sup>, Carlos Matias Dias<sup>1</sup>

tatiana.alves@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Consultor externo ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para o sistema EVITA (Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes)

### \_Resumo

O presente estudo tem como finalidade contribuir para um melhor conhecimento sobre os acidentes domésticos e de lazer (ADL) ocorridos durante a pandemia da COVID-19 que motivaram o recurso ao Serviço de Urgência (SU) por pessoas com 65 e mais anos. Pretendemos assim melhorar a nossa compreensão deste fenómeno de saúde. Num contexto pandémico em que se tem observado a redução na procura dos serviços de saúde por motivos não relacionados com a patologia COVID-19, o aumento de episódios de ADL nos idosos com 65 e mais anos em 2020, comparado com 2019, reforça a necessidade de aprofundamento do estudo deste problema de saúde. A partir do sistema EVITA (Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes) foram analisados 120850 episódios de recurso ao SU devidos a ADL em pessoas com 65 e mais anos, correspondendo ao total de acidentes ocorridos em 2019 e 2020 neste grupo populacional. Em 2020 observou-se um aumento significativo do número de episódios de ADL ocorridos em casa (2020=41252; 2019=34397), causados por queda (2020=45057; 2019=43102) e com necessidade de internamento hospitalar (2020=9464; 2019=6859).

### \_Abstract

This study aims to contribute to the knowledge of the occurrence of home and leisure accidents (HLA) during the COVID-19 pandemic involving the use of emergency services by the elderly. We intend to improve our understanding of this health phenomenon. In the pandemic context in which there has been a reduction in demand for health services for causes unrelated to COVID-19 pathology, the increase of HLA episodes in the people aged 65 and over, in 2020 compared to 2019, reinforces the need to deepen the study of this health problem. From the EVITA system, 120850 episodes of HLA which required emergency room healthcare were analysed in people aged 65 and over, with significant increase in HLA number occurred at home (2020=41252; 2019=34397), due to fall (2020=45057; 2019=43102), requiring hospital admission (2020=9464; 2019=6859).

### \_Introdução

A pandemia da COVID-19 e as medidas restritivas adotadas a nível nacional, alinhadas com as orientações da União Europeia, no sentido da contenção da sua propagação têm implicado alterações no quotidiano dos cidadãos, levando a mudanças nos comportamentos individuais e na participação social (1,2).

Esta situação pandémica ao longo do último ano, conduziu a alterações também do ponto de vista dos sistemas de saúde, nas rotinas, nas estruturas e na organização dos serviços (3), tendo esta nova doença infecciosa ocupado grande parte dos recursos dos serviços de saúde (1).

Neste sentido, têm sido desenvolvidos vários estudos para aumentar o conhecimento dos efeitos da pandemia nas diferentes dimensões do individuo, tais como o bem-estar, o estado cognitivo, qualidade do sono, nível de atividade (2) e na prática desportiva (4). Alguns estudos têm avaliado também o impacto no acesso e utilização dos cuidados de saúde, nomeadamente, nos Serviços de Urgência (SU). Vários são os estudos de diferentes realidades nacionais que têm demonstrado a redução na procura dos serviços de saúde por motivos não relacionados com a patologia COVID-19, no contexto pandémico (1,3-10).

Por conseguinte, importa analisar como a situação pandémica que vivemos tem influenciado as admissões ao SU devidas a acidentes domésticos e de lazer (ADL), particularmente, no grupo dos idosos dada a sua reconhecida vulnerabilidade, frequentemente associada ao processo de envelhecimento (2).



## artigos breves\_ n. 11

O presente estudo reveste-se ainda de particular interesse e relevância pelo facto de pouco ainda se saber sobre o impacto da COVID-19 na população idosa em geral (2), e da forma como poderá ter modificado a realidade já conhecida, anterior à pandemia, que indicia este grupo como o grupo mais afetado pelos ADL (11).

### \_Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever a evolução da frequência dos episódios de acidentes domésticos e de lazer em pessoas com 65 e mais anos que recorreram ao Serviço de Urgência, em 2019 e 2020, e analisar como a pandemia afetou a distribuição deste tipo de acidente na população com 65 e mais anos quanto ao local de ocorrência, ao mecanismo de lesão e ao destino após alta.

### \_Materiais e métodos

Procedeu-se a um estudo observacional, descritivo e transversal com análise dos dados recolhidos pelo sistema de vigilância EVITA (Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes), durante os anos 2019 e 2020. A partir deste sistema foi possível monitorizar a frequência de utilização dos serviços de urgência hospitalar por ADL em 28 entidades de saúde do Serviço Nacional de Saúde (SNS) e em uma da Região Autónoma dos Açores (11).

Foi realizada a análise secundária dos dados com o apuramento das frequências absolutas e relativas (percentagens). As comparações bivariáveis foram realizadas através do teste do Qui-quadrado de Pearson para um nível de significância de 5%. Nesta análise foi utilizado o programa estatístico SPSS V.24

### \_Resultados e discussão

Os episódios de admissão ao SU de pessoas com 65 e mais anos representaram 27% (n=2279401) do total de admissões a SU durante este período (1261603 em 2019 e 1017798 em 2020).

Foram analisados 120850 episódios de ADL que motivaram o recurso ao SU durante os anos de 2019 e 2020. Destes episódios, 43198 (35,7%) ocorreram no grupo etário dos

65-74 anos e 77652 (64,3%) episódios nas pessoas com 75 e mais anos, correspondendo a 32% do total de episódios de admissão ao SU por ADL (n=382 888).

Ao analisar a distribuição mensal do número de episódios de urgência por ADL entre 2019 e 2020 é possível constatar que ocorreu durante o mês de abril de 2020 uma diminuição dos casos de ADL face a 2019, nas pessoas dos 65 aos 74 anos (24%) e com 75 e mais anos (12%). De notar que esta diminuição do recurso ao SU por ADL durante o mês de abril coincidiu com o início da pandemia da COVID-19, tendência observada em estudo anterior relativo à análise do recurso ao SU por ADL para todos as faixas etárias em Portugal, entre 2017 e 2020 (10).

Nos idosos dos 65 aos 74 anos, entre os meses de maio (n=1833) e setembro (n=2032) de 2020, observou-se um aumento significativo do número de episódios de recurso ao SU devidos a ADL em comparação com 2019 (figura 1). Tendência idêntica foi observada nos idosos com 75 e mais anos entre os meses de maio (n=3068) e de outubro (n=3487) de 2020, com o mês de agosto a registar um aumento de 33% comparativamente ao ano de 2019 (figura 2).

Em 2020 (n=64127) comparativamente ao ano de 2019 (n=56723), mais pessoas idosas vítimas de ADL recorreram aos cuidados de saúde dos SU, realidade também observada em outro estudo dos Países Baixos ao avaliarem o impacto da pandemia nas admissões aos SU por lesão (4).

No grupo dos 75 e mais anos foi observado um aumento estatisticamente significativo da proporção de admissões ao SU por ADL (63,6% em 2019 vs 64,8% em 2020,  $p < 0,01$ ), (tabela 1).

A análise da distribuição dos episódios de ADL nos idosos pelo local de ocorrência revelou a casa como o local mais frequente em ambos os anos. Em 2020 observou-se um aumento estatisticamente significativo da proporção de ADL ocorridos em casa (68,2% em 2019 vs 73,2% em 2020, 5 p.p.). Estes resultados estão em linha com dados publicados provenientes do sistema de vigilância de acidentes australiano, que revelaram um aumento das admissões ao SU por lesões ocorridas em casa, desde abril de 2020 (12).



artigos breves\_ n. 11

Figura 1: Distribuição mensal do número de episódios de acidentes domésticos e de lazer nos idosos entre 65-74 anos (2019-2020),  $p < 0,01$ .

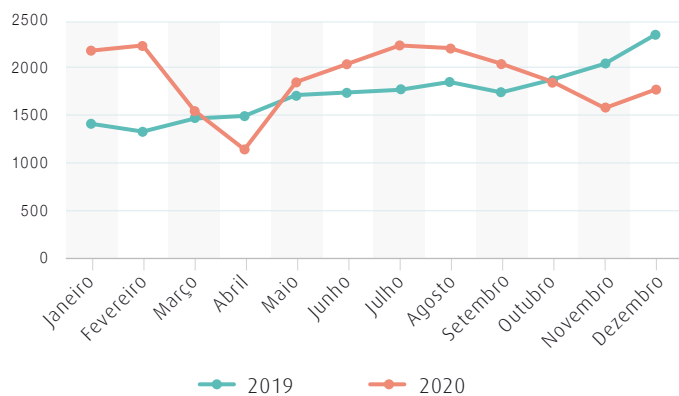


Figura 2: Distribuição mensal do número de episódios de acidentes domésticos e de lazer nos idosos com 75 e mais anos (2019-2020),  $p < 0,01$ .

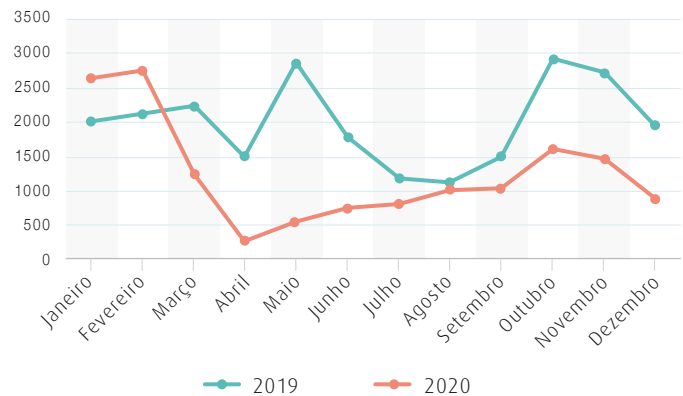


Tabela 1: Distribuição dos episódios de acidentes domésticos e de lazer em pessoas com 65 e mais anos, por sexo, grupo etário, local de ocorrência, mecanismo da lesão e destino após alta, registados no sistema EVITA (2019, 2020)

	Período em análise					
	2019		2020		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Sexo*</b>						
Homem	19702	(34,7)	22952	(35,8)	42654	(35,3)
Mulher	37021	(65,3)	41175	(64,2)	78196	(64,7)
<b>Grupo etário*</b>						
65-74	20628	(36,4)	22570	(35,2)	43198	(35,7)
75+	36095	(63,6)	41557	(64,8)	77652	(64,3)
<b>Local de ocorrência*</b>						
Casa	34397	(68,2)	41252	(73,2)	75649	(70,8)
Ar livre	5103	(10,1)	5203	(9,2)	10306	(9,7)
Recintos públicos	4713	(9,3)	4459	(7,9)	9172	(8,6)
Área de transporte	3342	(6,6)	2787	(4,9)	6129	(5,7)
Campo	1785	(3,5)	1899	(3,4)	3684	(3,4)
Área de comércio	683	(1,4)	566	(1,0)	1249	(1,2)
Área de diversão	386	(0,8)	219	(0,4)	605	(0,6)
<b>Mecanismo da lesão*</b>						
Queda	43102	(88,8)	45057	(89,4)	88159	(89,1)
Compressão, corte	2210	(4,6)	2295	(4,6)	4505	(4,6)
Contacto com ...	2106	(4,3)	2002	(4,0)	4108	(4,2)
Esforço exagerado	434	(0,9)	343	(0,7)	777	(0,8)
Corpo estranho	247	(0,5)	238	(0,5)	485	(0,5)
Queimadura	223	(0,5)	235	(0,5)	458	(0,5)
Intoxicação	223	(0,5)	243	(0,5)	466	(0,5)
<b>Destino após alta*</b>						
Exterior, não ref.	26357	(46,5)	29304	(45,7)	55661	(46,1)
Referenciado	20320	(35,8)	22174	(34,6)	42494	(35,2)
Internamento	6859	(12,1)	9464	(14,8)	16323	(13,5)
Transferido hospital	2065	(3,6)	1958	(3,1)	4023	(3,3)
Abandono	813	(1,4)	887	(1,4)	1700	(1,4)
Outro	259	(0,5)	233	(0,4)	492	(0,4)
Falecido	50	(0,1)	107	(0,2)	157	(0,1)

\*  $p < 0,01$



artigos breves\_ n. 11

Por outro lado, os valores da proporção de ADL ocorridos nos restantes locais, como em área de transporte (4,9% vs 6,6%), ao ar livre (9,2% vs 10,1%) ou em recintos públicos (7,9% vs 9,3%) foram inferiores em 2020 quando comparados a 2019 (tabela 1).

Quanto aos mecanismos de lesão que mais contribuíram para o número de episódios de ADL nos idosos, as quedas destacaram-se como a causa mais frequente, tanto em 2019 (88,8%), como em 2020 (89,4%). Este aumento dos ADL por queda no ano de 2020 foi igualmente revelado num estudo desenvolvido nos Países Baixos com o objetivo de determinar o impacto da pandemia da COVID-19 nas admissões aos SU do trauma por lesão, durante o primeiro confinamento (4).

O predomínio do mecanismo de lesão “queda” foi igualmente referido, quer num estudo desenvolvido em Londres com o intuito de avaliar o impacto da pandemia da COVID-19 nas lesões em doentes do foro ortopédico (7), quer pelos boletins mensais produzidos pelo sistema de vigilância de acidentes australiano (11) no âmbito da caracterização das lesões não intencionais ocorridas em casa.

Importa, também, sublinhar o aumento do número de episódios de ADL em pessoas com 65 e mais anos por queimadura (n= 235) e intoxicação (n=243) em 2020, em relação ao ano anterior (tabela 1).

Uma análise idêntica dos episódios de ADL nos idosos quanto ao seguimento após alta (destino após alta), destaca a categoria “Exterior não referenciado” correspondente a situações em que a observação e os cuidados prestados no ambiente dos SU foram suficientes, como a mais frequente em 2019 (46,5%) e em 2020 (45,7%).

De referir, o aumento em 2020 da proporção de episódios de ADL nos idosos que resultaram em internamento (14,8% vs 12,1% em 2019). Esta diferença foi igualmente observada num estudo desenvolvido num hospital universitário de referência na área da traumatologia, em Espanha, com o propósito de demonstrar o impacto da pandemia da COVID-19 (5).

Considerando a redução da procura dos serviços de saúde para a maioria das causas de doença ou acidente que, habitualmente, motivam deslocações ao SU durante o ano

de 2020, os dados aqui apresentados ao revelarem um aumento da frequência de ADL nas pessoas com 65 e mais anos reforçam a relevância e atualidade deste problema de saúde pública.

É de notar que, apesar do eventual receio de contágio da COVID-19 subjacente à utilização do SU durante o ano de 2020 (5), se observou que na população idosa os episódios de ADL mantiveram-se frequentes, sendo que em alguns meses existiu uma tendência crescente.

Para melhor compreender esta realidade devemos ainda considerar as medidas de contenção da doença COVID-19, que reforçaram a necessidade de permanecer em casa por forma a reduzir o risco de contágio e que foram particularmente dirigidas aos grupos mais vulneráveis, como os idosos. Neste quadro, deverá ser tido em conta o risco de menor atividade física, com eventual reflexo no equilíbrio dos idosos, podendo resultar numa maior predisposição a situações de queda (13,2).

### Conclusão

Apesar da diminuição global da procura de cuidados de Serviços de Urgência (SU) em 2020, em linha com o verificado em estudo anterior quanto à menor proporção de admissões ao SU devidas a acidentes domésticos e de lazer (ADL) nesse ano (10), este revelou um aumento de 13% no número de episódios de admissão ao SU por ADL nas pessoas com 65 e mais anos em 2020, quando comparado com 2019. Tal facto reforça a necessidade de aprofundamento do estudo deste problema de saúde pública, sobretudo em contexto pandémico.

No período em análise, a maioria dos episódios de ADL ocorreu em idosos com 75 e mais anos (64,3%), mostrando-se mais relevante no sexo feminino (64,7%). Estes acidentes ocorreram sobretudo por queda (89,1%) e em casa (70,8%), requerendo em 48,7% dos casos seguimento ou observação posterior à admissão no SU.



### Referências bibliográficas:

- (1) Hernigou J, Morel X, Callewier A, et al. Staying home during "COVID-19" decreased fractures, but trauma did not quarantine in one hundred and twelve adults and twenty eight children and the "tsunami of recommendations" could not lockdown twelve elective operations. *Int Orthop.* 2020 Aug;44(8):1473-80. <https://doi.org/10.1007/s00264-020-04619-5>
- (2) De Pue S, Gillebert C, Dierckx E, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on wellbeing and cognitive functioning of older adults. *Sci Rep.* 2021 Feb 25; 11(1):4636. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84127-7>
- (3) Kapsner LA, Kampf MO, Seuchter SA, et al. Reduced Rate of Inpatient Hospital Admissions in 18 German University Hospitals During the COVID-19 Lockdown. *Front Public Health.* 2021 Jan 13;8:594117. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.594117>
- (4) van Aert GJJ, van der Laan L, Boonman-de Winter LJM, et al. Effect of the COVID-19 pandemic during the first lockdown in the Netherlands on the number of trauma-related admissions, trauma severity and treatment: the results of a retrospective cohort study in a level 2 trauma centre. *BMJ Open.* 2021 Feb 19;11(2):e045015. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-045015>
- (5) Nuñez JH, Sallent A, Lakhani K, et al. Impact of the COVID-19 Pandemic on an Emergency Traumatology Service: Experience at a Tertiary Trauma Centre in Spain. *Injury.* 2020 Jul;51(7):1414-18. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.05.016>
- (6) Kuitunen I, Ponkilainen VT, Launonen AP, et al. The effect of national lockdown due to COVID-19 on emergency department visits. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2020 Dec 4;28(1):114. <https://doi.org/10.1186/s13049-020-00810-0>
- (7) Park C, Sugand K, Nathwani D, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on orthopedic trauma workload in a London level 1 trauma center: the "golden month". *Acta Orthop.* 2020 Oct;91(5):556-61. <https://doi.org/10.1080/17453674.2020.1783621>
- (8) Ohm E, Hauge LJ, Madsen C, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the treatment of injuries during lockdown in Norway. *Scand J Public Health.* 2021 Feb 24;1403494821993725. <https://doi.org/10.1177/1403494821993725>
- (9) Pichard R, Kopel L, Lejeune Q, et al. Impact of the COVID-19 Disease 2019 lockdown on hand and upper limb emergencies: experience of a referred university trauma hand centre in Paris, France. *Int Orthop.* 2020 Aug;44(8):1497-1501. <https://doi.org/10.1007/s00264-020-04654-2>
- (10) Alves T, Rodrigues E, Neto M, et al. Acidentes domésticos e de lazer em tempos da pandemia da COVID-19 em Portugal. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2020;9(Supl 12):29-32. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7252>
- (11) Rodrigues E, Mexia R, Neto M, et al. EVITA—Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes: relatório 2013-2015. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge IP, 2016. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4380>
- (12) Monash University. Accident Research Center. Injuries during the COVID-19 pandemic. *VISU Bulletin No 2, 2020.* [https://www.monash.edu/\\_data/assets/pdf\\_file/0006/2246604/COVID-19-VISU-Bulletin-2.pdf](https://www.monash.edu/_data/assets/pdf_file/0006/2246604/COVID-19-VISU-Bulletin-2.pdf)
- (13) Palma, CS. Queda nos idosos: do risco à prevenção. Dissertação de mestrado em Enfermagem em Saúde Comunitária, Instituto Politécnico de Beja. Escola Superior de Saúde, 2012. <http://hdl.handle.net/10400.26/3975>



2021  
número

30

www.insa.pt

## ficha técnica

**\_ Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_ Periodicidade:** Quadrimestral

**\_ ISSN:** 0874-2928, 2182-8873 (em linha)

**\_ Numeração:** 2.ª série

Volume 10, número 30, 2021

maio-agosto 2021

**\_ Diretor**

Fernando de **Almeida**, Presidente do Conselho Diretivo do INSA

**\_ Editores**

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

**\_ Conselho Editorial Científico**

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Luciana **Costa**, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis

Jorge **Machado**, Departamento de Doenças Infeciosas

Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental

Maria João **Silva**, Departamento de Genética Humana

Rita **Batista**, Departamento de Alimentação e Nutrição

Peter **Jordan**, Conselho Científico do INSA

**\_ Coordenação técnica** Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

**\_ Composição e paginação** Francisco **Tellechea**, Biblioteca da Saúde

(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

Entidade proprietária:

**Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge**

Sede de redação/editor:

Av. **Padre Cruz**, 1649-016 **Lisboa, Portugal**

**NIPC:** 501427511

**Tel.:** (+351) 217 519 200

**Fax:** (+351) 217 529 400

**E-mail:** info@insa.min-saude.pt

**www.insa.min-saude.pt**

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.

Isento de Registo na ERC ao abrigo do Decreto-Regulamento 8/99 de 9 de junho artº 12º nº1 a).