



# Observações

— Boletim Epidemiológico

editorial\_

## Informação ao consumidor e promoção da saúde

*Consumer information and health promotion*

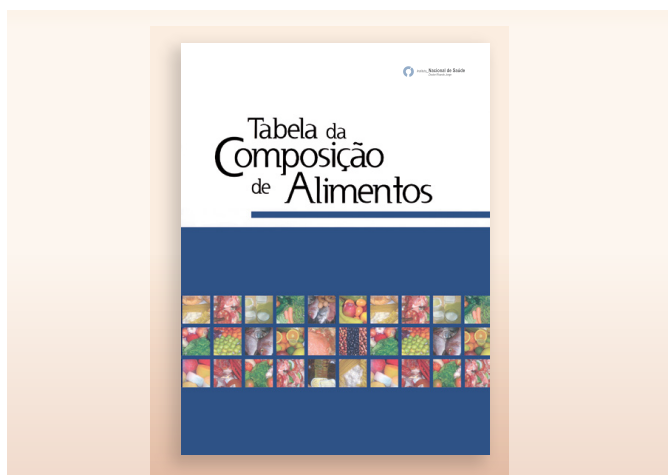
A promoção da saúde e, designadamente, de medidas de alimentação saudável, são uma das grandes prioridades do atual Governo Constitucional, como tentativa de resposta ao crescente aumento da obesidade e de doenças associadas (cardiovasculares, oncológicas, diabetes). As Políticas Saudáveis – forma como é definido um dos quatro eixos estratégicos do atual Plano Nacional de Saúde – estabelecem que todos devem procurar contribuir para, entre outras, a criação de condições promotoras e protetoras da saúde e do bem-estar dos cidadãos, bem como assegurar que estes têm acesso a uma informação adequada sobre os alimentos e igual oportunidade de fazer escolhas saudáveis e uma utilização segura dos géneros alimentícios que consomem.

Neste contexto, a entrada em vigor do Regulamento (UE) n.º 1169/2011 (<http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>), constituiu um grande suporte e um importante instrumento aliado à implementação destas políticas de saúde, no que se refere, em concreto, à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, em particular, através da sua rotulagem, proporcionando uma base para que estes façam escolhas mais adequadas. A recente entrada em aplicação da alínea I), do artigo 9.º do referido Regulamento, em 13 de dezembro passado, que obriga à indicação da declaração nutricional na embalagem de todos os géneros alimentícios pré-embalados, vem reforçar a base para que os princípios

orientadores destas políticas, que defendem o direito dos consumidores à informação sobre os alimentos e a educação nutricional da população, sejam implementados.

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), através do seu Departamento de Alimentação e Nutrição, tem acompanhado com grande atenção e compromisso todas estas medidas, procurando participar e intervir de forma relevante na prossecução destes objetivos, sobretudo no que se refere à disponibilização de informação sobre as características nutricionais dos géneros alimentícios, em prol da saúde da população.

A Tabela da Composição de Alimentos (TCA), elaborada e editada pelo INSA, é o documento de referência sobre a composição nutricional dos alimentos portugueses, cuja informação resulta predominantemente de análises a géneros alimentícios realizadas nos seus laboratórios. Este documento tem vindo a ser atualizado desde os primeiros estudos analíticos de nutrientes em alimentos, em 1930, por Gonçalves Ferreira, contendo a última edição (2016) 1149 alimentos e 43 componentes. A TCA encontra-se atualmente disponível para consulta *online* (<http://portfir.insa.pt>), e constitui uma fonte de dados estabelecidos e aceites, podendo desta forma ser uma importante ferramenta para as empresas, nomeadamente para o cálculo dos valores energéticos e das quantidades dos nutrientes que devem constar na declaração nutricional obrigatória dos seus produtos (de acordo com o Regulamento (EU) n.º 1169/2011), bem como para os profissionais de saúde, por exemplo na orientação de dietas, e para o próprio consumidor, permitindo-lhe fazer escolhas mais informadas.



Os primeiros materiais de apoio aos professores, que lecionam disciplinas em cujos programas estes temas se enquadram, estão disponíveis no *website* do INSA, em:

[www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/Paginas/EducarparaPrevenir.aspx](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/Paginas/EducarparaPrevenir.aspx)

Assim, o INSA continuará a seguir de forma cada vez mais ativa este percurso, procurando garantir à população a disponibilização de mais e melhor informação sobre os alimentos que consomem e contribuir para a tomada de decisões mais esclarecidas na defesa da saúde pública.

Para potenciar a centralização, compilação, análise e gestão dos dados produzidos em Portugal, permitindo uma melhor utilização dos recursos disponíveis no país, e pondo-os ao serviço da comunidade foi criado, em 2008, o programa PortFIR (Portal de Informação Alimentar). O PortFIR envolve cerca de 60 entidades públicas/privadas, que entre outros objetivos tem procurado reunir informação alimentar e dados analíticos, dispersos pela indústria, universidades e/ou outras entidades públicas ou privadas, compilando-os de forma a carregar continuamente uma plataforma de informação, centralizada e atualizada, sobre composição, contaminação e consumos alimentares, onde se inclui a TCA.

Roberto Brazão, Maria da Graça Dias, Silvia Viegas

*Investigadores da Unidade de Observação e Vigilância  
Departamento de Alimentação e Nutrição  
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*



Poderíamos, ainda, referir outras iniciativas sobre disponibilização de informação aos consumidores:

- a ação “Ciência e Cultura mas que Mistura”, que se realizou pela primeira vez em 2016 e que pretendeu aproximar os cidadãos da comunidade científica do Instituto e do trabalho desenvolvido nesta área, transmitindo conhecimento técnico sobre a TCA de forma informal;
- o projeto “Educar para Prevenir”, focado no aumento da literacia da população estudantil, dos vários níveis de ensino, em áreas distribuídas por três módulos: segurança alimentar, composição nutricional dos alimentos - em concreto a promoção da utilização da TCA, e rotulagem alimentar.



neste número\_

**\_Editorial**

- Informação ao consumidor e promoção da saúde** p01  
*Consumer information and health promotion*  
Roberto Brazão, Maria da Graça Dias, Sílvia Viegas

**\_Artigos Breves**

*Promoção de uma Alimentação saudável*

- 1\_ A importância das leguminosas na alimentação, nutrição e promoção da saúde** p04  
*The importance of legumes in food, nutrition and health promotion*  
Carla Motta, Cristina Bento, Ana C. Nascimento, Mariana Santos
- 2\_ Identificação de alimentos ricos em selénio e iodo consumidos pela população portuguesa** p08  
*Identification of foods rich in selenium and iodine consumed by the Portuguese population*  
Marta Ventura, Sandra Gueifão, Inês Coelho, Inês Delgado, Andreia Rego, Isabel Castanheira
- 3\_ Sementes edíveis: composição em ácidos gordos e impacto na saúde** p12  
*Edible seeds: fatty acids composition and potential health impact*  
Tânia Gonçalves Albuquerque, Mafalda Alexandra Silva, M. Beatriz P.P. Oliveira, Helena S. Costa
- 4\_ O sal na alimentação dos portugueses** p17  
*The salt in Portuguese diet*  
Mariana Santos, Ana Cláudia Nascimento, Susana Santiago, Ana Carolina Gama, Maria Antónia Calhau
- 5\_ Haverá diferenças nutricionais entre produtos de pastelaria com e sem glúten?** p21  
*Are there differences from a nutritional point of view between bakery products with and without gluten?*  
Tânia Gonçalves Albuquerque, Mafalda Alexandra Silva, M. Beatriz P.P. Oliveira, Helena S. Costa
- 6\_ Perspetiva do consumidor relativa aos efeitos na saúde associados ao consumo de sumos detox** p25  
*Consumer perspective on health effects associated with consumption of detox juices*  
Inês Carvalho Santos, Helena S. Costa, Mafalda A. Silva, Ana Valente, Tânia Gonçalves Albuquerque
- 7\_ Óleos essenciais: atividade biológica *in vitro* e sua potencial aplicação a embalagens alimentares** p29  
*Essential oils: in vitro biological activity and their potential application to food packaging*  
Regiane Ribeiro-Santos, Mariana Andrade, Nathália Ramos de Melo, Ana Sanches-Silva

*Segurança alimentar*

- 8\_ Primeiro caso de botulismo tipo F, em Portugal** p34  
*First case of botulism type F, in Portugal*  
Margarida Saraiva, Teresa Teixeira Lopes, André Militão, Rosa Santos Ribeiro, Adelaide Coelho, Isabel Bastos Moura, Cláudia Pena, Conceição Costa Bonito, Isabel Campos Cunha, Isabel Sousa, Maria Manuel Toscano, Rosália Furtado, Sílvia Marcos, Susana Santos, Teresa Teixeira Lopes, Leonor Silveira, Jorge Machado, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau
- 9\_ Investigação laboratorial de surtos de toxinfecções alimentares, 2015** p36  
*Foodborne outbreaks laboratory investigation, 2015*  
Sílvia Viegas, Isabel Campos Cunha, Cristina Belo Correia, Anabela Coelho, Carla Maia, Cláudia Pena, Conceição Costa Bonito, Cristina Flores, Isabel Bastos Moura, Isabel Sousa, Maria João Barreira, Maria Manuel Toscano, Rosália Furtado, Sílvia Marcos, Susana Santos, Teresa Teixeira Lopes, Leonor Silveira, Jorge Machado, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau

- 10\_ Detecção de norovírus e vírus hepatite A em géneros alimentícios** p40  
*Detection of norovirus and hepatitis A virus in foodstuffs*  
Anabela Coelho, Rosália Furtado, Cristina Belo Correia, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau
- 11\_ Avaliação dos teores de patulina em sumos de fruta durante o processamento industrial** p45  
*Assessment of patulin contents in fruit juices through industrial processing*  
Carla Martins, Tânia Santos, Inês Silva, Carmen Pinheiro, Paula Alvito
- 12\_ Monitorização microbiológica em produtos de charcutaria cozidos, fatiados em talhos** p49  
*Microbiologic survey in sliced cooked meat products, purchased at butcheries*  
Isabel Soares Sousa, Conceição Costa Bonito, Maria Manuel Toscano, Teresa Teixeira Lopes, Isabel Bastos Moura, Isabel Campos Cunha, Cláudia Pena, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau
- 13\_ Challenge tests para avaliar o período de vida útil secundário em fiambre fatiado pré-embalado** p52  
*Challenge tests to evaluate secondary shelf-life of pre-packed sliced ham*  
André Sousa, Conceição Costa Bonito, Isabel Sousa, Maria Manuel Toscano, Isabel Bastos Moura, Teresa Teixeira Lopes, Cláudia Pena, Isabel Campos Cunha, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau
- 14\_ Tratamento de águas para consumo humano: um episódio de sobrevivência de cianobactérias** p56  
*Treatment of water for human consumption: a case of cyanobacterial survival*  
Carina Menezes, Olga Martins, Elsa Dias



## **A importância das leguminosas na alimentação, nutrição e promoção da saúde**

### *The importance of legumes in food, nutrition and health promotion*

Carla Motta, Cristina Bento, Ana C. Nascimento, Mariana Santos

carla.motta@insa.min-saude.pt

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

#### **\_Resumo**

A ONU declarou o ano de 2016 como Ano Internacional das Leguminosas Secas com o propósito de elevar a consciência das comunidades sobre a importância do papel destes alimentos, em diversas áreas entre elas a saúde e a nutrição. As Leguminosas são por definição grãos contidos em vagens. Estas dividem-se em leguminosas secas, que incluem o feijão, grão, soja e lentilhas e frescas como as ervilhas e as favas. Do ponto de vista nutricional, as leguminosas são ricas em hidratos de carbono de absorção lenta, fibra, proteínas, vitaminas do complexo B, minerais, como o cálcio, ferro, fósforo, potássio e magnésio, e fitoquímicos como os compostos fenólicos. Considerando os valores de ingestão diária recomendados pela EFSA podemos verificar que o consumo de 100 g de feijão manteiga, preto ou de ervilhas suprem mais de 30% da recomendação de ingestão em fibra, 19% da ingestão proteica e no caso da soja 30% da ingestão em zinco, magnésio e fósforo. Por serem isentos de glúten podem constituir, para os doentes celíacos, excelentes alternativas alimentares, nomeadamente na substituição de farinhas em produtos de panificação. Estudos epidemiológicos comprovaram que o consumo de leguminosas pode diminuir em 22% o risco de doença coronária por diminuição dos fatores de risco, por melhoria do perfil lipídico, diminuição da pressão arterial, da atividade plaquetária e da inflamação. Pelas suas características demonstram possuir um importante papel, nomeadamente, na prevenção de diversas doenças crónicas como a diabetes *mellitus*, na doença celíaca e na redução do risco de obesidade e doença cardiovascular.

#### **\_Abstract**

The United Nations declared 2016 the International Year of Pulses with the purpose of raising the awareness of communities about the importance of the role of these foods in various areas, including health and nutrition. Pulses are annual leguminous crops yielding from one to 12 grains or seeds of variable size, shape and colour within a pod. From a nutritional point of view, leguminous crops are rich in carbohydrates of slow absorption, fiber, protein, B vitamins, minerals such as calcium, iron, phosphorus, potassium and magnesium, and phenolic compounds. Considering the daily intake values recommended by EFSA, we can verify that the consumption of 100g of butter beans, black beans or peas supply more than 30% of this recommendation on fiber intake, 19% on protein intake, in the case of soy 30% of zinc, magnesium and phosphorus intake. Because Pulses are gluten-free, may be excellent alternatives for celiac patients, especially in the substitution of flour in bakery products. Epidemiological studies have shown that the consumption of leguminous crops can reduce the risk of coronary heart disease by 22% because of a decrease in risk factors, by improving the lipid profile, decreasing blood pressure, platelet activity

and inflammation. For their characteristics, they play an important role, especially in the prevention of various chronic diseases such as diabetes mellitus, celiac disease and reduced the risk of obesity and cardiovascular disease.

#### **\_Introdução**

A Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU) declarou 2016, o Ano Internacional das Leguminosas sob o lema "Sementes nutritivas para um futuro sustentável", com o propósito de elevar a consciência das comunidades sobre a importância do papel destes alimentos, em diversas áreas entre elas a saúde e a nutrição. Com o principal objetivo de "ajudar a eliminar a fome, a insegurança alimentar e a desnutrição" e "tornar a agricultura mais produtiva", define uma série de objetivos, entre os quais a consciencialização das populações sobre os benefícios para a agricultura e para a nutrição <sup>(1)</sup>. As leguminosas são por definição grãos contidos em vagens. Estas dividem-se em leguminosas secas, que incluem o feijão, grão, soja e lentilhas e as leguminosas frescas, como as ervilhas e as favas.

Em Portugal, o consumo ainda é bastante baixo quando comparado, por exemplo com cereais como o arroz e trigo. Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), em 2014 Portugal apresentou um consumo de 4 kg por habitante. Destes cerca de 3 kg correspondem ao consumo de feijão <sup>(2)</sup>.

Do ponto de vista nutricional caracterizam-se por serem ricas em hidratos de carbono de absorção lenta, fibra, proteínas, vitaminas do complexo B, minerais como o cálcio, ferro, fósforo, potássio e magnésio e fitoquímicos, como os compostos fenólicos <sup>(3)</sup>. No entanto, as leguminosas possuem diversas substâncias anti nutricionais, que inibem a disponibilidade de certos nutrientes, sendo uma destas substâncias os fitatos <sup>(4)</sup>.



## artigos breves\_ n. 1

Os fitatos possuem a capacidade de se ligar com iões de minerais, nomeadamente, de cálcio e magnésio, diminuindo a sua absorção intestinal. A demolha em água, prévia à cozedura, permite eliminar uma parte significativa desses fatores anti nutricionais.

Avaliando a qualidade proteica, do ponto de vista da composição em aminoácidos, verificamos que existem aminoácidos essenciais que se apresentam como limitantes, nomeadamente aminoácidos sulfurados. Assim e apesar destes alimentos serem considerados fonte proteica devemos associar a sua ingestão a cereais e produtos da carne para colmatar a limitação nesses aminoácidos.

Pela sua composição em proteínas são muito usadas como substitutos de outras fontes proteicas como a carne, o peixe ou os ovos. Segundo as recomendações da roda dos alimentos devem ser consumidas uma a duas porções diárias. Uma porção corresponde a três colheres de sopa de leguminosas cozinhadas (80 g) (5).

Estudos epidemiológicos comprovaram que o consumo de leguminosas 4 vezes por semana consegue diminuir em 22% o risco de doença coronária com a diminuição dos fatores de risco, como sejam um melhor perfil lipídico, a diminuição da pressão arterial, da atividade plaquetária e da inflamação (6,7).

Devido ao seu elevado teor de fibra e de hidratos de carbono de absorção lenta, as leguminosas são muito saciantes (8). Estas propriedades são também responsáveis pela manutenção dos níveis de açúcar no sangue dentro de valores normais após as refeições (3).

Pelas razões já atrás referidas estes alimentos podem ter um papel essencial no controlo do peso (8-10). Existem atualmente alguns estudos que correlacionam a ingestão deste tipo de alimentos com a diminuição do risco de alguns tipos de cancro, no entanto, nesta área são ainda necessários mais estudos.

Também para os doentes celíacos as leguminosas representam excelentes alternativas alimentares, nomeadamente na substituição de farinhas em produtos de panificação (11, 12).

## \_Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar, de acordo com as recomendações nutricionais, e tendo como base a composição em diversos nutrientes, a contribuição de diferentes tipos de leguminosas para suprir as recomendações nutricionais.

## \_Materiais e métodos

A amostragem foi realizada durante os anos de 2015 e 2016, em superfícies comerciais nas regiões de Lisboa e Porto. As amostras estavam já cozidas e enlatadas ou congeladas. As amostras congeladas foram cozinhadas posteriormente, de acordo com as indicações das embalagens.

Neste estudo, as amostras foram analisadas em condições de garantia da qualidade, cumprindo os requisitos descritos na norma EN ISO/IEC 17025:2005 (13), de acordo com os métodos publicados por Nascimento *et al.* (2014) (14).

## \_Resultados e discussão

No que diz respeito à composição nutricional, nomeadamente aos macronutrientes podemos verificar que as leguminosas após cozedura apresentam valores elevados de proteína e fibra (tabela 1). Assim, se considerarmos as recomendações da *European Food Safety Authority* (EFSA), de 25 g de ingestão diária para a fibra alimentar (15), podemos verificar que 100 g de feijão manteiga, preto ou de ervilhas suprem mais de 30% dessa recomendação (DRV- *Dietary Reference Value*), podendo assim ser considerados como alimentos ricos em fibra.

Avaliando a qualidade proteica verificamos do ponto de vista da composição em proteína, estes alimentos podem ser considerados fonte proteica, fornecendo entre 11% a 25% da proteína recomendada.

No que diz respeito ao perfil em minerais (tabela 2) verificamos que na sua maioria suprem mais de 15% da ingestão diária recomendada, no entanto, é de salientar que no caso da soja para o Zn, Mg e P essa percentagem ultrapassa os 30%, tornando estes alimentos ricos nestes minerais. As leguminosas frescas quando comparadas com as secas apresentam sempre valores mais baixos destes minerais.

Tabela 1: Composição nutricional das leguminosas cozidas (g/100g).

	Água	Proteína	Gordura total	Hidratos de Carbono	Fibra alimentar	Kcal
Leguminosas secas cozidas						
Feijão branco	70	6,6	0,5	15	6,7*	91
Feijão manteiga	69	7,8*	0,6	14	7,0**	94
Feijão frade	66	8,8*	0,7	18	4,7*	116
Feijão preto	66	8,8*	0,5	19	8,7**	132
Grão de bico	66	8,4*	2,1	17	5,1*	116
Lentilhas	67	9,1*	0,3	17	4,4*	108
Soja	67	12,5*	7,5	5,6	5,6*	140
Leguminosas frescas cozidas						
Ervilhas	79	5,6	0,5	7,5	7,3**	57
Favas	79	6,7	0,5	7,4	5,8*	61

\* 15% < DRV < 30% \*\* DRV > 30%

Tabela 2: Perfil mineral de leguminosas cozidas (mg/100g).

	Fe	Zn	Mg	Ca	P	K
Leguminosas secas						
Feijão branco	2,5*	1,0*	47*	65	120*	320
Feijão manteiga	2,7**	1,0*	51*	50	148*	415
Feijão frade	1,9*	1,1*	47*	21	140*	320
Feijão preto	2,1*	1,1*	70**	27	140*	355
Grão de bico	2,1*	1,2*	39*	46	83	270
Lentilhas	2,3*	1,4**	33*	25	106*	278
Soja	2,6*	1,4**	84**	82	235**	513
Leguminosas frescas						
Ervilhas	1,2	0,7	19	32	91	160
Favas	1,0	0,9	30	24	79	233

\* 15% < DRV < 30% \*\* DRV > 30%

## \_Conclusões

Devido às suas propriedades nutricionais, o consumo de leguminosas contribui para uma alimentação saudável.

Pelas suas características demonstram possuir um importante papel, nomeadamente, na prevenção de doenças como a diabetes, a doença cardiovascular e a obesidade.



#### Referências bibliográficas:

- (1) Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Year of Pulses 2016 [Em linha]. [consult. 22/12/2016]. [www.fao.org/pulses-2016/en/](http://www.fao.org/pulses-2016/en/)
- (2) Instituto Nacional de Estatística. Indicadores-Consumo humano de leguminosas secas per capita (kg/ hab.) por Espécie de leguminosas secas entre 2014 / 2015 e 2010 / 2011. [Em linha]. [consult. 22/12/2016]. [www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000192&contexto=bd&selTab=tab2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000192&contexto=bd&selTab=tab2)
- (3) Mudryj AN, Yu N, Aukema HM. Nutritional and health benefits of pulses. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(11):1197-204.
- (4) Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res.* 1982;28:1-92.
- (5) Direção Geral da Saúde. Roda dos Alimentos, Tabela de Equivalentes. Lisboa: DGS, 2012.
- (6) Bazzano LA, Thompson AM, Tees MT, et al. Non-soy legume consumption lowers cholesterol levels: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21(2):94-103. Epub 2009 Nov 25. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2888631/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2888631/)
- (7) Papanikolaou Y, Fulgoni VL 3rd. Bean consumption is associated with greater nutrient intake, reduced systolic blood pressure, lower body weight, and a smaller waist circumference in adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(5):569-76.
- (8) Jenkins DJ, Kendall CW, Augustin LS, et al. Effect of legumes as part of a low glycemic index diet on glycemic control and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med.* 2012;172(21):1653-60.
- (9) American Diabetes Association. Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2007;30(Suppl 1):S48-65.
- (10) Venn BJ, Perry T, Green TJ, et al. The effect of increasing consumption of pulses and wholegrains in obese people: a randomized controlled trial. *J Am Coll Nutr.* 2010;29(4):365-72.
- (11) Han J, Janz JAM, Gerlat M. Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Res Int.* 2010;43(2):627-633.
- (12) Rohn S, van Griensven L. Grain legumes and further gluten free legumes: science, technology and impacts on human health. *Food Res. Int.* 2015;76 (Part 1), 1-2.
- (13) NP EN ISO/IEC 17025/2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- (14) Nascimento AC, Mota C, Coelho I, et al. Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays L.*) consumed in the North of Argentina: proximates, minerals and trace elements. *Food Chem.* 2014 ;148:420-6. Epub 2013 Oct 17.
- (15) EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal.* 2010; 8(3):1462. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2010.1462/full>



## Identificação de alimentos ricos em selênio e iodo consumidos pela população portuguesa

### Identification of foods rich in Selenium and Iodine consumed by the Portuguese population

Marta Ventura, Sandra Gueifão, Inês Coelho, Inês Delgado, Andreia Rego, Isabel Castanheira

Isabel.castanheira@insa.min-saude.pt

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

#### \_Resumo

O selênio e o iodo são micronutrientes essenciais para a síntese das hormonas da tiroide e para o seu funcionamento. Sendo a alimentação a principal fonte destes oligoelementos, o objetivo deste trabalho foi a determinação de iodo e selênio em alimentos consumidos pelos portugueses. A metodologia de amostragem seguiu as recomendações do projeto TDS-Exposure. Os mil setecentos e sessenta e quatro alimentos recolhidos foram agrupados em *pools* de 12 amostras e analisados por ICP-MS, em condições de controlo de qualidade acreditadas pela norma NP EN ISO/IEC 17025:2005. Em cada *pool* foi calculada a contribuição do selênio para a dose diária recomendada (DDR). Partindo de dados de iodo recentes obtidos nas mesmas condições, foi calculado, para cada alimento a sua contribuição para a DDR de iodo. O grupo do pescado foi onde se identificaram os alimentos mais ricos em selênio, seguido da carne, ovos e laticínios. Em várias *pools* de frutas e vegetais o teor de selênio não foi quantificável estando abaixo do limite de quantificação do método analítico. Quando calculadas as contribuições dos alimentos em estudo para as doses diárias recomendadas de iodo e selênio estimou-se que uma porção de peixe magro pode contribuir com 48% da DDR de iodo e 100% de selênio enquanto três porções de laticínios podem suprimir até 48% da DDR de iodo. Com base nestes resultados que se suportam em teores obtidos em alimentos representativos da dieta portuguesa, uma alimentação rica em pescado e laticínios pode suprir as doses diárias recomendadas para iodo e selênio, para uma população saudável.

#### \_Abstract

Selenium and iodine are essential micronutrients for the synthesis of thyroid hormones as well as for their functioning. Being food the main source of these trace elements the objective of this work was the determination of iodine and selenium in foods consumed by the Portuguese population. The sampling methodology followed the recommendations of the TDS-Exposure project. The one thousand seven hundred and sixty four collected foods were grouped in pools of 12 samples and analyzed by ICP-MS under conditions of quality control accredited under NP EN ISO/IEC 17025:2005. The contribution of selenium to the recommended daily intake (RDI) was calculated for each pool. Based on recent iodine data obtained under the same conditions as the present work, for the contribution of each food to iodine RDI was calculated. The fish group provided the richest foods in selenium, followed by meat, eggs and dairy products. In several fruit and vegetable pools selenium contents were not quantifiable since results were below the limit of quantification of the analytical method. When calculating the contribution of the foods under study to the RDI of iodine and selenium it was estimated that one portion

of lean fish could contribute up to 48% of the RDI of iodine and 100% of selenium, while three portions of dairy products can suppress up to 48% of iodine RDI. The present results, which are based on levels of selenium and iodine obtained for foods representative of the Portuguese food consumption, evidence that for a healthy population a diet rich in fish and dairy products can fully supply the RDI for these two micronutrients.

#### \_Introdução

O selênio e o iodo são micronutrientes envolvidos na biossíntese das hormonas da tiroide e no seu funcionamento. Existe evidência que o baixo teor de selênio e de iodo aumenta também o risco de doenças autoimunes da tiroide (1). Os níveis plasmáticos destes oligoelementos estão correlacionados com os seus aportes diários, dado a alimentação ser a fonte essencial de iodo e de selênio (2). Nesta década, Portugal acompanhou os esforços a nível europeu que permitiram melhorar o aporte diário de selênio e iodo. Porém estudos recentes mostraram existir ainda alguma carência na maioria da população da União Europeia (1,3). Decorrem neste momento estudos epidemiológicos a nível europeu para avaliar as consequências da carência ligeira de iodo e de selênio (4). Sendo Portugal um dos países com um elevado consumo de pescado, os seus dados podem ser uma contribuição para estes estudos desde que suportados por valores robustos. Em trabalhos anteriores e recentemente publicados caracterizámos o perfil de iodo nos alimentos representativos da dieta portuguesa (5). Assim, existindo a necessidade de se conhecer a contribuição dos alimentos para a dose diária recomendada de iodo e selênio, torna-se necessário determinar o teor de selênio nestes alimentos. Esta informação reveste-se de grande importância quando se pretende selecionar alimentos para grupos de população que necessitam de monitorizar os aportes de iodo e selênio.



## \_Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram: 1) determinar o teor de selénio em alimentos consumidos pelos portugueses, seguindo planos de amostragem e metodologias analíticas adotadas no projeto *Total Diet Study* (TDS)-Exposure; 2) para estes alimentos calcular a sua contribuição para a Dose Diária Recomendada (DDR) utilizando os valores de selénio reportados neste trabalho e os valores de iodo previamente determinados, nas mesmas condições; 3) escrutinar alimentos segundo o perfil combinado de iodo e selénio.

## \_Materiais e métodos

As amostras num total de mil setecentas e sessenta e quatro foram recolhidas de acordo com o plano de amostragem representativo da dieta portuguesa estabelecido no projeto TDS-Exposure (6). Os alimentos foram preparados segundo os processos culinários mais utilizados em concordância com os hábitos de consumo da população portuguesa. Foram agrupados pela sua similaridade em 147 *pools*, cada uma constituída por 12 alimentos.

O teor de selénio foi determinado por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS - *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), tendo como referência a Norma NP EN 15763:2009, precedido por digestão ácida em vaso fechado no micro-ondas. Os resultados foram obtidos através de procedimentos analíticos que refletiram os requisitos de garantia da qualidade, descritos na norma ISO/IEC 17025:2005. A concentração foi expressa, pela média de três réplicas, em  $\mu\text{g}$  de selénio/100 g de alimento.

Os dados analíticos foram organizados, seguindo a classificação da *European Food Safety Authority* (EFSA), em nove grupos: carne, pescado, cereais e derivados, laticínios, ovos, frutas, leguminosas, pratos compostos e tubérculos (7). A contribuição de cada alimento para a Dose Diária Recomendada de iodo foi calculada a partir dos valores de iodo produzidos no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e publicados recentemente (5).

## \_Resultados e discussão

Os alimentos analisados, assim como os teores de selénio encontrados, são apresentados na **tabela 1**. Como se pode verificar nas frutas, nos tubérculos, nas saladas e no arroz o teor de selénio é inferior ao limite de quantificação do método analítico (0,4-4,9  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ). Os valores mais elevados de selénio foram encontrados no grupo do pescado. Em todos os grupos os resultados obtidos evidenciam uma larga variabilidade dos teores deste nutriente na parte edível dos alimentos, como se pode observar pelos valores mínimos e máximos particularmente das frutas frescas, Alfthan e colaboradores (8) sugerem que esta variação pode dever-se ao teor do elemento nos solos, nas pastagens ou nas águas. Assim, eram esperadas grandes variações no teor de selénio entre alimentos de grupos diferentes, do mesmo grupo ou entre o mesmo alimento de diferentes proveniências. Os valores encontrados diferem dos publicados em outras tabelas de composição de alimentos, estando por isso alinhados com o postulado na literatura (9). Os grupos de trabalho *European Food Information Resource* (EuroFIR) e *International Network of Food Data Systems* (FAO/InFoods) reforçam a necessidade de dados nacionais para avaliar, de forma real, a ingestão deste micronutriente pela população.

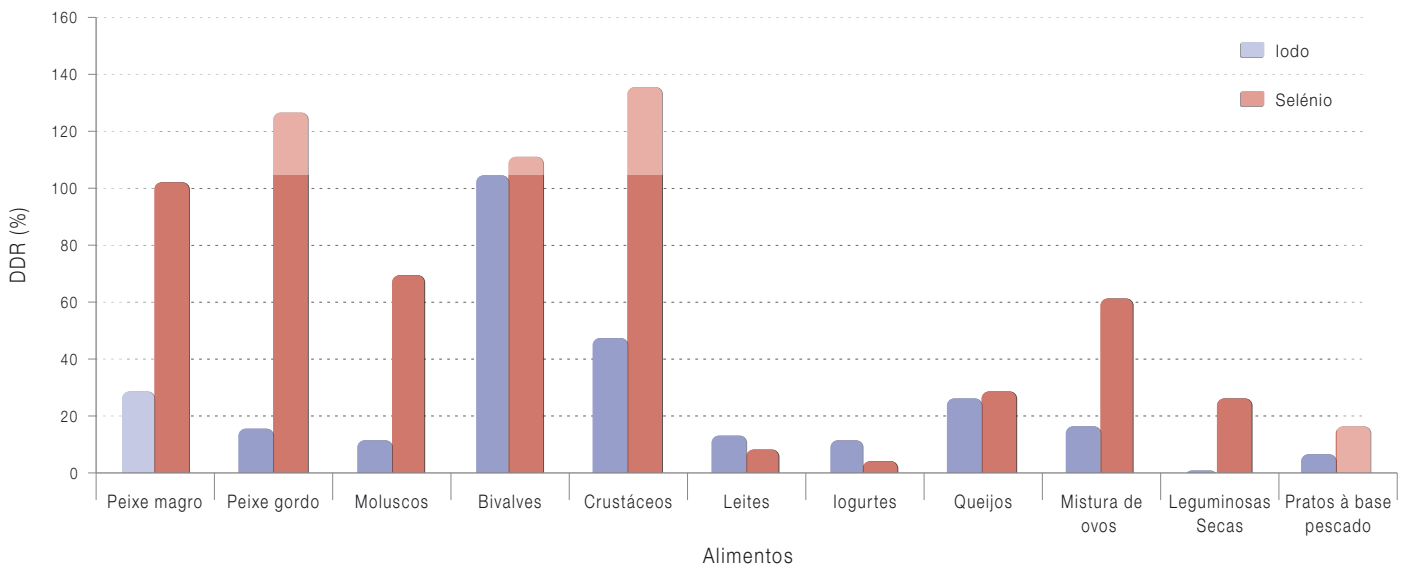
No **gráfico 1** é apresentado um histograma comparativo com as contribuições dos alimentos para as doses diárias recomendadas de iodo e selénio, calculados a partir do teor de micronutriente encontrado em 100 g de alimento. Como se pode observar, o pescado é o grupo mais rico em selénio e iodo, seguido pelos laticínios e pelos ovos. Segundo o Instituto de Medicina (EUA), (*Institute of Medicine*, IOM) a ingestão alimentar recomendada é, respetivamente para o iodo e o selénio, de 150  $\mu\text{g}$  e de 55  $\mu\text{g}$  por dia para um adulto (10,11). Deste modo, uma refeição de 160 g (atendendo ao consumo por dia *per capita* português) de peixe constitui um bom contributo para se atingir a DDR para cada um destes micronutrientes. Se associarmos a este contributo três porções diárias (aproximadamente 300 g) de laticínios (leite, iogurte ou queijo) e um ovo poderemos verificar que uma alimentação saudável é suficiente para preencher os requisitos recomendados em selénio e iodo, para adultos saudáveis.

Tabela 1: Teor de selénio em alimentos consumidos pelos portugueses.

Alimentos	Amostras recolhidas	Pools analisadas	Média µg/100g	Mediana µg/100g	Mínimo µg/100g	Máximo µg/100g
<b>Carne</b>						
Carne branca	36	3	32	31	28	38
Carne vermelha	48	4	16	14	12	22
Charcutaria	36	3	25	28	14	34
<b>Pescado</b>						
Peixe magro	168	14	53	56	22	82
Peixe gordo	144	12	81	76	43	130
Moluscos	36	3	30	30	14	46
Bivalves	12	1	61			
Crustáceos	12	1	69			
<b>Cereais e derivados</b>						
Arroz	12	1	<LQ			
Pão	24	2	5,6	5,6	5,4	5,9
Massa	12	1	8,0			
Confeitaria sem chocolate	144	12	6,1	5,5	3,7	12
Confeitaria com chocolate	48	4	7,6	6,8	3,5	13
<b>Laticínios</b>						
Leites	36	3	4,4	3,9	1,8	7,6
Iogurtes	24	2	2,1	2,1	1,8	2,4
Queijos	12	1	16			
<b>Ovos</b>						
Omolete	12	1	15			
Mistura de ovos	12	1	34			
<b>Frutas</b>						
Frutas frescas	312	26	<LQ		<LQ	25
Frutas enlatadas	12	1	<LQ			
Frutos secos	60	5	<LQ		<LQ	2,5
Sumos	24	2	<LQ			
Compotas	12	1	<LQ			
<b>Leguminosas</b>						
Frescas	24	2	<LQ			
Secas	48	4	14	14	9,1	20
<b>Pratos compostos</b>						
Pratos à base de carne, pescado ou mistos	300	25	9,4	9,0	2,6	16
Sopas	72	6	3,8	3,5	<LQ	4,7
Saladas	24	2	<LQ		<LQ	8,7
<b>Tubérculos</b>						
Batatas confeccionadas	48	4	<LQ			
<b>Total</b>	<b>1764</b>	<b>147</b>	<b>25</b>	<b>9,0</b>	<b>1,8</b>	<b>130</b>

LQ- Limite de quantificação.

Gráfico 1: Contribuição dos alimentos mais significativos, expressos por 100 g de alimento para as doses diárias recomendadas (DDR) de iodo (150 µg) e selénio (55 µg), para uma população saudável.



## Conclusões

Até ao presente, em Portugal, estavam publicados poucos dados sobre selénio em alimentos representativos da dieta nacional. O plano de recolha e de análise das amostras de alimentos como consumidos seguiu uma metodologia recentemente adotada em vários países. Esta abordagem permite uma comparação robusta entre valores de diversas proveniências assim como a sua integração em bases de dados de âmbito europeu como as da EFSA.

O tratamento estatístico de dados analíticos revelou-se adequado para agrupar alimentos em função da sua contribuição para as doses diárias recomendadas de iodo e selénio. Este conceito é particularmente útil quando se pretende, em dietas personalizadas, aportes de iodo e selénio no mesmo alimento. Os resultados também permitem concluir que uma dieta rica em pescado e laticínios é suficiente para satisfazer as necessidades diárias da população saudável.

## Agradecimentos

Trabalho desenvolvido no âmbito do projeto TDS-Exposure ([www.tds-expure.eu](http://www.tds-expure.eu)) financiado pelo 7º Programa Quadro da União Europeia (Grant Agreement 289108). O INSA agradece à Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição (SPCNA) pela cedência dos dados de consumo alimentar utilizados neste trabalho que são

originários do Estudo Alimentação e Estilos de Vida da População Portuguesa, realizado pela SPCNA ao abrigo de um protocolo de mecenato científico com a empresa Nestlé Portugal.

## Referências bibliográficas:

- (1) Bailey RL, West KP Jr, Black RE. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Ann Nutr Metab.* 2015;66(Suppl 2):22-33. [www.karger.com/?DOI=10.1159/000371618](http://www.karger.com/?DOI=10.1159/000371618)
- (2) Stoffaneller R, Morse NL. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. *Nutrients.* 2015;7(3):1494-537. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377864](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377864)
- (3) Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(4):286-95.
- (4) Gärtner R. Recent data on iodine intake in Germany and Europe. *J Trace Elem Med Biol.* 2016;37:85-9.
- (5) Delgado I, Coelho P, Andrade C, et al. Quantificação de iodo em alimentos consumidos em Portugal: resultados preliminares. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2016;5(16):30-32. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3893>
- (6) Papadopoulos A, Sioen I, Cubadda F, et al. TDS exposure project: application of the analytic hierarchy process for the prioritization of substances to be analyzed in a total diet study. *Food Chem Toxicol.* 2015;76:46-53. Epub 2014 Dec 2.
- (7) European Food Safety Authority, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document. *EFSA Journal* 2011;9(11):2450. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2450/full>
- (8) Alfthan G, Eurola M, Ekholm P, et al. ; Selenium Working Group. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;31:142-7. Epub 2014 May 20.
- (9) Neale EP, Probst YC, Tapsell LC. Development of a matching file of Australian food composition databases (AUSNUT 2007 to 2011-13). *J Food Composition Anal.* 2016;50:30-5.
- (10) 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, 2001.
- (11) 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, 2000.



## **Sementes edíveis: composição em ácidos gordos e impacto na saúde**

### *Edible seeds: fatty acids composition and potential health impact*

Tânia Gonçalves Albuquerque<sup>1,2</sup>, Mafalda Alexandra Silva<sup>1</sup>, M. Beatriz P.P. Oliveira<sup>2</sup>, Helena S. Costa<sup>1,2</sup>

helena.costa@insa.min-saude.pt

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

(2) REQUIMTE-LAQV/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

#### **\_Resumo**

O consumo de sementes (especialmente girassol, sésamo, linhaça e pevides de abóbora) aumentou, nos últimos anos, devido à associação da sua ingestão a efeitos benéficos para a saúde. Mais recentemente, e em resposta a esta tendência do mercado, foram introduzidas "novas" sementes na alimentação, caso das sementes de chia e de papoila. O objetivo deste trabalho foi determinar o teor total de gordura e o perfil em ácidos gordos de diferentes sementes disponíveis no mercado português, e estimar o benefício/risco para a saúde da população portuguesa, associado ao consumo das sementes analisadas. Verificou-se que 75% das amostras analisadas apresentaram o ácido linoleico (C18:2,n6) como o ácido gordo maioritário, e nas restantes sementes foi o ácido alfa-linolénico (C18:3,n3) o mais abundante. As sementes de papoila apresentaram o maior teor de ácido linoleico (71,6%), e as sementes de sésamo apresentaram o teor mais elevado de ácido oleico (39,6% dos ácidos gordos totais). Todas as sementes analisadas apresentam um perfil de ácidos gordos considerado saudável, sendo maioritários os ácidos gordos insaturados relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares.

#### **\_Abstract**

Consumption of seeds (especially sunflower, sesame, flaxseed and pumpkin seeds) has increased in recent years due to the association of their intake with beneficial effects on health. More recently, and in response to this market trend, "new" seeds were introduced in the food chain, such as chia and poppy seeds. The objective of this work was to determine the total fat content and the fatty acid profile of different seeds available in the Portuguese market, and to estimate the potential health benefit/risk for the Portuguese population, associated to the consumption of the analysed seeds. It was found that 75% of the analysed samples presented linoleic acid (C18:2,n6) as the major fatty acid, and in the remaining seeds alpha-linolenic acid (C18:3,n3) was the most abundant. Poppy seeds had the highest content of linoleic acid (71.6%) and sesame seeds had the highest content of oleic acid (39.6% of total fatty acids). All the analysed seeds present a fatty acid profile considered healthy, being the major fatty acids unsaturated which are related to the prevention of cardiovascular diseases.

#### **\_Introdução**

O consumo de sementes (especialmente girassol, sésamo, linhaça e pevides de abóbora) aumentou, nos últimos anos, devido à associação da sua ingestão a efeitos benéficos para a saúde. Mais recentemente, e em resposta a esta tendência do mercado, foram introduzidas "novas" sementes na alimentação, caso das sementes de chia e de papoila.

A produção mundial de alguns tipos de sementes, duplicou na última década, caso do girassol e sésamo (1). No caso das sementes de chia e de alpista, de acordo com os últimos dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAOSTAT), a sua produção está em decréscimo (1).

As sementes são adicionadas a batidos, iogurtes e sumos de fruta, ou são usadas como ingredientes de produtos de padaria e/ou pastelaria. Nos últimos tempos, são cada vez mais utilizadas como matéria-prima, por parte da indústria alimentar, para o desenvolvimento de alimentos funcionais devido às suas características nutricionais e porque oferecem algumas vantagens em relação a outras fontes disponíveis.

De uma forma geral, estas sementes são maioritariamente constituídas por gordura (2). Por tal motivo, é de elevada importância conhecer o tipo de gordura presente na sua constituição, uma vez que esta terá uma relação direta com os efeitos na saúde.

#### **\_Objetivos**

Determinar o teor total de gordura e o perfil em ácidos gordos de diferentes sementes disponíveis no mercado português. Pretendeu-se estimar o benefício/risco para a saúde da população, associado ao consumo das sementes analisadas, com base nos valores obtidos.

## \_Material e métodos

Foram adquiridos em 2015, em superfícies comerciais e ervanárias da região de Lisboa, oito tipos de sementes (figura 1): papoila (*Papaver somniferum* L.), chia (*Salvia hispanica*), alpista (*Phalaris canariensis* L.), cânhamo (*Cannabis sativa* L.), abóbora (*Cucurbita* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), sésamo (*Sesamum indicum* L.) e linhaça (*Linum usitatissimum* L.).

O teor total de gordura foi determinado por hidrólise ácida seguida de extração em Soxhlet com éter de petróleo (3). Para a quantificação dos ácidos gordos nas amostras selecionadas, utilizou-se uma transesterificação a frio por meio de uma solução metanólica de hidróxido de potássio, seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada à deteção por ionização de chama (4).

Figura 1: ↓ Amostras de sementes selecionadas para análise.



Sementes de papoila  
(*Papaver somniferum* L.)



Sementes de chia  
(*Salvia hispanica*)



Sementes de alpista  
(*Phalaris canariensis* L.)



Sementes de cânhamo  
(*Cannabis sativa* L.)



Pepides de abóbora  
(*Cucurbita* L.)



Sementes de girassol  
(*Helianthus annuus* L.)



Sementes de sésamo  
(*Sesamum indicum* L.)



Sementes de linhaça  
(*Linum usitatissimum* L.)



## Resultados e discussão

De acordo com os resultados obtidos, o teor total de gordura nas amostras de sementes analisadas variou entre  $6,33 \pm 0,2$  e  $60,0 \pm 0,3$  g/100 g de parte edível, para as sementes de alpista e de girassol, respetivamente (gráfico 1). A dose de referência para a ingestão diária de gordura para um indivíduo saudável, tendo por base uma dieta padrão de 2000 kcal, é de 70 g/dia (5). De acordo com a rotulagem das sementes analisadas, é aconselhado o consumo diário de 1 a 2 colheres de sopa. Desta forma, considerando uma porção média de duas colheres de sopa de sementes de girassol, a sua ingestão pode contribuir com 14% da dose recomendada de gordura. A composição em ácidos gordos dos alimentos é fundamental na avaliação do impacto na saúde da população que os consome, sendo também muito importante para determinar o tipo de aplicação mais adequada. Isto é, alimentos ricos em ácidos gordos polinsaturados têm menor resistência aos fenómenos de oxidação lipídica quando expostos à luz, à temperatura e à presença de oxigénio, entre outros aspetos (6). Pelos motivos

referidos, o consumidor deve ter alguns cuidados específicos no armazenamento e conservação deste tipo de sementes. No entanto, a ingestão de alimentos ricos em ácidos gordos polinsaturados está relacionada com inúmeros benefícios para a saúde, sobretudo no que diz respeito à prevenção de doenças cardiovasculares (7).

De acordo com o gráfico 2, verificou-se que 75% das amostras analisadas apresentaram o ácido linoleico (C18:2,n6) como o ácido gordo maioritário, e nas restantes sementes foi o ácido alfa-linolénico (C18:3,n3) o mais abundante. O ácido linoleico e o ácido alfa-linolénico são exemplos de ácidos gordos que não são sintetizados pelo nosso organismo, sendo ácidos gordos essenciais, motivo pelo qual a nossa alimentação deve garantir um aporte adequado (7).

As sementes de papoila apresentaram o maior teor de ácido linoleico (71,6%), e as sementes de sésamo apresentaram o teor mais elevado de ácido oleico (39,6% dos ácidos gordos totais).

Gráfico 1: Teor total de gordura (g/100 g de parte edível) das amostras de sementes analisadas.

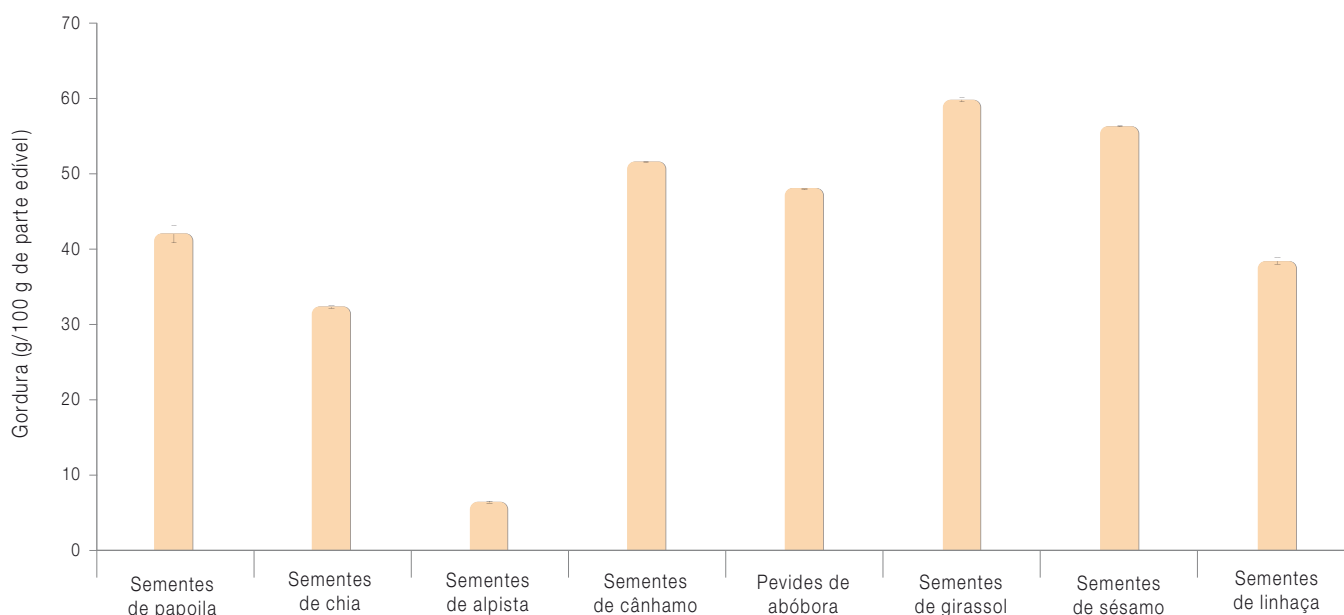
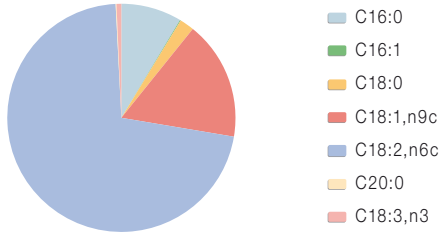
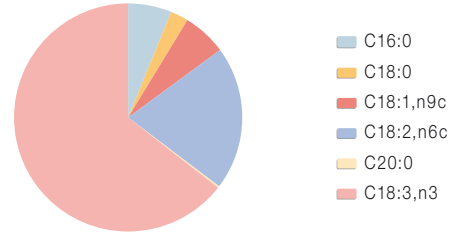


Gráfico 2: Composição em ácidos gordos (%) das amostras de sementes analisadas.

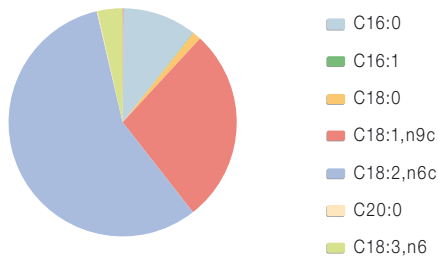
Sementes de papoila



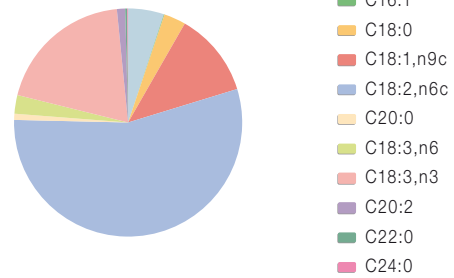
Sementes de chia



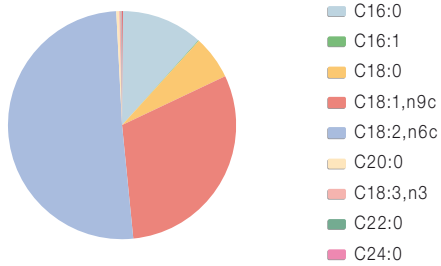
Sementes de alpista



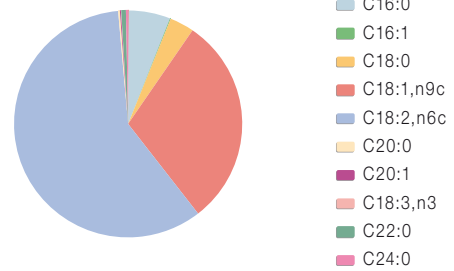
Sementes de cânhamo



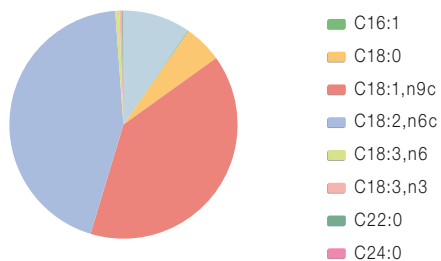
Pevides de abóbora



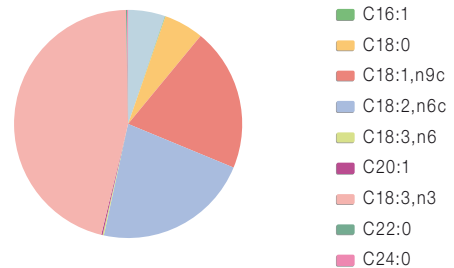
Sementes de girassol



Sementes de sésamo



Sementes de linhaça





## Conclusões

Todas as sementes analisadas apresentam um perfil de ácidos gordos considerado saudável, sendo maioritários os ácidos gordos insaturados relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares. Este estudo fornece novos dados sobre o perfil de ácidos gordos de sementes amplamente disponíveis no mercado, que poderão ser úteis para avaliar o padrão alimentar da população portuguesa, mas também para o desenvolvimento de futuras recomendações e orientações alimentares.

## Agradecimentos:

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), no âmbito do projeto PTranSALT (2012DAN828). Tânia Gonçalves Albuquerque agradece a bolsa de doutoramento (SFRH/BD/99718/2014) financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Fundo Social Europeu e Ministério da Educação e Ciência.

## Referências bibliográficas:

- (1) Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT-Food and agriculture data [Em linha]. [consult. 15/12/2016]. [www.fao.org/faostat/en/#data/QC](http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC)
- (2) Bozan B, Temelli F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresour Technol* 2008(14);99,6354-9.
- (3) Albuquerque TG, Sanches-Silva A, Santos L, et al. An update on potato crisps contents of moisture, fat, salt and fatty acids (including trans-fatty acids) with special emphasis on new oils/fats used for frying. *Int J Food Sci Nutr* 2012;63(6):713-17.
- (4) Albuquerque TG, Oliveira MB, Sanches-Silva A, et al. The impact of cooking methods on the nutritional quality and safety of chicken breaded nuggets. *Food Funct*. 2016;7(6):2736-46.
- (5) Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. JO. 22.11.2011: L 304/18-63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (6) Choe E, Min DB. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2006;5(4):169-86.
- (7) European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal* 2010;8(3):1461. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2010.1461/full>
- (8) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fats and fatty acids in human nutrition: report of an expert consultation. Rome: FAO, 2010. <http://foris.fao.org/preview/25553-0ece4cb94ac52f9a25af77ca5cfba7a8c.pdf>



## O sal na alimentação dos portugueses

### The salt in Portuguese diet

Mariana Santos<sup>1</sup>, Ana Cláudia Nascimento<sup>1</sup>, Susana Santiago<sup>1</sup>, Ana Carolina Gama<sup>2</sup>, Maria Antónia Calhau<sup>1</sup>

mariana.coelho@insa.min-saude.pt

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

(2) Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal.

#### \_Resumo

O consumo excessivo de sal pela população é um dos maiores riscos de saúde pública em Portugal, sendo urgente propor medidas para a sua redução. Este trabalho teve como objetivo, a determinação do teor de sal em alimentos representativos da dieta portuguesa. A definição da amostragem, recolha e preparação das amostras seguiu as metodologias estabelecidas pelo projeto TDS\_EXPOSURE. As amostras foram agrupadas de acordo o sistema FoodEx2, foram analisadas em triplicado recorrendo à metodologia de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivo acoplado (ICP-OES). O teor em sal em g/100 g de alimento foi calculado pela fórmula: sal = sódio (Na) × 2,5. O grupo do peixe, produtos da pesca e invertebrados foi o que apresentou alimentos com um valor médio de sal mais elevado (2,4-2,6) g/100 g de alimento. Nos restantes grupos de alimentos, os valores médios de sal mais elevados situaram-se entre 1,0-1,8 g/100 g de alimento. Os resultados observados permitem concluir que, em Portugal o sal em excesso na alimentação é uma realidade identificada. A educação para a saúde, nomeadamente a promoção de formas mais saudáveis de confeccionar os alimentos, deverá ser cada vez mais uma parte integrante da estratégia para a redução do sal.

#### \_Abstract

The excessive salt consumption by the population is one of the greatest risks of public health in Portugal, and it is urgent to propose measures for its reduction. The objective of this work was the determination the salt content in foods representative of the Portuguese diet. The definition of sampling, collection and preparation of the samples followed the methodologies established by the TDS\_EXPOSURE project. The samples were grouped according to the FoodEx2 system, were analyzed in triplicate using the optical emission spectrometry methodology with coupled inductive plasma (ICP-OES). The salt content in g/100 g of food was calculated by the formula: salt = sodium (Na) × 2.5. The group of fish, fishery products and invertebrates presented foods with a higher average salt value (2.4-2.6) g/100 g of food. In the remaining food groups, the highest mean salt values were between 1.0-1.8 g/100 g food. The observed results allow to conclude that, in Portugal, the salt excess in food is an identified reality. Health education, namely promoting healthier ways of food production, should increasingly be an integral part of the salt reduction strategy.

#### \_Introdução

O sal de mesa ou sal de cozinha é um composto, quimicamente denominado de Cloreto de Sódio (NaCl). O sal é talvez o condimento mais antigo, usado pelo Homem, supondo-se que o seu aparecimento data de 2700 a.C., na China (1).

O consumo excessivo de sal pela população é um dos maiores perigos para a saúde pública em Portugal, tornando-se urgente propor medidas para a sua redução. Pequenas reduções no consumo podem trazer grandes benefícios para a saúde das populações não só ao nível das doenças cardiovasculares, mas também ao nível de outras doenças crónicas prevalentes no país (2).

Relativamente ao conteúdo de sal na alimentação, sabe-se que 75% do sódio necessário provém dos próprios alimentos e que a adição de sal de mesa às refeições já confeccionadas deverá ser um dos principais pontos de intervenção, uma vez que o sal de mesa contém 30% de sódio (3).

Na educação para a saúde, a promoção de formas mais saudáveis de confeccionar os alimentos deverá ser cada vez mais uma parte integrante da estratégia para a redução do sal.

Em Portugal, de acordo com o estudo PHYSA - Portuguese Hypertension and Salt Study, realizado em 2012 pela Sociedade Portuguesa de Hipertensão, o consumo médio estimado de sal é de 10,7 g por dia (determinado pela excreção urinária de sódio no período de 24 horas) (4). Este valor equivale a um total de 4,28 g de sódio por dia, o que corresponde aproximadamente ao dobro do estabelecido pelas recomendações internacionais, nomeadamente a Organização Mundial de saúde (OMS) e a Organização de Alimentação e Agricultura (FAO) recomendam um consumo diário máximo de 5 g de sal correspondentes a 2 g de sódio, como forma de prevenção da hipertensão arterial (HTA) secundária (5).



artigos breves\_ n. 4

A Direção-Geral da Saúde, em 2013, define cinco objetivos estratégicos para a redução do sal que passam pela implementação de um sistema de avaliação da ingestão de sal a nível populacional e monitorização da sua quantidade nos alimentos; sensibilização dos consumidores para um consumo reduzido de sal; desenvolvimento de rotulagem capaz de destacar o conteúdo de sal dos alimentos e identificação de produtos com pouco sal; envolvimento da indústria tanto na reformulação e oferta de produtos alimentares com menores conteúdos em sal, como na mudança do conhecimento, atitudes e comportamento dos consumidores (6).

**\_Objetivo**

O presente trabalho teve como objetivo a determinação do teor de sal em alimentos representativos da dieta portuguesa.

**\_Materiais e métodos**

A definição da amostragem do estudo, recolha e preparação das amostras seguiu as metodologias harmonizadas a nível europeu no âmbito do projeto TDS EXPOSURE – *Total Diet Study Exposure* (7). Neste projeto a amostragem e seleção de alimentos baseou-se nos dados de consumo alimentar, por forma a serem representativas do consumo e da forma como os alimentos são consumidos no país em questão.

As amostras analisadas foram agrupadas de acordo com o sistema de classificação FoodEx2 (8): pratos compostos e sopas (14 amostras), peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados (9 amostras), carne e produtos à base de carne (6 amostras), cereais e produtos à base de cereais (15 amostras). Cada amostra é composta por 12 subamostras representativas dos hábitos de consumo para aquele tipo de alimento. A amostragem foi realizada na região da Grande Lisboa.

Neste estudo foram analisadas 44 amostras recorrendo à metodologia de espectrometria emissão ótica com plasma indutivo acoplado (ICP-OES), para a determinação do conteúdo em sódio (Na) das amostras. O conteúdo em sal em g por 100 g de alimento foi calculado pela fórmula: sal = sódio (Na) x 2,5.

As amostras foram analisadas em triplicado em condições de garantia da qualidade, cumprindo os requisitos descritos na norma EN ISO/IEC 17025:2005 (9).

**\_Resultados e discussão**

Nos gráficos 1 a 4 são apresentados os valores médios de sal obtido nos diferentes grupos de alimentos analisados.

Gráfico 1: Teor médio de sal (Nax2,5) nas amostras analisadas em pratos compostos e sopas (n=14).

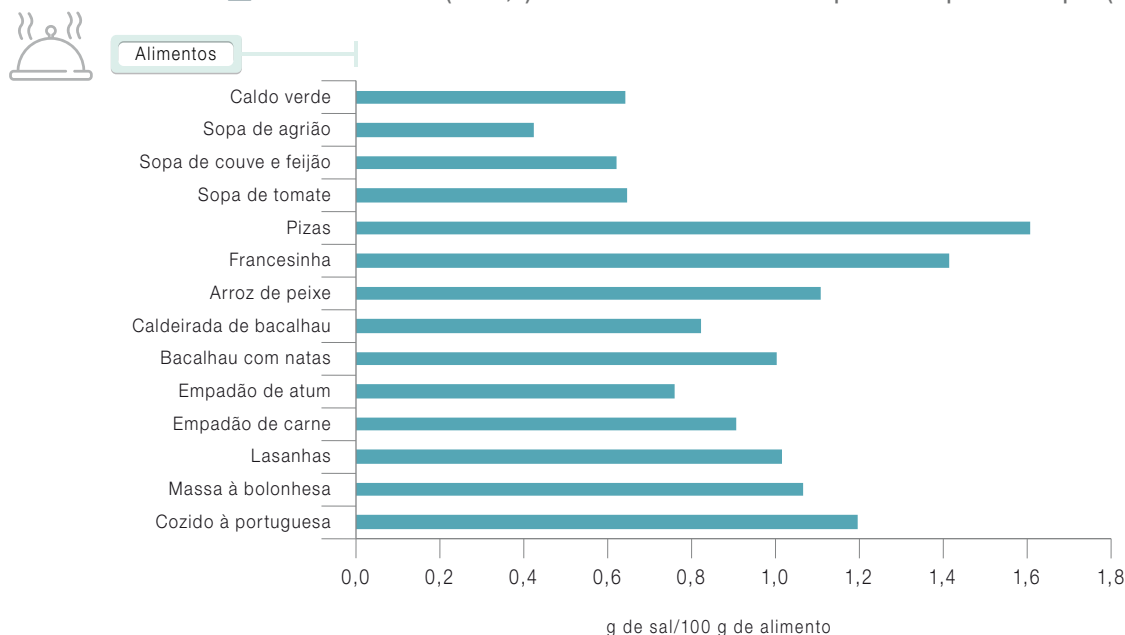




Gráfico 2: Teor médio de sal (Nax2,5) nas amostras analisadas em peixe, produtos da pesca e invertebrados (n=9).

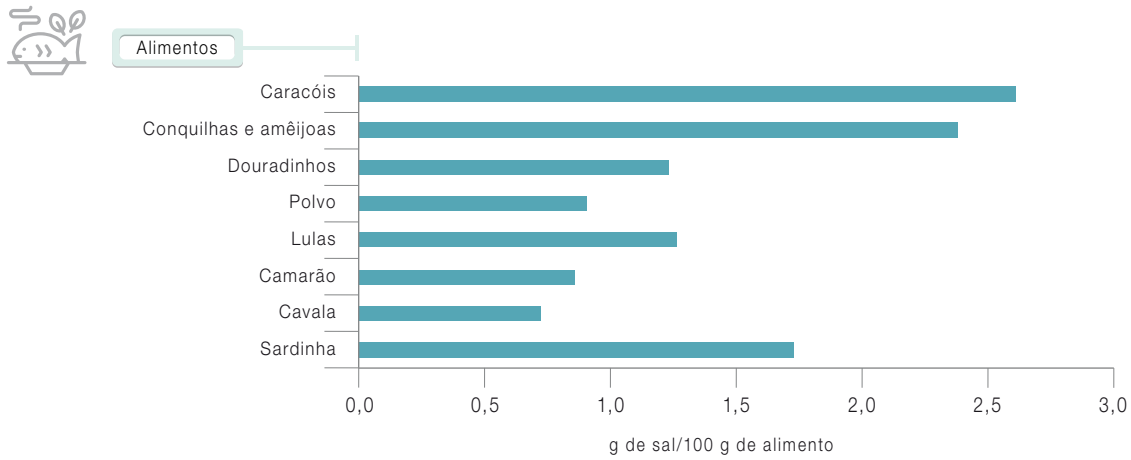


Gráfico 3: Teor médio de sal (Nax2,5) nas amostras analisadas em carne e produtos à base de carne (n=6).

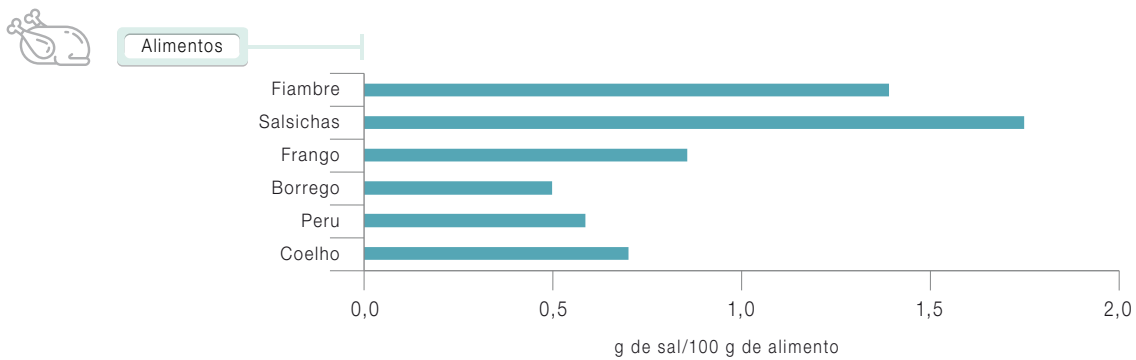
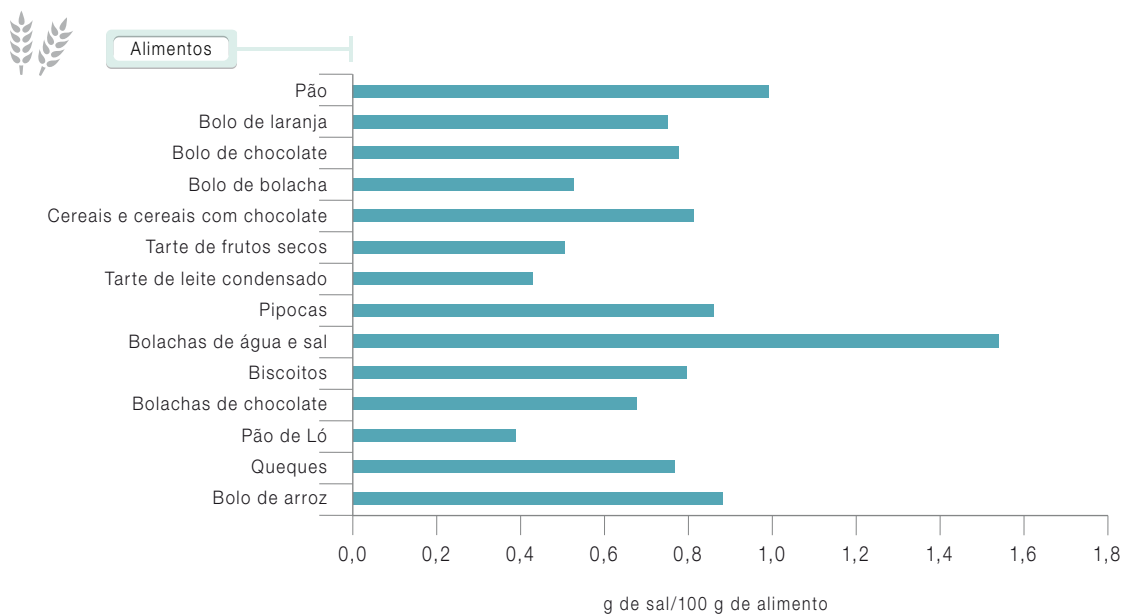


Gráfico 4: Teor médio de sal (Nax2,5) nas amostras analisadas em cereais e produtos à base de cereais (n=15).





## artigos breves\_ n. 4

Ao analisarmos os resultados obtidos destacamos:

**Pratos compostos e sopas:** o valor médio de sal variou entre o valor mínimo de 0,8 g/100 g e um máximo de 1,6 g/100 g, para a amostra de piza. Para as sopas, o teor de sal das amostras analisadas foi semelhante com um valor médio entre 0,4-0,7 g por 100 g de amostra.

**Peixe, produtos da pesca e invertebrados:** destacam-se as conquilhas, ameijoas e caracóis como os alimentos com um teor mais elevado de sal (2,4-2,6) por 100 g de alimento, seguido da sardinha com um de valor médio de 1,8 g de sal /100 g de alimento.

**Carne e produtos à base de carne:** destacam-se o fiambre e as salsichas onde foi encontrado um valor médio de 1,4 e 1,8 g de sal /100 g de alimento, respetivamente.

**Cereais e produtos à base de cereais:** destaca-se as bolachas de água e sal e o pão como os alimentos com um contributo entre 1,0-1,5 g de sal/100 g de alimento.

Tendo em conta as recomendações da OMS, de 2 g de sódio/dia (5 g de sal/dia), verifica-se que o consumo de 100 g de um prato composto ou de um produto à base de cereais (pão/bolacha de água e sal) pode representar cerca de 30% da ingestão diária de sal e o consumo de 100 g de produtos da pesca e invertebrados (conquilhas/ameijoas/caracóis) pode representar cerca 50% da ingestão diária de sal.

## \_Conclusões

Em suma, o sal em excesso na alimentação é uma realidade identificada, tendo sido observado que o consumo de 100g de um prato composto ou de um produto à base de cereais (pão/bolacha de água e sal) pode representar cerca de 30% da ingestão diária de sal.

A educação para a saúde, nomeadamente a promoção de formas mais saudáveis de confeccionar os alimentos, deverá ser cada vez mais uma parte integrante da estratégia para a redução do sal.

A implementação de um sistema de avaliação da ingestão de sal a nível populacional e monitorização da sua quantidade nos alimentos e simultaneamente a sensibilização dos consumidores para um consumo reduzido de sal, podem trazer grandes benefícios para a saúde das populações.

## Agradecimento:

O Laboratório de Química agradece à equipa do projeto TDS EXPOSURE – *Total Diet Study Exposure* pela cedência das amostras utilizadas neste trabalho.

## Referências bibliográficas:

- (1) Viegas C. Sal e doença cardiovascular. *Revista Factores de Risco*. 2008;10: 2-18.
- (2) Direção-Geral da Saúde. Portugal – Alimentação Saudável em números – 2015. Lisboa: DGS, 2016. [www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/activeapp/wp-content/files\\_mf/1459261323Relat%C3%B3rioPortugalAlimenta%C3%A7%C3%A3oSaud%C3%A1velemn%C3%BAmeros2015.pdf](http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/activeapp/wp-content/files_mf/1459261323Relat%C3%B3rioPortugalAlimenta%C3%A7%C3%A3oSaud%C3%A1velemn%C3%BAmeros2015.pdf)
- (3) World Health Organization. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. Geneva: WHO, 2013. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94384/1/9789241506236\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94384/1/9789241506236_eng.pdf)
- (4) Polónia J, Martins L, Pinto F, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. *The PHYSA study*. *J Hypertens*. 2014;32(6):1211-21.
- (5) WHO Forum on Reducing Salt Intake in Populations. Reducing salt intake in populations : report of a WHO forum and technical meeting, 5-7 October 2006, Paris,France. Geneva: WHO, 2007. [www2.warwick.ac.uk/fac/med/staff/cappuccio/publications/who\\_2007\\_salt\\_report.pdf](http://www2.warwick.ac.uk/fac/med/staff/cappuccio/publications/who_2007_salt_report.pdf)
- (6) Graça P. Estratégia para a redução do consumo de sal na alimentação em Portugal. Lisboa: Direção-Geral da Saúde, 2013. [www.dgs.pt/?cr=24482](http://www.dgs.pt/?cr=24482)
- (7) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Projeto TDSEXPOSURE - Total Diet Study Exposure [Em linha]. [consult. 25/11/2016]. [www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ID/Paginas/TotalDietStudyExposure.aspx](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ID/Paginas/TotalDietStudyExposure.aspx)
- (8) European Food Safety Authority. Food Classification System FoodEx 2 [Em linha]. [consult. 25/11/2016] [www.efsa.europa.eu/en/data/data-standardisation](http://www.efsa.europa.eu/en/data/data-standardisation)
- (9) NP EN ISO/IEC 17025/2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.



## **Haverá diferenças nutricionais entre produtos de pastelaria com e sem glúten?**

*Are there differences from a nutritional point of view between bakery products with and without gluten?*

Tânia Gonçalves Albuquerque<sup>1,2</sup>, Mafalda Alexandra Silva<sup>a</sup>, M. Beatriz P.P. Oliveira<sup>2</sup>, Helena S. Costa<sup>1,2</sup>

tania.albuquerque@insa.min-saude.pt

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

(2) REQUIMTE-LAQV/Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

### **\_Resumo**

A doença celíaca é uma doença auto-imune, desencadeada pela ingestão de glúten, em indivíduos com predisposição genética. O tratamento desta doença passa, única e exclusivamente, pela prática de uma alimentação isenta de glúten, ao longo de toda a vida do doente celíaco. Por este motivo, a indústria alimentar tem investido no aumento de oferta e variedade de produtos alimentares isentos de glúten. Este trabalho de investigação pretendeu avaliar diferenças, do ponto de vista nutricional, entre produtos de pastelaria com e sem glúten. Em 2015, foram adquiridos 14 produtos, dos quais 9 com glúten e 5 sem glúten. Determinaram-se os teores de gordura total, de sal e o perfil de ácidos gordos. As bolachas tipo "Crackers" e tipo "Maria" sem glúten apresentaram teores de gordura superiores aos produtos similares com glúten. No entanto, é muito importante avaliar que tipo de gordura se encontra nestes alimentos. Nas bolachas tipo "Maria" sem glúten a gordura era maioritariamente monoinsaturada, cuja ingestão está associada a um efeito protetor no desenvolvimento de doença coronária. Sendo este tipo de alimentos, apreciado por todas as faixas etárias, mas sobretudo por jovens, é muito importante alargar este trabalho de investigação a uma maior gama de produtos.

### **\_Abstract**

The coeliac disease is an autoimmune disease triggered by the ingestion of foodstuffs with gluten in genetically predisposed individuals. The treatment of this disease is based on a gluten-free diet, which should be followed throughout life by the coeliac patient. For this reason, the food industry has developed efforts to increase the supply and variety of gluten-free foods. This research aimed to evaluate the differences from a nutritional point of view of bakery products with and without gluten. During 2015, 14 products of which 9 were with gluten and 5 were gluten-free were acquired in different food chains. Total fat, salt and fatty acid profile were determined in the selected samples. The "Crackers" and "Maria" gluten-free biscuits present a higher fat content than similar products with gluten. However, it is very important to evaluate what type of fat can be found in these foods. In "Maria" gluten-free biscuits fat is mostly monounsaturated, whose intake is associated with a protective effect on the development of coronary heart disease. As this type of food, is appreciated by all the age groups, but especially by young people, it is very important to extend this research to a wider range of products.

### **\_Introdução**

A doença celíaca é uma doença autoimune desencadeada pela ingestão de glúten em indivíduos com predisposição genética (1). Por este motivo a população portadora desta doença não pode ingerir alimentos que contenham trigo, centeio e/ou cevada, sendo que a ingestão de produtos que contém aveia permanece controversa e por isso é muitas vezes restringida (1). O tratamento desta doença passa, única e exclusivamente, pela prática de uma alimentação isenta de glúten que deve ser seguida toda a vida pelo doente celíaco (1).

Recentemente surgiram outras situações associadas ao glúten, como por exemplo a sensibilidade ao glúten não celíaca, em que as pessoas apresentam melhorias quando praticam uma dieta isenta de glúten, mas não preenchem os critérios de diagnóstico de doença celíaca. Dada a necessidade de praticarmos uma alimentação equilibrada, diversificada e completa, a indústria alimentar tem-se empenhado no sentido de aumentar a oferta e variedade de produtos alimentares isentos de glúten. As bolachas, biscoitos, bolos, farinhas e massas são alguns dos produtos que podemos encontrar nas superfícies comerciais e para os quais já existe uma grande variedade. Algumas destas categorias de alimentos são consideradas fontes de gordura saturada, sal e açúcar, sendo o seu consumo muitas vezes desaconselhado. Existem algumas publicações científicas que sugerem que uma alimentação isenta de glúten pode apresentar défices do ponto de vista nutricional, nomeadamente em termos de fibra alimentar, vitaminas e minerais (2-4).

### **\_Objetivo**

Este trabalho de investigação pretendeu avaliar diferenças do ponto de vista nutricional entre produtos de pastelaria com e sem glúten, tendo por base a determinação analítica dos teores de gordura e de sal, e do perfil de ácidos gordos.

## Material e métodos

Foram adquiridos, em 2015, 14 produtos de pastelaria (bolachas tipo “Maria”, bolachas tipo “Crackers”, bolachas tipo “Wafers”, bolachas recheadas e madalenas) dos quais 9 com glúten e 5 sem glúten. O teor de gordura total foi determinado utilizando uma hidrólise ácida seguida de extração em Soxhlet com éter de petróleo, e o teor de sal foi determinado por titulação pelo método de Charpentier-Volhard (5). Para a determinação dos ácidos gordos nas amostras selecionadas, utilizou-se uma transesterificação a frio com uma solução metanólica de hidróxido de potássio, seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada à deteção por ionização de chama (5).

## Resultados e discussão

O teor de gordura total nas amostras analisadas variou entre  $11,1 \pm 0,0$  e  $27,7 \pm 1,0$  g/100 g de parte edível, para as bolachas tipo “Maria” com glúten e as bolachas tipo “Wafers”, respetivamente (gráfico 1). Tendo em conta que a dose de referência para a ingestão de gordura é de 70 g por dia, uma porção de bolachas recheadas (3 bolachas  $\approx$  75 g) pode contribuir com 22% da dose de referência (6). As bolachas tipo “Crackers” e tipo “Maria” sem glúten apresentaram teores de gordura superiores aos produtos similares com glúten.

As bolachas tipo “Crackers” apresentaram os teores de sal mais elevados, com valores a variar entre 1,07 e 1,40 g/100 g

de parte edível (gráfico 2). A ingestão excessiva de alimentos ricos em sal está relacionada com um aumento na predisposição para o desenvolvimento de doenças crónicas, tais como a hipertensão arterial (7). Nesse sentido, têm sido desenvolvidas iniciativas para diminuir o teor de sal dos alimentos. Dos produtos analisados, as madalenas, as bolachas recheadas e as bolachas tipo “Crackers” sem glúten apresentaram teores de sal superiores comparativamente aos produtos similares com glúten. Em 71% dos alimentos analisados neste trabalho, os ácidos gordos maioritários são saturados (gráfico 3), sendo os ácidos gordos saturados mais abundantes o ácido mirístico (C14:0) e o ácido palmítico (C16:0).

A ingestão de alimentos ricos neste tipo de ácidos gordos está relacionada com um aumento do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade e consequentemente com um aumento do risco de desenvolvimento de doença coronária. A bolacha tipo “Maria” sem glúten apresentou um teor de ácidos gordos monoinsaturados cerca de 4 vezes superior aos produtos similares com glúten. Este facto está relacionado com o tipo de gordura utilizado na produção destas bolachas e leva-nos a considerar que é possível produzir produtos similares com melhor qualidade nutricional. Relativamente aos ácidos gordos *trans*, os teores determinados nos produtos analisados são inferiores aos valores recomendados internacionalmente, ou seja, inferior a 2% do teor de gordura total (8).

Gráfico 1: Teor de gordura total (g/100 g de parte edível) nos produtos de pastelaria analisados (n=14).

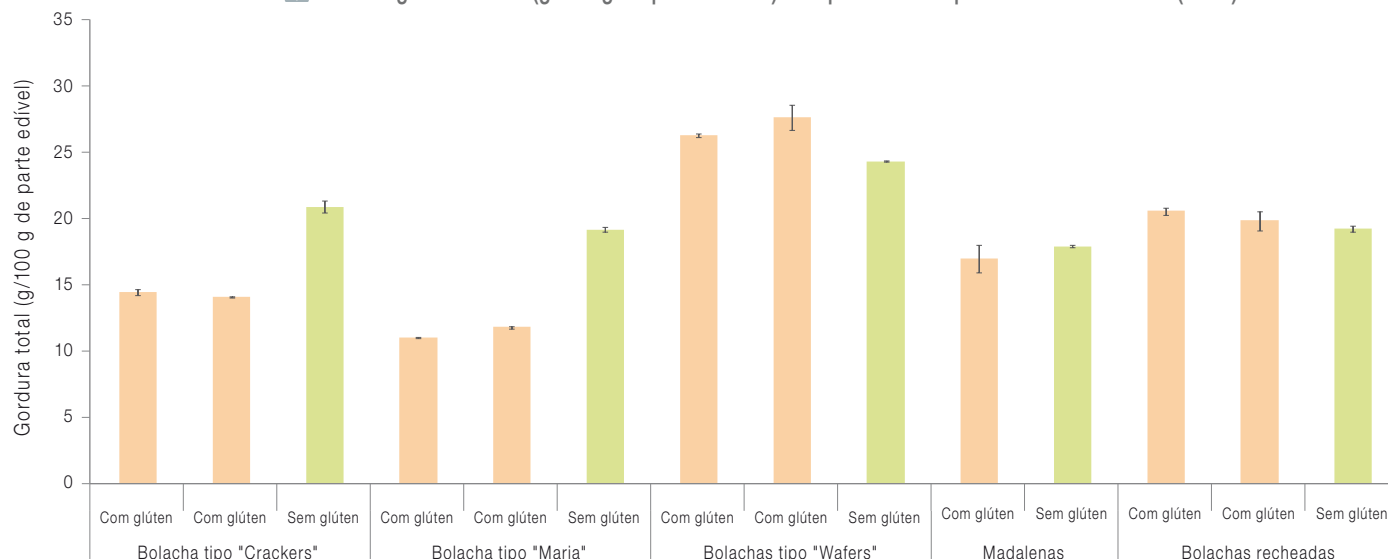


Gráfico 2: Teor de sal (g/100 g de parte edível) nos produtos de pastelaria analisados (n=14).

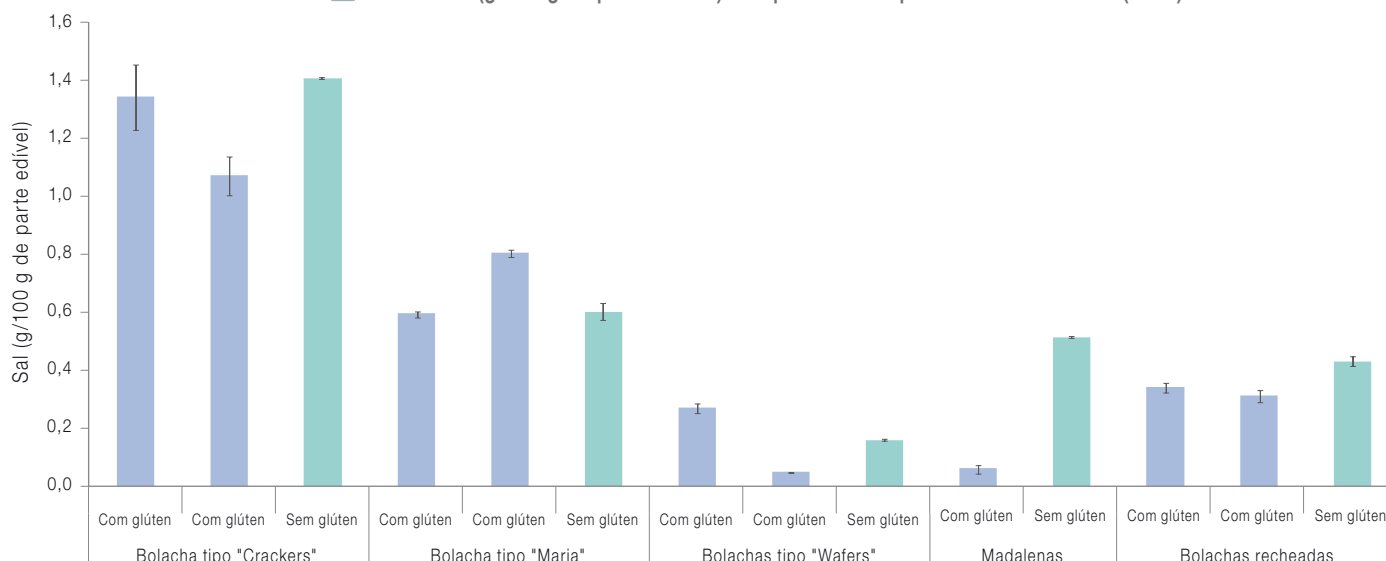
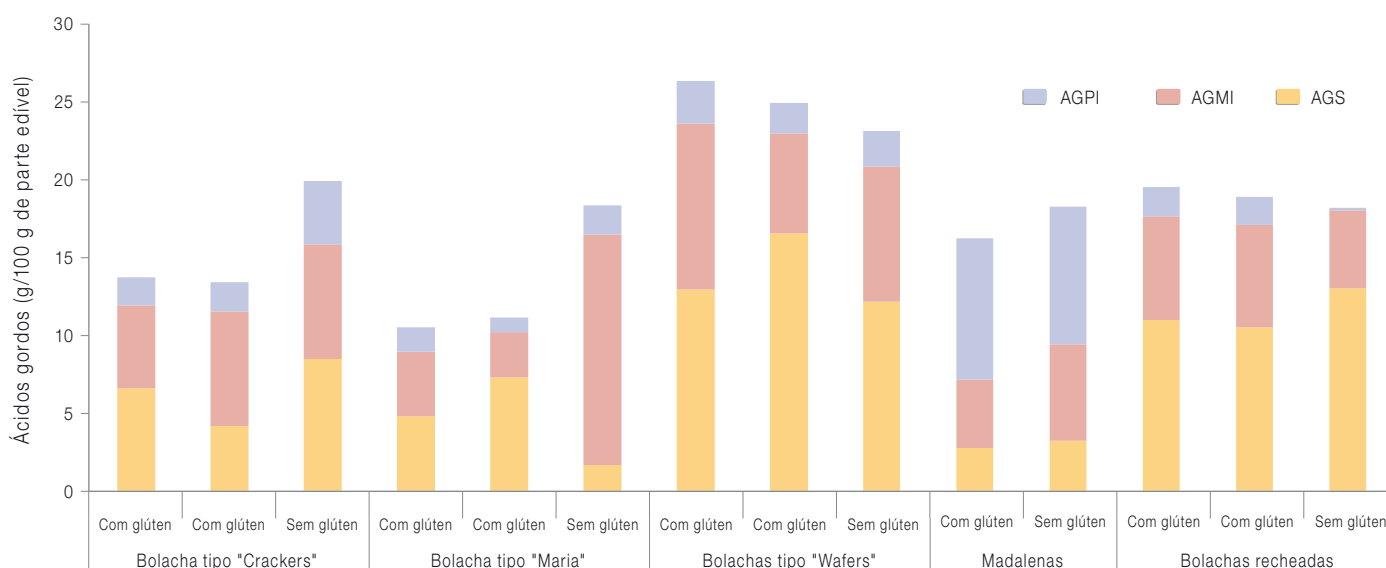


Gráfico 3: Composição em ácidos gordos (g/100 g de parte edível) nos produtos de pastelaria analisados (n=14).



## Conclusões

Os resultados obtidos indicam que alguns dos produtos sem glúten analisados apresentam teores de gordura e de sal superiores aos produtos semelhantes com glúten. No entanto, é muito importante avaliar que tipo de gordura se encontra nestes alimentos.

Neste trabalho apesar das bolachas tipo "Maria" sem glúten apresentarem um teor de gordura superior às com glúten, essa

gordura é maioritariamente monoinsaturada cuja ingestão está associada a um efeito protetor no desenvolvimento de doença coronária. Relativamente ao teor de sal nos alimentos analisados, considera-se que é muito importante continuar a desenvolver iniciativas no sentido de diminuir os seus teores. Sendo este tipo de alimentos, apreciado por todas as faixas etárias, mas sobretudo por jovens, é muito importante alargar este trabalho de investigação a uma maior gama de produtos.



artigos breves\_ n. 5

### Financiamento e agradecimentos:

Este trabalho foi financiado pelo INSA, no âmbito do projeto PTransALT (2012DAN828). Tânia Gonçalves Albuquerque agradece a bolsa de doutoramento (SFRH/BD/99718/2014) financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Fundo Social Europeu e Ministério da Educação e Ciência.

### Referências bibliográficas:

- (1) Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL (eds). Krause – Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 13ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier/Saunders, 2013.
- (2) Hopman EGD, le Cessie S, von Blomberg ME, et al. Nutritional management of the gluten-free diet in young people with celiac disease in The Netherlands. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43(1): 102-8.
- (3) Thompson T, Dennis M, Higgins A, et al. Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods? *J Hum Nutr Diet.* 2005;18(3):163-9.
- (4) Miranda J, Lasa A, Bustamante A, et al. Nutritional differences between a gluten-free diet and a diet containing equivalent products with gluten. *Plant Foods Hum Nutr.* 2014;69(2):182-7.
- (5) Albuquerque TG, Oliveira MB, Sanches-Silva A, et al. The impact of cooking methods on the nutritional quality and safety of chicken breaded nuggets. *Food Funct.* 2016;7(6):2736-46.
- (6) Regulamento (UE) n.º 1169/2011, do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. *JO.* 22.11.2011:L 304/18-63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (7) Polónia J, Martins L, Pinto F, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. *J Hypertens.* 2014;32(6):1211-21
- (8) World Health Organization. Eliminating trans fats in Europe: a policy brief. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2015. [www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0010/288442/Eliminating-trans-fats-in-Europe-A-policy-brief.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/288442/Eliminating-trans-fats-in-Europe-A-policy-brief.pdf?ua=1)



## Perspetiva do consumidor relativa aos efeitos na saúde associados ao consumo de sumos detox

### Consumer perspective on health effects associated with consumption of detox juices

Inês Carvalho Santos<sup>1,2</sup>, Helena S. Costa<sup>1,3,\*</sup>, Maílda A. Silva<sup>1</sup>, Ana Valente<sup>2,4</sup>, Tânia Gonçalves Albuquerque<sup>1,3</sup>

helenacosta@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Estudos Sociedade, Organizações e Bem-Estar, Atlântica University Higher Institution, Barcarena, Portugal.

(3) REQUIMTE-LAQV/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(4) Instituto de Saúde Ambiental, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

Os sumos detox são uma nova tendência alimentar associada à perda de peso e a um estilo de vida saudável. São constituídos por frutas e hortícolas, alimentos naturalmente ricos em antioxidantes, compostos bioativos e vitaminas, cujo consumo está associado à redução de fatores de risco de doenças crónicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a perceção dos consumidores relativamente aos efeitos na saúde associados ao consumo de sumos detox. Foi desenvolvido e aplicado um questionário online a 285 indivíduos com idades compreendidas entre os 18 e os 84 anos. Os resultados obtidos indicaram que a maioria da população inquirida já ouviu falar em sumos detox e considera que estes não constituem uma boa opção para substituir refeições, embora lhes associe diversos benefícios. Relativamente aos benefícios nutricionais dos sumos detox, os inquiridos destacaram a sua riqueza vitamínica (80,7%), o seu poder de hidratação (61,4%), a sua riqueza mineral (57,9%) e seu teor de fibra (52,6%).

### \_Abstract

Detox juices are a new food trend associated with weight loss and a healthy lifestyle. They are recognised as a source of natural antioxidants, bioactive compounds and vitamins, and its consumption is associated with the reduction of risk factors for chronic diseases. The objective of this study was to evaluate consumers' perception regarding the health effects associated with the consumption of detox juices. An online questionnaire was developed and applied to 285 individuals aged between 18 and 84 years. The results indicate that the majority of the population surveyed has already heard about detox juices and consider that these juices are not a good option to replace meals, although they recognize the relationship between detox juices and several potential benefits. Regarding the nutritional benefits of detox juices, the subjects highlighted their vitamin richness (80.7%), their hydration maintenance (61.4%), their mineral richness (57.9%) and their fibre content (52.6%).

### \_Introdução

A crescente preocupação por parte da população em fazer escolhas alimentares saudáveis e em consumir alimentos frescos e naturais levou os consumidores e a indústria a cria-

rem diferentes opções para o consumo de frutas e hortícolas, tendo assim surgido os sumos detox.

Os sumos detox são uma tendência alimentar da atualidade (1). São divulgados e publicitados em diversas revistas, websites, programas televisivos, livros, e outros meios de comunicação, alegadamente como desintoxicantes, coadjuvantes de programas de redução de peso, drenantes, entre outras alegações. Atualmente, os consumidores são muitas vezes incentivados a consumi-los como substitutos de refeições, dias ou semanas alimentares.

Embora o consumo destes sumos tenha crescido exponencialmente nos últimos anos e sejam diversas as vantagens que lhes estão associados, as evidências científicas que comprovam os seus benefícios do ponto de vista nutricional são ainda muito limitadas.

No entanto, existem evidências científicas que sustentam que o consumo regular de hortícolas e frutas está associado a efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente na redução de doenças cardiovasculares e cancro (2,3). As frutas e hortícolas são alimentos naturalmente ricos em compostos bioativos e antioxidantes, assumindo um papel de extrema importância na nossa alimentação (4). Verifica-se que o consumo destes alimentos nos países lusófonos é significativamente inferior às recomendações atuais, sendo a promoção do seu consumo uma prioridade a ter em conta na formulação de políticas nutricionais, alimentares e agrícolas destes países (4). Um consumo reduzido de frutas e hortícolas está entre os 10 principais fatores de risco para a mortalidade global (5).



artigos breves\_ n. 6

**\_Objetivo**

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a perceção do consumidor relativamente aos efeitos na saúde associados ao consumo de sumos *detox*.

**\_Material e métodos**

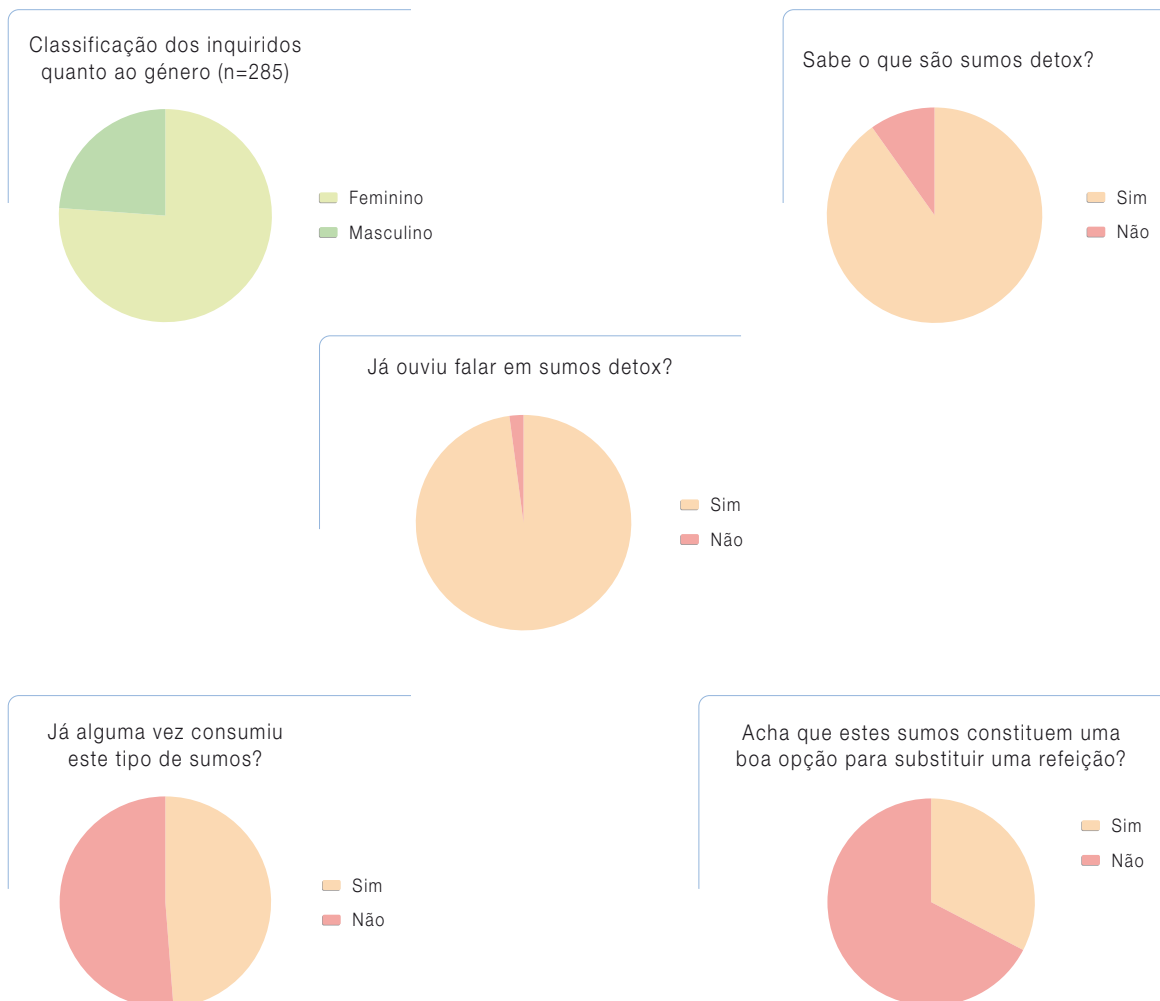
No ano de 2016 foi desenvolvido e aplicado um questionário *online*, disponibilizado ao público por *email* e através das redes sociais. Este encontrava-se organizado em 3 secções: dados gerais e sociodemográficos, consumo de sumos *detox* e perceção dos efeitos na saúde. Foi aplicado a 285 indivíduos com idades compreendidas entre os 18 e os 84 anos.

**\_Resultados e discussão**

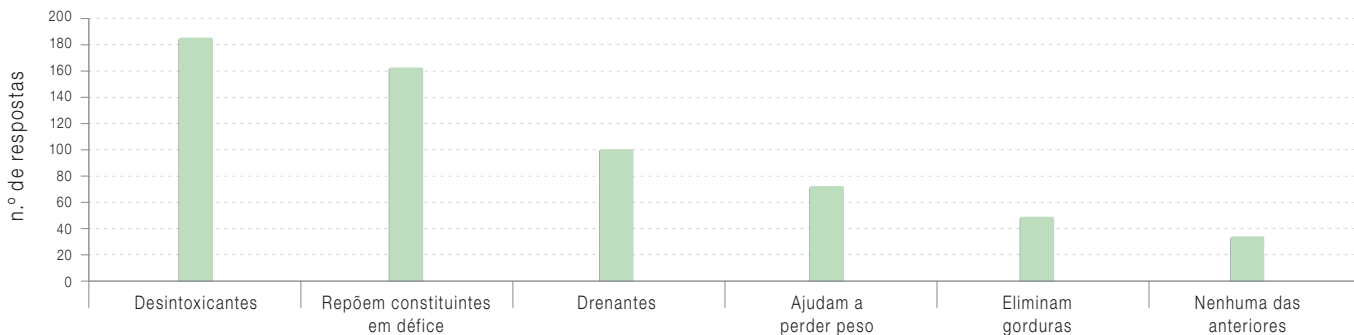
Dos 285 indivíduos inquiridos 76,1% pertenciam ao género feminino e 23,9% ao género masculino. 82,8% da população inquirida possuía formação superior sendo que destes 42,4% tinha formação na área da saúde. Foram abrangidos 18 distritos de Portugal continental e as Regiões Autónomas da Madeira e dos Açores, embora 72,6% da população inquirida fosse residente no distrito de Lisboa.

De acordo com os resultados obtidos (figura 1), 97,9% dos inquiridos já ouviram falar em sumos *detox*, 90,2% sabem no que estes consistem, mas apenas 48,8% já os consumiram pelo

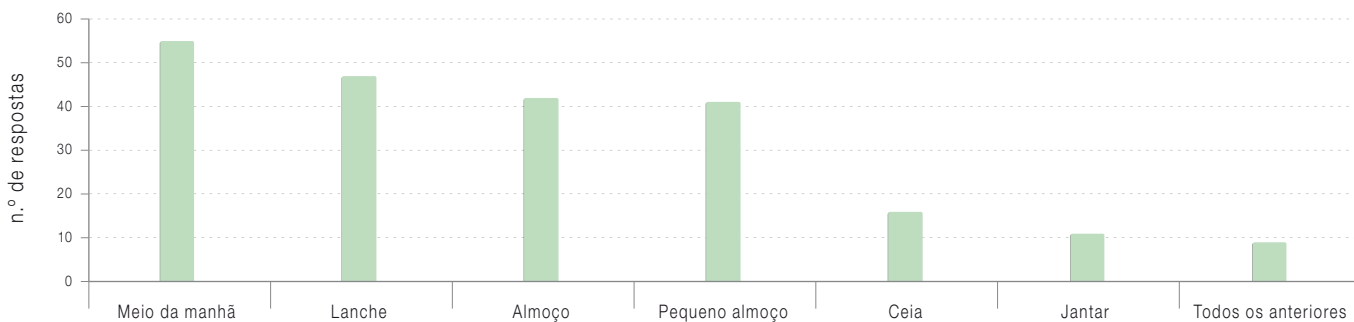
Figura 1: Algumas das respostas obtidas após aplicação *online* do questionário.



Quais as vantagens que associa a este tipo de sumos?



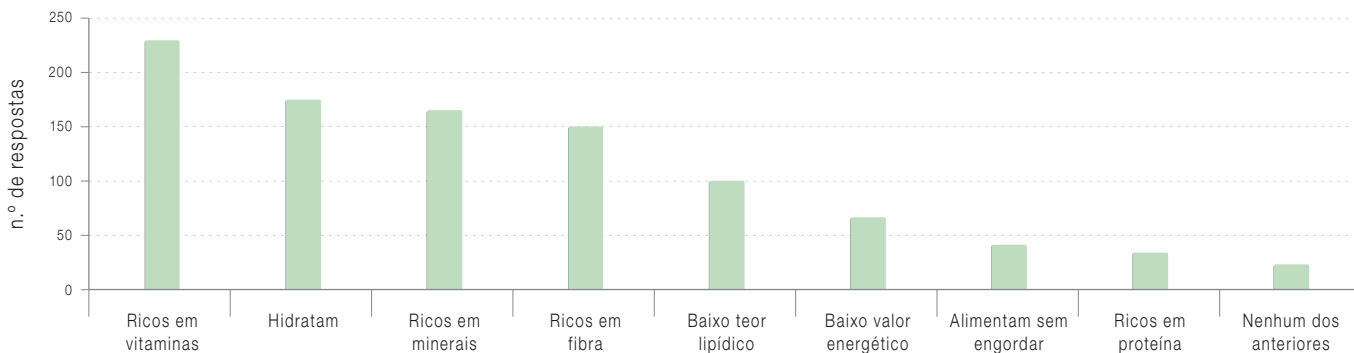
Quais as refeições que um sumo detox poderá substituir?



Porque motivo é que acha que estes sumos não constituem uma boa opção para serem utilizados como substitutos de uma refeição?



Quais as vantagens nutricionais que associa a este tipo de sumos?





artigos breves\_ n. 6

menos uma vez. Dos 51,2% que nunca consumiram sumos *detox* 50,7% dizem que têm curiosidade em experimentá-los e 35,6% considera que estes poderão ter um sabor agradável.

As principais vantagens associadas a estes sumos foram: poder desintoxicante (64,9%); capacidade de repor os constituintes em défice no organismo, como vitaminas e minerais (56,8%); capacidade drenante (35,1%); e coadjuvantes na perda de peso (25,3%).

Dos 285 indivíduos inquiridos, 32,6% considera os sumos *detox* adequados para serem utilizados como substitutos de refeições. Dos 32,6% que considera os sumos adequados para serem utilizados como substitutos de refeições, 68,8% referiu o seu consumo a meio da manhã como a refeição apropriada para substituir. Por outro lado, a população inquirida que não considera os sumos como uma boa opção para substituir refeições (67,4%) afirma que estes não fornecem os nutrientes necessários ao organismo (56,8%), não fornecem a energia necessária (38,5%) e/ou não são saciantes (37,0%).

Relativamente aos benefícios nutricionais dos sumos *detox*, os inquiridos destacaram a sua riqueza vitamínica (80,7%), o seu poder de hidratação (61,4%), a sua riqueza mineral (57,9%) e o seu teor de fibra (52,6%).

## Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem ter uma noção clara da tendência alimentar que os sumos *detox* constituem. A população inquirida já ouviu falar em sumos *detox*, cerca de 50% já os consumiu pelo menos uma vez e 33% considera-os adequados para serem utilizados como substitutos de refeições.

As evidências científicas que existem sobre este tema são muito limitadas mas os benefícios associados aos sumos *detox*, por parte da população em geral, são variados. Torna-se crucial desenvolver trabalhos de investigação que contribuam para a existência de informação fidedigna sobre esta temática, permitindo aos consumidores fazer escolhas alimentares com base em informações cientificamente sustentadas.

## Agradecimentos:

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) no âmbito do projeto BioCOMP (2012DAN730). Tânia Gonçalves Albuquerque agradece a bolsa de doutoramento (SFRH/BD/99718/2014) financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Fundo Social Europeu e Ministério da Educação e Ciência.

## Referências bibliográficas:

- (1) Klein AV, Kiat H. Detox diets for toxin elimination and weight management: a critical review of the evidence. *J Hum Nutr Diet.* 2015;28(6):675-86.
- (2) Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(Suppl 3):559S-569S. <http://ajcn.nutrition.org/content/78/3/559S.long>
- (3) World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR, 2007. [www.aicr.org/assets/docs/pdf/reports/Second\\_Expert\\_Report.pdf](http://www.aicr.org/assets/docs/pdf/reports/Second_Expert_Report.pdf)
- (4) Workshop sobre a Promoção de Hortofrutícolas nos Países de Expressão Portuguesa (2005: Lisboa, Portugal). Workshop de Lisboa sobre a Promoção de Hortofrutícolas nos Países de Expressão Portuguesa: relatório de um workshop conjunto, 1-2 Setembro 2005, Lisboa. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2006. <http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/7593/1/Hortofruticolas.pdf>
- (5) Joint FAO/WHO Workshop on Fruit and Vegetables for Health (2004: Kobe, Japan). Fruit and Vegetables for Health Report of a Joint FAO/WHO Workshop, 1-3 September 2004, Kobe, Japan. Geneva: Rome: World Health Organization and Food, Agriculture Organization of the United Nations, 2005. [www.who.int/dietphysicalactivity/publications/fruit\\_vegetables\\_report.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/fruit_vegetables_report.pdf)



## Óleos essenciais: atividade biológica *in vitro* e sua potencial aplicação a embalagens alimentares

### Essential oils: *in vitro* biological activity and their potential application to food packaging

Regiane Ribeiro-Santos<sup>1,2</sup>, Mariana Andrade<sup>1</sup>, Nathália Ramos de Melo<sup>2,3</sup>, Ana Sanches-Silva<sup>1,4</sup>

ana.silva@insa.min-saude.pt

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

(2) Departamento de Tecnologia Alimentar, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil.

(3) Departamento de Engenharia de Agronegócios, Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brasil.

(4) Centro de Estudos de Ciência Animal, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

#### \_Resumo

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários, produzidos por plantas aromáticas e medicinais, com propriedades biológicas interessantes como a capacidade antimicrobiana e antioxidante. Neste trabalho, foi determinada a atividade antimicrobiana e a capacidade antioxidante dos OEs de manjeriço (*Ocimum basilicum*), canela (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl e *Cinnamomum zeylanicum* Blume) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). O OE da *C. cassia* mostrou ter a melhor atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Penicillium* spp. enquanto o óleo de *C. Zeylanicum* exibiu a melhor capacidade antioxidante pelo método da captura do DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e pelo ensaio do branqueamento do  $\beta$ -caroteno. No entanto, todos os OEs analisados apresentaram boa atividade biológica, revelando um grande potencial para serem aplicados como aditivos naturais, diretamente aos alimentos ou, indiretamente, a embalagens ativas.

#### \_Abstract

Essential oils are secondary metabolites, produced by aromatic and medicinal plant species, with interesting biological properties such as antimicrobial and antioxidant activities. In this research the antimicrobial and antioxidant capacities of the essential oils of basil (*Ocimum basilicum* L.), cinnamon (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl and *Cinnamomum zeylanicum*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) were evaluated. *C. cassia* essential oil presented the highest antimicrobial against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Penicillium* spp. while the *C. zeylanicum* essential oil presented the highest antioxidant capacity by the DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) scavenging method and the  $\beta$ -carotene bleaching assay. However, all the analysed essential oils presented high biological activity, revealing a great potential to be applied as food additives, directly to food or, indirectly, to active packaging.

#### \_Introdução

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de substâncias aromáticas voláteis, produzidos naturalmente como metabólitos secundários de diferentes partes das plantas como as folhas, flores, frutos, caules, raízes, rizomas e sementes (1-7).

A composição dos OEs pode variar de acordo com a espécie e parte da planta de que são extraídos, do método de extração e solvente utilizado, das características edafoclimáticas da planta, do estágio de desenvolvimento da planta, entre outros (8-13).

O interesse pelos OEs tem aumentado nas últimas décadas devido à sua comprovada atividade biológica, incluindo a capacidade antimicrobiana e antioxidante (5,14,15).

Muitos dos OEs são reconhecidos como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), podendo ser utilizados nos alimentos e em embalagens alimentares como aditivos naturais a fim de manterem ou melhorarem as propriedades nutricionais e organolépticas dos mesmos, aumentando o seu tempo de prateleira e contribuindo para manter a sua segurança (16-20).

#### \_Objetivo

Neste trabalho foi avaliada a capacidade antimicrobiana e antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais de manjeriço, canela (de duas espécies) e alecrim.

#### \_Material e métodos

Os OEs selecionados para o estudo (tabela 1) foram adquiridos da Ferquima® (Ferquima Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande Paulista, São Paulo).

A atividade antimicrobiana foi analisada através do método de difusão em ágar (21) contra as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 1122), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e o fungo *Penicillium* spp. As culturas bacterianas e os fungos foram



pré-ativados e incubados a 35 °C em Plate Count Agar (PCA), e a 25 °C em Potato Dextrose Agar (PDA), respetivamente.

Um disco de papel de filtro estéril (6 mm de diâmetro, Unifil) impregnado com 3 µL de OE foi colocado no centro das placas de Petri contendo o meio de cultura ágar Mueller- Hinton previamente inoculado com a bactéria ( $1 \times 10^7$  ufc/mL) ou o fungo ( $10^7$  esporos/mL). As placas foram incubadas à temperatura ótima dos microrganismos e após 24 h (bactérias) e 48 h (fungo) foram observados e medidos os halos de inibição.

O método de captação do radical DPPH e o ensaio do branqueamento do β-caroteno foram utilizados para avaliar a capacidade antioxidante dos OEs.

O método utilizado para o ensaio do DPPH• foi adaptado do método descrito por Moure *et al.* (2001). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) de concentração  $3,6 \times 10^{-5}$  M. A 2 mL da solução metanólica de DPPH• foram adicionados 50 µL de OE. Para os testes controlo foram utilizados 50 µL de metanol. As amostras foram colocadas à temperatura ambiente, protegidas da luz durante 30 min, e em seguida, a sua absorvância foi medida ( $\lambda = 515$  nm) num espectrofotómetro (U-2000, Hitachi). A percentagem de inibição (PI) dos OEs foi calculada pela equação 1.

$$PI (\%) = \frac{absC - absA}{absC} \times 100$$

Em que *absC* representa a absorvância da amostra controlo e *absA* representa a absorvância da amostra.

O  $EC_{50}$ , ou seja, a concentração que causa uma inibição de 50% do radical DPPH, foi determinado para os OEs com maior capacidade antioxidante (OEs de *C. zeylanicum* e *R. officinalis*). Para tal, prepararam-se diversas diluições dos OEs e determinaram-se as suas respetivas PI. Posteriormente foram traçados gráficos com PI (%) *versus* concentração (mg/mL) e pelo Método dos Mínimos Quadrados foi estabelecida uma equação linear para cada curva, sendo depois possível calcular as concentrações que originaram uma PI (%) igual a 50%, ou seja, o  $EC_{50}$ , por interpolação (22-23).

No ensaio do branqueamento do β-caroteno, adaptado do método descrito por Miller (1971), foi realizada uma solução de 0,2 mg/mL de β-caroteno (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) em clorofórmio. Desta diluição, retirou-se 1 mL ao qual foram adicionados 20 mg de ácido linoleico (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) e 200 mg de Tween40®. O clorofórmio desta solução foi evaporado a 40 °C a 100 mbar. De seguida, 50 mL de água ultrapura foram adicionados e a solução foi vigorosamente agitada para assegurar a formação de uma emulsão de β-caroteno e ácido linoleico. Para realizar o ensaio, foram adicionados 0,2 mL de diferentes concentrações dos OEs em metanol a 5 mL da emulsão de β-caroteno. As amostras foram aquecidas a 50 °C durante 120 minutos. Após este tempo, a absorvância das amostras foi medida ( $\lambda = 470$  nm) num espectrofotómetro (U-2000, Hitachi). As amostras controlo foram preparadas com metanol em substituição dos OEs e a sua absorvância foi medida antes do período de incubação (0 min) e após 120 min de incubação. A Capacidade da Atividade Antioxidante (AAC, *Antioxidant Activity Capacity*) foi calculada através da equação 2.

$$AAC = \frac{AA120 - AC120}{AC0 - AC120} \times 1000$$

Na qual *AA120* representa a absorvância da amostra aos 120 min, *AC0* representa a absorvância do controlo aos 0 min, e *AC120* representa a absorvância do controlo aos 120 minutos.

Todos os testes foram expressos como médias ± desvio padrão de, pelo menos, três repetições. Os valores foram tratados com recurso à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com um nível de probabilidade de 0,1 e 0,05 para os resultados da capacidade antimicrobiana e antioxidante, respetivamente, utilizando o software STATISTICA® 10.0 (Statsoft Inc. 2325, Tusla, OK).



## Resultados

Os resultados da atividade antimicrobiana dos OEs estão compilados na **tabela 2**. O OE de *C. cassia* apresentou os melhores resultados de atividade antimicrobiana enquanto o OE de *O. basilicum* mostrou reduzida ou inexistente ação contra *E. coli*, *S. aureus* e *Penicillium* spp (**tabela 2**). O OE de alecrim não exibiu atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.

A *E. coli* e o *S. Aureus* foram inibidos pelos OEs provenientes das duas espécies de canela. O fungo apresentou suscetibilidade a todos OEs testados, exceto ao de alecrim (**tabela 2**).

Relativamente à capacidade antioxidante dos óleos (**tabela 3**), o OE de *C. zeylanicum*, exibiu o maior resultado pelo ensaio do radical DPPH e do branqueamento do  $\beta$ -caroteno seguido pelos óleos de *R. officinalis*, de *C. cassia* e, por fim, pelo óleo de *O. basilicum*.

**Tabela 1:** Descrição dos óleos essenciais disponibilizada pelo fabricante.

Planta aromática	Nome científico	Parte da planta utilizada para preparar os OEs
Manjerição	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Folhas
Canela	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J. Presl	Caule, casca e folhas
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Folhas
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Folhas

**Tabela 2:** Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (adaptado de Ribeiro-Santos *et al.*, 2017).

Óleos essenciais	Diâmetro médio da zona de inibição (cm) <sup>(1-3)</sup>		
	<i>Escherichia coli</i> (Gram-negativa)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positiva)	<i>Penicillium</i> spp
<i>O. basilicum</i>	0,135 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,342 ± 0,003 <sup>a</sup>
<i>C. cassia</i>	1,035 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,85 ± 0,31 <sup>b</sup>	4,292 ± 0,26 <sup>b</sup>
<i>C. zeylanicum</i>	0,415 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,775 ± 0,06 <sup>c</sup>	3,192 ± 0,19 <sup>c</sup>
<i>R. officinalis</i>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>

a) Não inclui o diâmetro do disco de 0,6 cm.

b) Os resultados obtidos são a média dos testes ± desvio padrão, n=3.

c) As médias, dentro da mesma coluna, que apresentem a mesma letra, não apresentam diferenças significativas (p > 0,1) pelo Teste de Tukey.

**Tabela 3:** Capacidade antioxidante dos óleos essenciais <sup>(1,2)</sup> (adaptado de Ribeiro-Santos *et al.*, 2017).

Óleos essenciais	DPPH• (PI %)	DPPH• [EC <sub>50</sub> (mg/mL)]	Branqueamento do $\beta$ -caroteno (AAC)
<i>O. basilicum</i>	26,6 ± 1,80 <sup>a</sup>	nd	8,88 ± 0,33 <sup>a</sup>
<i>C. cassia</i>	44,8 ± 1,37 <sup>b</sup>	nd	8,94 ± 2,26 <sup>a</sup>
<i>C. zeylanicum</i>	*	0,14 ± 0,00 <sup>a</sup>	927 ± 3,62 <sup>b</sup>
<i>R. officinalis</i>	80,2 ± 0,28 <sup>c</sup>	38,5 ± 0,51 <sup>b</sup>	68,3 ± 17,4 <sup>c</sup>

a) Os resultados obtidos são a média dos testes ± desvio padrão, n=3.

b) As médias, dentro da mesma coluna, que apresentem a mesma letra, não apresentam diferenças significativas (p > 0,05) pelo Teste de Tukey.

\* superior a 100%; nd - não determinado.



## \_Discussão

Em geral, as bactérias Gram negativo, como a *E. coli*, são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as bactérias Gram positivo, devido à complexidade da dupla membrana celular comparativamente com a membrana simples das bactérias Gram positivo. No caso da *E. coli*, esta bactéria tem uma parede celular externa constituída por lipopolissacarídeos, o que torna mais difícil a penetração dos componentes dos OEs (3, 25).

Os resultados encontrados para o OE de alecrim estão de acordo com os resultados encontrados por Teixeira *et al.* (26). No entanto são diferentes dos resultados encontrados por Mathlouthi *et al.* (27) nos quais foi observada atividade antimicrobiana do OE de alecrim contra *E. coli* e *S. aureus*.

Bozin *et al.* (28) encontraram resultados semelhantes ao deste trabalho para a mesma espécie de manjeriço.

No que diz respeito à capacidade antioxidante, os resultados encontrados para o OE de canela estão de acordo com os resultados obtidos por Prasad *et al.* (29).

Não obstante, é de salientar que os OEs são misturas de substâncias bastante heterogêneas e as suas atividades biológicas devem-se a um componente maioritário e a efeitos sinérgicos e/ou antagonistas dos seus componentes, que são de carácter bastante variável e dependem não só das espécies das plantas, mas também do método de extração e parte da planta utilizados (30,31).

## \_Conclusão

O óleo essencial de canela, e em particular, o óleo proveniente da espécie *C. cassia*, foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana. Por outro lado, o óleo proveniente da espécie *C. zeylanicum* foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Os óleos essenciais estudados, utilizados individualmente ou em combinação, são uma ótima alternativa aos aditivos sintéticos uma vez que possuem capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana, podendo ser adicionados diretamente aos alimentos ou podem ser incorporados em embalagens alimentares ativas com o objetivo de prolongar a vida útil dos alimentos.

## Referências bibliográficas:

- (1) Nakatsu T, Lupo AT, Chinn JW, et al. Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies Nat Prod Chem* 2000;21(Part B):571-631.
- (2) Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2004;35(4): 275-80. [www.scielo.br/pdf/bjm/v35n4/v35n4a01.pdf](http://www.scielo.br/pdf/bjm/v35n4/v35n4a01.pdf)
- (3) Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
- (4) Dvaranauskaitė A, Venskutonis PR, Raynaud C, et al. Variations in the essential oil composition in buds of six blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars at various development phases. *Food Chem.* 2009;114(2):671-9.
- (5) Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(5):1362-70.
- (6) Lv J, Huang H, Yu L, et al. Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. *Food Chem.* 2012;132(3):1442-50.
- (7) Hill LE, Gomes C, Taylor TM. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Sci Technol.* 2013;51(1):86-93.
- (8) Khajeh M, Yamini Y, Bahramifar N, et al. Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chem.* 2005;91(4):639-44.
- (9) Elzaawely A, Xuan T, Koyama H, et al. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chem.* 2007;104(4):1648-53.
- (10) Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol.* 2012;156(1):7-17.
- (11) Riahi L, Elferchichi M, Ghazghazi H, et al. Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Ind Crops Prod.* 2013;49:883-9.
- (12) Costa DC, Costa HS, Albuquerque TG, et al. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends Food Sci Technol.* 2015;45(2):336-54.
- (13) Ribeiro-Santos R, Carvalho-Costa D, Cavaleiro C, et al. A novel insight on an ancient aromatic plant: the rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends Food Sci Technol.* 2015;45(2):355-68.
- (14) Brahmi F, Abdenour A, Bruno M, et al. Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Ind Crops Prod.* 2016;88:96-105.
- (15) Seydim AC, Sarikci G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int.* 2006;39(5):639-44.
- (16) Food And Drug Administration. Code of Federal Regulations (CFR) Title 21 - Food and Drugs. Chapter I - Food Drug Adm Dep Heal Hum Serv. Subchapter B - Food for human consumption. Part 182 - Substances generally recognized as safe [Em linha]. [consult. 22/12/2016]. [www.law.cornell.edu/cfr/text/21/part-182](http://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/part-182)
- (17) Keshvari M, Asgary S, Jafarian-Dehkordi A, et al. Preventive effect of cinnamon essential oil on lipid oxidation of vegetable oil. *ARYA Atheroscler.* 2013;9(5):280-6.
- (18) Dussault D, Vu KD, Lacroix M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Sci.* 2014;96(1):514-20.
- (19) Szczepanski S, Lipski A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control.* 2014;36(1):224-9.
- (20) Echegoyen Y, Nerin C. Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality. *Food Chem.* 2015;170:30-6.
- (21) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (Approved standard). 8th ed. Wayne, Pa: NCCLS, 2003 (Document M2-A8).
- (22) Cruz JM, Domínguez H, Parajó JC. Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Food Chem.* 2005;90(4):503-11.
- (23) Cruz JM, Conde E, Domínguez H, et al. Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. *Food Chem.* 2007;100(3):1059-64.
- (24) Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* 1971;48(2):91-101.
- (25) Zinoviadou KG, Koutsoumanis KP, Biliaderis CG. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Sci.* 2009;82(3):338-45.



artigos breves\_ n. 7

- 26) Teixeira B, Marques A, Ramos C, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crops Prod.* 2013;43(1):587-95.
- 27) Mathlouthi N, Bouzaienne T, Oueslati I, et al. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J Anim Sci.* 2012;90(3):813-23.
- 28) Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem.* 2006;54(5):1822-8.
- 29) Prasad KN, Yang B, Dong X, J, et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2009;10(4):627-32.
- 30) Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(9):1650-61.
- 31) Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control.* 2013;31(1):189-95.
- 32) Ribeiro-Santos R, Andrade M, de Melo NR, et al. Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging. *Ind Crops Prod.* 2017;97:201-10.



## Primeiro caso de botulismo tipo F, em Portugal

### First case of type F botulism, in Portugal

Margarida Saraiva<sup>1</sup>, Teresa Teixeira Lopes<sup>1</sup>, André Militão<sup>2</sup>, Rosa Santos Ribeiro<sup>3</sup>, Adelaide Coelho<sup>4</sup>, Isabel Bastos Moura<sup>1</sup>, Cláudia Pena<sup>1</sup>, Conceição Costa Bonito<sup>1</sup>, Isabel Campos Cunha<sup>1</sup>, Isabel Sousa<sup>1</sup>; Maria Manuel Toscano<sup>1</sup>, Carlos Orta Gomes<sup>4</sup>, Elsa Soares<sup>4</sup>, António Tavares<sup>4</sup>, Maria Antónia Calhau<sup>1</sup>

margarida.saraiva@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Microbiologia. Unidade de Referência. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

(2) Serviço de Neurologia. Hospital de São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal, Setúbal, Portugal

(3) Serviço de Cuidados Intensivos. Hospital de São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal, Setúbal, Portugal.

(4) Departamento de Saúde Pública, Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

A nível mundial, estão descritos poucos casos de botulismo tipo F em humanos. Em julho de 2016 foi identificado o primeiro caso de botulismo tipo F, em Portugal. Foi detetada toxina botulínica tipo F (BoNT/F) nas fezes de um doente com quadro clínico típico de botulismo e isolada a estirpe de *Clostridium botulinum* produtora de BoNT/F.

### \_Abstract

Worldwide few cases of type F botulism are described in humans. In July 2016 the first case of type F botulism in Portugal was identified. Botulinum toxin type F (BoNT/F) was detected in the stool of a patient with clinical symptoms typical of botulism and the strain of *Clostridium botulinum* F producer of BoNT was isolated.

### \_Introdução e objetivo

A nível mundial, estão descritos poucos casos de botulismo tipo F em humanos (1). Na sua maioria, os casos de botulismo descritos em humanos têm sido provocados por toxinas do tipo A, B ou E. Os microrganismos que têm sido identificados como produtores de toxina F são o *C. botulinum* e o *C. baratii* (1). Podem ser causa de botulismo: a ingestão de alimentos contaminados ou, mais raramente, a infeção de feridas, a produção de toxina no trato intestinal se imunologicamente imaturo (botulismo infantil) ou a colonização intestinal no adulto (1).

Este trabalho resulta da colaboração entre o Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), o Hospital de São Bernardo do Centro

Hospitalar de Setúbal e o Departamento de Saúde Pública, da Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo e apresenta o primeiro caso de botulismo tipo F, identificado em Portugal.

### \_Caso clínico

Um homem de 53 anos foi admitido no Serviço de Urgência do Hospital de S. Bernardo, em Setúbal, com quadro clínico de botulismo que incluía visão turva, diplopia, ptose palpebral, disfagia, boca seca e midríase bilateral não-reativa. O doente reportou náuseas, perturbações abdominais e vômitos, após o jantar do dia anterior. Foi hospitalizado com o diagnóstico possível de botulismo versus síndrome de Guillain-Barré atípico. Subsequentemente, apresentou dificuldade respiratória progressiva, retenção urinária e paraparesia flácida, tendo sido transferido para a Unidade de Cuidados Intensivos. Uma amostra de soro e uma amostra de fezes resultante de um micro enema foram enviadas ao INSA. Apesar de lhe ter sido administrada antitoxina botulínica (A,B,E), o doente necessitou de suporte ventilatório durante 8 dias. O doente teve alta após 30 dias de internamento e não apresentava sintomatologia associada ao caso passado 3 meses.

A investigação epidemiológica e ambiental foi realizada pela Autoridade de Saúde Local e Regional. Foi efetuado um inquérito para identificar géneros alimentícios suspeitos consumidos nas 72 horas (2) anteriores ao início das queixas, tendo sido inquiridos os membros da família do doente. Foi identificada como possível refeição suspeita uma salada de atum prepara-



da em casa, que foi consumida unicamente pelo doente. Não havendo sobras, nem rastreabilidade do lote da conserva ingerida, foram enviadas para o INSA duas embalagens intactas de conserva de atum de dois lotes diferentes, da mesma marca da que tinha sido ingerida pelo doente, assim como cebola e tomate frescos e pimenta, idênticos aos utilizados na preparação da salada e café em cápsulas, do mesmo lote do ingerido após a refeição. Não podem ser excluídos como suspeitos outros alimentos ingeridos nas 72 horas antes do início dos sintomas, que não foram rastreáveis, tendo contudo estes, sido partilhados com outras pessoas que não apresentaram queixas.

## \_ Resultados

As amostras de soro e de fezes foram testadas para pesquisa de toxina botulínica por bioensaio em ratinhos (3) e a amostra de fezes foi também testada para a presença de clostrídios produtores de toxina botulínica (multiplex-PCR e cultura) (4, 5). Nas fezes foi detetada a presença de toxina botulínica tipo F e isolada uma estirpe de *C. botulinum* produtora de BoNT/F. A inoculação de 1mL de soro em *Balb/c* provocou, ao fim de 3 dias do soro, a morte dos animais inoculados. A prova de seroneutralização foi inconclusiva.

Foi realizada a pesquisa de toxina por bioensaio nas duas conservas (3). Em todas as amostras de géneros alimentícios foi realizada a pesquisa de clostrídios produtores de toxina botulínica por multiplex-PCR e por método cultural (4, 5). Não foi detetada BoNT, nem clostrídios produtores de BoNT nos géneros alimentícios analisados.

## \_ Conclusões

Alguns dos poucos casos de BoNT/F relatados em adultos foram devidos à colonização intestinal e outros a botulismo de origem alimentar (1). O facto de o doente ter tido perturbações gastrointestinais leva-nos a suspeitar de uma toxinfecção alimentar. Tal como na maioria dos casos descritos de botulismo tipo F, não foi identificada com forte evidência a suspeita dirigida a um veículo alimentar concreto (1).

## Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Scientific advice on type F botulism. Stockholm: ECDC, 2013. [www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/botulism-scientific-advice-type-F-botulism.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/botulism-scientific-advice-type-F-botulism.pdf)
- (2) Heymann DL. Control of communicable diseases. 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association Press, 2013.
- (3) Centres for Disease Control. Clostridium botulinum Monovalent and Polyvalent Antitoxins. Atlanta, Georgia: CDC, 1987.
- (4) Austin JW, Sanders G. Detection of Clostridium botulinum and its toxins in suspect foods and clinical specimens. In: Health Canada Compendium of Analytical Methods. HPB Methods for the Microbiological Analysis of Foods MFHPB-16, vol. 2. Ontario: Health Canada, 2009, pp. 1-9.
- (5) De Medici D, Anniballi F, Wyatt GM, et al. Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin-producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. Appl Environ Microbiol. 2009;75(20):6457-61. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2765140/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2765140/)



## Investigação laboratorial de surtos de toxinfecções alimentares, 2015

### Foodborne outbreaks laboratory investigation, 2015

Silvia Viegas<sup>1</sup>, Isabel Campos Cunha<sup>1</sup>, Cristina Belo Correia<sup>1</sup>, Anabela Coelho<sup>1</sup>, Carla Maia<sup>1</sup>, Cláudia Pena<sup>1</sup>, Conceição Costa Bonito<sup>1</sup>, Cristina Flores<sup>1</sup>, Isabel Bastos Moura<sup>1</sup>, Isabel Sousa<sup>1</sup>, Maria João Barreira<sup>1</sup>, Maria Manuel Toscano<sup>1</sup>, Rosália Furtado<sup>1</sup>, Sílvia Marcos<sup>1</sup>, Susana Santos<sup>1</sup>, Teresa Teixeira Lopes<sup>1</sup>, Leonor Silveira<sup>2</sup>, Jorge Machado<sup>2</sup>, Margarida Saraiva<sup>1</sup>, Maria Antónia Calhau<sup>1</sup>

silvia.viegas@insa.min-saude.pt

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

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

### \_Resumo

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em parceria com a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), notifica anualmente à *European Food Safety Authority* (EFSA) os dados dos surtos de toxinfecção alimentar ocorridos em Portugal, cuja investigação laboratorial é efetuada no INSA. De acordo com as orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da EFSA, em 2015, no Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, foram compilados e analisados os dados referentes a 20 surtos, tendo sido afetados 421 indivíduos, dos quais 96 foram hospitalizados, não tendo sido reportados óbitos. O local onde os alimentos foram consumidos ou onde ocorreu uma ou mais etapas finais de preparação foi identificado em 90% dos surtos (75% locais públicos e 25% domésticos). O agente causal e/ou suas toxinas foram identificados em 50% dos surtos: Toxina botulínica tipo B, *C. perfringens*, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* serogrupo IVb, *E. coli* verotoxigénica não-O157, Enterotoxina estafilocócica tipo A e *Shigella sonnei*. Foram identificados como principais fatores contributivos o tratamento térmico inadequado, abusos tempo/temperatura e ocorrência de contaminações cruzadas. De acordo com a Diretiva 2003/99/CE, a EFSA em colaboração com o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) elabora anualmente um relatório técnico com informação relativa aos Estados-Membros, de modo a gerar evidência científica que permita a otimização dos sistemas de segurança alimentar implementados, assim como os programas de educação para a saúde, minimizando o impacto humano, económico e social destas doenças na Europa.

### \_Abstract

National Health Institute Doutor Ricardo Jorge (INSA) in partnership with the Directorate-General of Food and Veterinary Medicine (DGAV), notifies each year to the *European Food Safety Authority* (EFSA) the data of foodborne outbreaks that occurred in Portugal, whose laboratory investigation was done by INSA. According to the guidelines of World Health Organization (WHO) and EFSA, in 2015 in the Food and Nutrition Department of INSA data from 20 outbreaks were compiled and analyzed; involving 421 cases, 96 hospitalizations and no fatal cases were reported. The places where food was consumed or where the final stages of preparation of the food vehicle took place were identified in 90% of the outbreaks (75% public places and 25% households). The causative agents or its toxins were identified in 50% of the outbreaks analyzed: *Botulinum toxin type B*, *C. perfringens*, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, *E. coli* vero-

toxicogenic non-O157, *Staphylococcus toxin type A* and *Shigella sonnei*. The main contributory factors identified were inadequate heat treatment, time/temperature abuse and occurrence of cross-contaminations. In accordance with Directive 2003/99/EC, EFSA in collaboration with *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) prepares annually a technical report with information from the Member States, in order to produce scientific evidence that allows the optimization of implemented food safety systems, as well as health education programs, minimizing the human, economic and social impact of these diseases in Europe.

### \_Introdução

Considera-se um surto de toxinfecção alimentar uma doença infecciosa ou tóxica que afeta dois ou mais indivíduos, causada, ou que se suspeita ter sido causada, pelo consumo de género(s) alimentício(s) ou água contaminados por microrganismos, suas toxinas ou metabolitos. Embora as toxinfecções alimentares sejam causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, podem ser prevenidas pela minimização dos fatores que estão na sua origem.

O Departamento de Alimentação e Nutrição, em parceria com outros Departamentos do INSA, na sua função de laboratório de referência, e em colaboração com a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, notifica anualmente à *European Food Safety Authority* (EFSA) os dados dos surtos ocorridos em Portugal, cuja investigação laboratorial foi realizada no INSA. Deste modo, ao abrigo da Diretiva 2003/99/CE, a EFSA analisa os dados enviados pelos Estados-Membros e prepara um relatório anual, em colaboração com o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), de modo a gerar evidência científica que permita a otimização dos





## Resultados e discussão

No período em estudo (2015) foi realizada a investigação laboratorial de 20 surtos que afetaram 421 indivíduos, dos quais 96 foram hospitalizados, não tendo sido reportados óbitos. A força da evidência dos surtos foi forte em 8 surtos e fraca em 12.

O agente etiológico causal foi identificado em 50% (10/20) dos surtos analisados no ano 2015: 4 Toxina botulínica tipo B, 1 *C. perfringens*, 1 *Salmonella* Enteritidis, 1 *Listeria monocytogenes* serogrupo IVb, 1 *E. coli* verotoxigénica não-O157, 1 Enterotoxina estafilocócica tipo A e 1 *Shigella sonnei* (tabela 1).

Em 2014, o agente etiológico causal foi identificado em 52% (13/25) dos surtos reportados pelo INSA e em 71% (3720/5251) do total de surtos reportados pela EFSA (3).

A evidência que suporta a suspeita da existência de um veículo alimentar implicado pode ser microbiológica, epidemiológica descritiva, ambiental ou baseada em investigações da rastreabilidade de produtos (2).

A evidência microbiológica consiste na deteção do agente causal no veículo alimentar ou nos seus componentes, ou na cadeia, ou ambiente da produção alimentar, combinado com a deteção do agente causal nos humanos afetados ou com a manifestação de sintomas clínicos e início de doença fortemente compatíveis com o agente causal identificado no veículo alimentar, ou nos seus componentes, ou na cadeia, ou ambiente da produção alimentar.

Em 6 surtos, a evidência que ligou o surto à ingestão do alimento foi microbiológica com deteção do agente causal no alimento, combinada em 3 destes com a deteção do agente causal nos doentes e, nos outros 3, com a presença de sintomas clínicos e início de doença compatíveis com o agente causal. Em 1 surto, a natureza da evidência que ligou o consumo do alimento (bacalhau à Brás) ao surto foi epidemiológica descritiva. Não foram analisados laboratorialmente sobras, nem amostras “testemunha” do alimento implicado. Em 3 surtos onde o agente etiológico causal foi identificado, o veículo alimentar é desconhecido.

Tabela 1: Surtos confirmados pela identificação do agente etiológico causal: género alimentício implicado e nº de pessoas afetadas.

Agente causal	Género alimentício	N.º de pessoas afetadas
<i>Shigella sonnei</i>	Desconhecido	26
<i>C. perfringens</i> Outros agentes: VTEC não –O157 ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> ) e <i>B. cereus</i>	Rojões	5
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Bacalhau à Brás	3
Toxina botulínica tipo B	Desconhecido	Desconhecido
Toxina botulínica tipo B	Presunto	4
Toxina botulínica tipo B	Alheira	4
Toxina botulínica tipo B	Desconhecido	Desconhecido
<i>Listeria monocytogenes</i> serogrupo IVb	Refeições compostas, com todos os componentes cozinhados	3
VTEC não –O157 ( <i>eae</i> negativo)	Hambúrguer com cebola, pronto a comer	120
Enterotoxina estafilocócica tipo A	Peixe à Brás	67



Tabela 2: ⚓ Surtos com agente etiológico identificado - 2010 a 2015.

Número	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Surtos	4	8	7	10	13	20	62
Casos	56	101	135	183	589	421	1485
Hospitalizados	0	1	1	17	56	96	171
Óbitos	0	0	0	0	0	0	0

O local onde os alimentos foram consumidos ou onde tiveram lugar as etapas finais de preparação dos mesmos foi identificado em 90% dos surtos. Destes, 75% ocorreram em locais públicos, isto é, envolveram indivíduos que consumiam alimentos, em mais do que um local (ex. instituições residenciais, cantinas/bares de escolas, colégios, infantários, creches, restaurantes, hospitais, lares de idosos, etc.) e 25% foram surtos domésticos, isto é, todos os doentes envolvidos pertenciam ao mesmo agregado familiar. Os fatores que se identificaram como contributivos para a ocorrência dos surtos foram: tratamento térmico inadequado, abusos tempo/temperatura e contaminação cruzada.

Na **tabela 2** pode observar-se o número de surtos investigados laboratorialmente com agente causal identificado, que ocorreram entre 2010 e 2015, evidenciando o número de casos, hospitalizados e óbitos reportados.

Esta informação deverá evidenciar a necessidade de divulgação das boas práticas de higiene em programas de educação para a saúde.

Para melhorar a percentagem de surtos notificados, bem como a informação associada, deverão congrega-se esforços pluridisciplinares e regulamentares.

### Conclusões

Os dados evidenciam que um tratamento térmico inadequado para a destruição microbiana e a manutenção dos alimentos a temperaturas incorretas, associados a um período de tempo favorável ao desenvolvimento microbiano e à potencial produção de toxinas, muitas vezes ocorrendo simultaneamente com procedimentos incorretos promotores de contaminações cru-

zadas, continuam a ser os fatores contributivos mais frequentes na ocorrência de surtos de toxinfecções alimentares.

Nos programas de educação para a saúde, a disseminação e a aplicação de conhecimentos práticos na área da higiene e segurança alimentar são fundamentais para a prevenção das doenças de origem alimentar, destacando-se a importância das regras básicas contidas no manual da OMS “Cinco chaves para uma alimentação mais segura” (4) e na publicação “Segurança alimentar: guia das boas práticas do consumidor” (5).

O INSA, como Laboratório Nacional de Referência na área da saúde para o estudo epidemiológico laboratorial de toxinfecções alimentares, está empenhado na melhoria da informação disponível de ocorrência de surtos de origem alimentar de forma a ser uma evidência científica de suporte a uma gestão eficaz do risco.

### Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva: WHO, 2008. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43771/1/9789241547222\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43771/1/9789241547222_eng.pdf)
- (2) European Food Safety Authority. Manual for reporting on food-borne outbreaks in accordance with Directive 2003/99/EC for information deriving from the year 2015. Parma: EFSA, 2016. (EFSA Supporting publication 2016: EN-989). [www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/989e](http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/989e)
- (3) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015;13(12):4329. [www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4329](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4329)
- (4) Organização Mundial da Saúde; Amorim J, Novais MR, Correia MJF (trad). Cinco chaves para uma alimentação mais segura: manual. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2008. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/75>
- (5) Viegas S; Oliveira L, Calhau MA, Saboga LAN, et al. (rev). Segurança alimentar: guia de boas práticas do consumidor. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2371>



## **Deteção de norovírus e vírus da hepatite A em géneros alimentícios**

### *Detection of norovirus and hepatitis A virus in foodstuffs*

Anabela Coelho, Rosália Furtado, Cristina Belo Correia, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau

[anabela.coelho@insa.min-saude.pt](mailto:anabela.coelho@insa.min-saude.pt)

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

#### **\_Resumo**

Em 2014, os dados reportados para a *European Food Safety Authority* (EFSA), evidenciam que o número de surtos causado por vírus foi superior ao causado por *Salmonella* spp. contudo, em 2015, este número diminuiu. A nível mundial e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 2007 e 2015 os vírus foram os principais agentes causais de doenças diarreicas. Com o objetivo de incrementar a sua capacidade de resposta no esclarecimento de surtos de toxinfecção alimentar bem como na vigilância, monitorização e controlo de géneros alimentícios, o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) implementou em 2015 o método de deteção de Norovírus (NoV) genogrupos GI e GII e vírus da Hepatite A (HAV) de acordo com a ISO/TS 15216-2. As amostras analisadas em 2015-2016 incluíram moluscos bivalves, frutos vermelhos, vegetais e superfícies do ambiente de produção/manipulação de alimentos. Em amostras dos moluscos bivalves não depurados foram detetados NoV GI e GII. Surtos de origem alimentar de NoV e HAV são um problema emergente em saúde pública, pelo que as estratégias de controlo deverão orientar-se essencialmente para a vigilância e prevenção da contaminação dos géneros alimentícios mais suscetíveis, identificando e minimizando o impacto dos diversos fatores de risco inerentes ao ambiente de produção, preparação, conservação, distribuição e consumo.

#### **\_Abstract**

In 2014 the data reported to *European Food Safety Authority* (EFSA), evidenced that the number of foodborne outbreaks caused by viruses was higher than those caused by *Salmonella* spp., but in 2015 this number decreased. At global level and according to the *World Health Organization* (WHO), between 2007 and 2015 viruses were the main diarrhoeal diseases agents. With the objective to contribute to the clarification of foodborne outbreaks of viral origin associated to foodstuffs consumption and to enhance the laboratory capacity, the *Food Microbiology Laboratory of the Food and Nutrition Department*, implemented in 2015 the method for detection of *Norovirus* (NoV) *Genogroup I and II* and *Hepatitis A Virus* (HAV) according to ISO/TS 15216-2. The samples analysed included bivalve molluscs, soft fruits, vegetables and surfaces of the environment of production/handling of foodstuffs. In samples of bivalve molluscs, not depurated, *Norovirus GI and GII* were detected. Foodborne outbreaks caused by NoV and HAV are a public health emerging problem, and so the control strategies should be oriented essentially to the surveillance and prevention of the contamination of more susceptible foodstuffs, identifying and minimizing the impact of several risk factors inherent to the environment of production, preparation, conservation, distribution and consumption.

#### **\_Introdução**

O estudo da etiologia das doenças de origem alimentar é complexo, uma vez que apenas uma parte dos casos de doença são reportados às Autoridades de Saúde e muitas das doenças, resultantes da ingestão de um alimento contaminado, podem surgir semanas ou até meses após o consumo do(s) alimento(s), dificultando quer o estabelecimento de um nexo de causalidade alimento-doença, quer a investigação epidemiológica.

No âmbito dos contaminantes biológicos e, em particular, no caso dos vírus, as suas características estruturais e biológicas, a dose infetante, o modo de transmissão, a persistência no ambiente, entre outras, são muito diferentes das dos outros microrganismos habitualmente implicados em surtos de toxinfecções alimentares, dificultando ainda mais a investigação do surto e a identificação do agente causal (1-3).

Em 2008, estudos de avaliação de risco realizados por peritos da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), referem que o conhecimento da fonte de contaminação é fundamental para definir estratégias de intervenção (2, 3).

Analisando os dados relativos aos surtos de origem alimentar associados a vírus, reportados para a *European Food Safety Authority* (EFSA), verifica-se que o número de surtos foi muito variável entre 2008 e 2014. Em 2009, foram reportados 1 043 surtos, tendo este número decrescido progressivamente até 2011. A partir de 2011 ocorreu um aumento de 525 para 1 072 surtos em 2014 e, em 2015, voltou a descer para 401 surtos. O número de casos associados a surtos por vírus (14 754) correspondeu a 36,8% dos casos associados a surtos. De referir que em 2015, em 45 destes surtos a evidência foi forte, isto é, foi identificado o alimento específico implicado, responsável



artigos breves\_ n. 10

pelo surto. Relativamente ao alimento implicado, os “crustáceos, moluscos bivalves e produtos derivados” foram o veículo alimentar mais frequente (27,8%) e o “manipulador infetado”, “contaminação cruzada” e “ingrediente contaminado não processado”, foram os fatores contributivos associados a estes surtos (4).

De acordo com o relatório da OMS publicado em 2015, relativo ao impacto das doenças de origem alimentar em saúde pública, entre 2007 e 2015 os vírus são os principais agentes causais de doenças diarreicas, com ampla distribuição em todo o mundo. Na Europa, destaca-se como agente mais frequente o Norovírus (NoV) responsável por cerca de 15 milhões de casos de doença (5).

Norovírus (NoV) e Vírus da Hepatite A (HAV) são microrganismos altamente contagiosos, transmitidos habitualmente pela via fecal-oral, no contacto pessoa a pessoa (via mais comum), através de água contaminada (de consumo ou de recreio), do consumo de alimentos crus contaminados ou alimentos insuficientemente cozinhados e/ou alimentos que se contaminaram pelo contacto com superfícies do ambiente de produção alimentar ou a partir de manipuladores infetados.

Em comparação com as formas vegetativas da maioria das bactérias patogénicas, os NoV e os HAV evidenciam uma estabilidade elevada, sendo mais resistentes ao calor, à refrigeração, à congelação, à desidratação, a valores de pH extremos, à luz ultravioleta, a pressão hidrostática elevada e aos agentes

desinfetantes, sobretudo em presença de matéria orgânica. Esta resistência, aliada a uma baixa dose infetante, leva a que possam persistir durante longos períodos (dias a semanas) como contaminantes de um género alimentício e com capacidade para causar doença (3, 6).

Apesar da via de transmissão pessoa a pessoa ser a mais comum, estudos de avaliação do risco efetuados pela OMS, evidenciam a existência de associações bem definidas entre alguns géneros alimentícios e as fontes de contaminação mais frequentemente associadas à transmissão de NoV e HAV por via alimentar (tabela 1).

### \_Objetivo

No sentido de contribuir para o esclarecimento de surtos de tox infeção alimentar de origem viral associados ao consumo de géneros alimentícios e incrementar a sua capacidade de resposta ao controlo e monitorização, o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) implementou em 2015 o método de deteção de Norovírus genogrupos GI e genogrupos GII e vírus da Hepatite A, de acordo com a ISO/TS 15216-2:2013 (14). Este método foi sujeito a auditoria pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), para acreditação segundo o referencial normativo ISO/IEC 17025:2005 (15), aguardando-se a emissão do Anexo técnico. Apresentam-se os dados obtidos nos ensaios realizados em 2015-2016.

Tabela 1: ⚡ Géneros alimentícios, fonte e local de contaminação mais frequentemente associados à transmissão de NoV e HAV (3, 6-13).

Géneros alimentício	Fonte de contaminação	Local de contaminação
Moluscos bivalves (ostras, amêijoas, berbigões e mexilhões)	Contaminação ambiental, a partir da contaminação por esgotos	Zonas de apanha e cultivo
Frutos e produtos hortícolas consumidos crus (frutos vermelhos e vegetais de folhas verdes)	Água de rega Fertilizantes não tratados Contacto com animais da quinta, domésticos ou selvagens Manipuladores infetados	Fase pré-colheita Fase da colheita Fase pós-colheita
Alimentos prontos para consumo	Superfícies contaminadas (contaminações cruzadas) Tratamento térmico insuficiente	Preparação Distribuição

## \_Material e métodos

Em 2015 e 2016 foram analisadas 69 amostras para pesquisa de Norovírus genogrupo GI e genogrupo GII e vírus da Hepatite A. As amostras analisadas incluíram moluscos bivalves, frutos vermelhos, vegetais e superfícies do ambiente de produção/manipulação de alimentos. As amostras de géneros alimentícios foram recolhidas em superfícies comerciais, diretamente no produtor ou no local de consumo. Algumas amostras foram analisadas no âmbito do esclarecimento de surtos de toxinfecção alimentar.

Dado que habitualmente os vírus estão presentes nas matrizes alimentares em número muito baixo e que estas podem conter substâncias que interferem com os métodos de deteção, é necessário efetuar previamente um procedimento de extração e/ou concentração das partículas virais (específico para cada matriz alimentar) para obter extratos livres das substâncias inibidoras e que vão servir de substrato para o procedimento de deteção do RNA viral. A eficiência da extração é avaliada pela contaminação das amostras com um vírus sintético de controlo (ex. vírus Mengo), com características físicas e químicas semelhantes ao vírus alvo, mas geneticamente distinto e pela sua extração em simultâneo (2, 14).

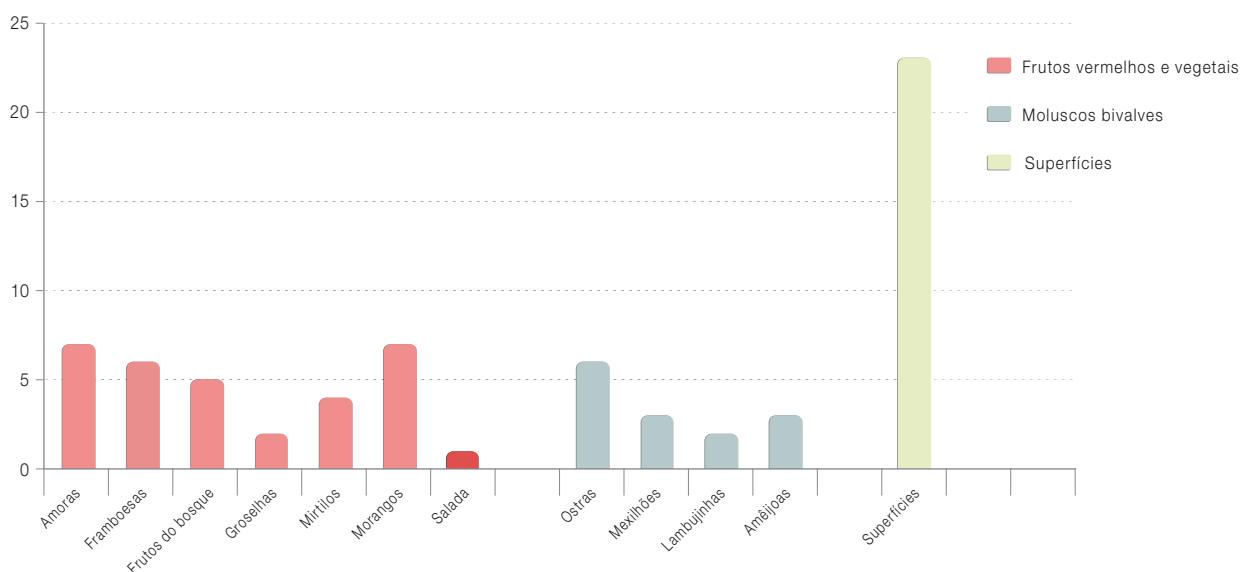
Nos frutos vermelhos e vegetais, a extração dos vírus foi efetuada por eluição com agitação, seguida de concentração por precipitação com solução de Polietilenoglicol e Cloreto de Sódio (PEG/NaCl). Nos moluscos bivalves, onde o tecido digestivo representa cerca de 1/10 do peso total do animal, a extração dos vírus das glândulas digestivas foi efetuada pela ação de digestão enzimática da proteinase K. Nas superfícies, os vírus foram removidos por esfregaço, seguido de eluição em solução tampão (2, 14).

Reação de transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real foi efetuada no equipamento *Applied 7500 Fast Real Time PCR System*.

## \_Resultados e discussão

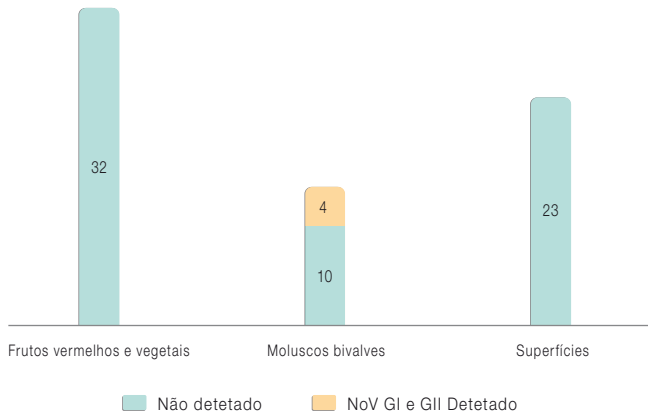
As 69 amostras analisadas incluíam: 32 frutos vermelhos/vegetais (1 amostra suspeita de estar implicada num surto de toxinfecção alimentar), 14 moluscos bivalves (2 amostras suspeitas de estarem implicadas num surto de toxinfecção alimentar) e 23 superfícies (relacionadas com a investigação de 3 surtos de toxinfecção alimentar). O total de amostras de géneros alimentícios e os tipos de matrizes analisados estão ilustrados no gráfico 1.

Gráfico 1: Amostras de géneros alimentícios (n=69) e tipos de matrizes.



artigos breves\_ n. 10

**Gráfico 2** Resultados da deteção de Norovírus GI e GII em géneros alimentícios e em esfregaços de superfícies (n=69).



Os resultados obtidos referentes à deteção de NoV GI e NoV GII, estão ilustrados no gráfico 2.

Nos moluscos bivalves foram detetados Norovírus dos grupos GI e GII em 29% das amostras (4/14), todas correspondentes a moluscos que não tinham sido depurados. Destas 4 amostras, 2 correspondiam a ostras colhidas diretamente de uma zona estuarina e 2 a amêijoas colhidas no âmbito do esclarecimento de um surto de toxinfecção alimentar. Nas amostras de frutos vermelhos e vegetais e nas de superfícies não foram detetados Norovírus GI e GII.

No total das 69 amostras analisadas não foi detetada a presença do Vírus da Hepatite A.

## Conclusões

Apesar de todos os avanços tecnológicos, concretamente a nível das indústrias do setor alimentar, o risco potencial de aquisição e consumo de determinados géneros alimentícios (molusco bivalves, frutos vermelhos e vegetais e alimentos prontos para consumo) contaminados com vírus, nomeadamente NoV e HAV, é uma realidade.

A probabilidade de contrair a infeção está dependente, entre outros, de fatores ligados ao hospedeiro, das características particulares destes microrganismos e do tipo de géneros alimentícios. Em particular, a resistência do NoV e HAV durante

longos períodos de tempo após a contaminação inicial e o modo de consumo destes alimentos (crus, após tratamento térmico ligeiro ou sem tratamento térmico final) pode contribuir para a persistência desta contaminação em alimentos prontos a comer.

Considerando que a presença de NoV e HAV é um problema emergente em saúde pública, as estratégias de controlo deverão orientar-se essencialmente para a prevenção da contaminação destes tipos de géneros alimentícios, identificando e minimizando o impacto dos diversos fatores de risco inerentes ao ambiente de produção, preparação, conservação, distribuição e consumo.

A monitorização, vigilância e controlo da presença de NoV e HAV nos géneros alimentícios e ambiente, mais frequentemente associados à sua transmissão, poderão contribuir para a verificação e validação dos sistemas de segurança alimentar implementados.

## Referências bibliográficas:

- (1) Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science. Summary Report of Joint Scientific FSA/EFSA Workshop on Foodborne Viruses. EFSA supporting publication. 2016; 13(10): EN-1103.
- (2) Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: meeting report. Rome: FAO/WHO, 2008. (Microbiological Risk Assessment Series; 13). [www.who.int/foodsafety/publications/micro/Viruses\\_in\\_food\\_MRA.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/Viruses_in_food_MRA.pdf)
- (3) Codex Alimentarius Commission. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food (CAC/GL 79-2012). Rome: FAO/WHO, 2012. [www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/)
- (4) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal 2016;14(12):4634. [www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4634](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4634)
- (5) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva: World Health Organization, 2015. [www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/)
- (6) Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Ad hoc Group on Foodborne Viral Infections: an update on viruses in the food chain. London: Food Standards Agency, 2015. [www.food.gov.uk/sites/default/files/acmsf-virus-report.pdf](http://www.food.gov.uk/sites/default/files/acmsf-virus-report.pdf)
- (7) EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on An update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. EFSA Journal 2011;9(7):2190. [www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2190](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2190)
- (8) Instituto Português do Mar e Atmosfera. Boas práticas para a produção de bivalves – Ria Formosa. Lisboa: IPMA, 2013 [www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/institucionais/ipma\\_manual.boas.praticas\\_proj.QUASUS.pdf](http://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/institucionais/ipma_manual.boas.praticas_proj.QUASUS.pdf)
- (9) Instituto Português do mar e da Atmosfera. FAQ's - Pescas: Classificação das zonas de produção de moluscos bivalves [Em linha]. [consult. 15/12/2016]. [www.ipma.pt/pt/educativa/faq/pescas/faqdetail.html?f=/pt/educativa/faq/pescas/faq\\_0008.html](http://www.ipma.pt/pt/educativa/faq/pescas/faqdetail.html?f=/pt/educativa/faq/pescas/faq_0008.html)



artigos breves\_ n. 10

- (10) Organização Mundial da Saúde; Amorim J, Novais MR, Correia MJF (trad). Cinco chaves para uma alimentação mais segura: manual. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2008. <http://repositorio.insa.pt//handle/10400.18/75>
- (11) Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Code of practice for fish and fishery products (CAC/RCP 52-2003). [www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/)
- (12) Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables (CAC/RCP 53-2003). [www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/)
- (13) EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. EFSA Journal 2012;10(1):2500. [www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2500](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2500)
- (14) ISO/TS 15216-2:2013 - Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection.
- (15) ISO/IEC 17025: 2005 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.



2016  
número  
especial 8

2ª série

www.insa.pt

artigos breves\_ n. 11

\_Segurança alimentar

## **Avaliação dos teores de patulina em sumos de fruta durante o processamento industrial**

### *Assessment of patulin contents in fruit juices through industrial processing*

Carla Martins<sup>1,2</sup>, Tânia Santos<sup>3</sup>, Inês Silva<sup>4</sup>, Carmen Pinheiro<sup>4</sup>, Paula Alvito<sup>1,2</sup>

carla.martins@insa.min-saude.pt

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

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

(3) Faculdade de Ciências de Lisboa, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(4) Sumol+Compal, Almeirim, Portugal.

#### **\_Resumo**

A patulina é uma micotoxina produzida por fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Esta toxina pode contaminar diversos tipos de fruta, nomeadamente maçãs e produtos derivados podendo estar associada à ocorrência de efeitos mutagénicos, genotóxicos, imunossupressores, imunotóxicos, neurotóxicos, e eventualmente carcinogénicos. Por essa razão é fundamental o controlo da ocorrência de patulina nos géneros alimentícios mais suscetíveis. Com o objetivo de avaliar a presença de patulina em amostras de fruta e polpa ao longo das várias etapas do processamento industrial, foram analisados os teores desta micotoxina em 50 amostras (ameixa, pêsego, pera e maçã), colhidas nas diversas fases de processamento. As amostras de pera e maçã apresentaram os teores de contaminação mais elevados, detetados na fase de descarga da fruta ( $18 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) e na fase de enchimento ( $40 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ), respetivamente. Estes resultados são inferiores ao limite máximo legislado ( $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) para sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos, por não existirem valores limite para a fruta e polpa. Os dados do presente estudo alertam para a necessidade de monitorizar a ocorrência de contaminantes ao longo das várias etapas de processamento industrial como forma de obter alimentos seguros, protegendo assim a saúde dos consumidores. Estes foram os primeiros estudos efetuados em Portugal sobre a ocorrência de patulina em diferentes frutas colhidas ao longo do processamento industrial.

#### **\_Abstract**

Patulin is a mycotoxin produced by fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. This toxin can contaminate several fruits, including apples and by-products, and may be associated with the occurrence of mutagenic, genotoxic, immunosuppressant, immunotoxic, neurotoxic, and possibly carcinogenic effects. Thus, it is fundamental to monitor the occurrence of patulin in more susceptible foodstuffs as fruits. This study aimed to determine the contents of patulin in 50 fruit and pulp samples (plum, peach, pear and apple), collected throughout different industrial processing stages. Pear and apple samples showed the highest contamination levels, detected in fruit discharge phase ( $18 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) and the filling stage ( $40 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ), respectively. These results are lower than the legislated maximum allowed limits ( $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) for fruit juices, concentrated fruit reconstituted and fruit nectars juices; however, there are no limits for fruit and pulp samples. The results of this study point out the need to monitor the occurrence of contaminants throughout the various stages of industrial processing, as a way to get safer food to attain a higher protection of the consumer's health. This was the first study performed in Portugal on the occurrence of patulin in fruit samples collected on the various stages of industrial processing.

#### **\_Introdução**

A patulina (PAT) é uma micotoxina produzida por espécies de fungos pertencentes aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que podem estar presentes em diversos tipos de frutas, nomeadamente maçãs e produtos derivados (1). O crescimento dos fungos e subsequente produção de patulina ocorre geralmente à superfície de fruta danificada, sendo a sua presença considerada um indicador de qualidade da matéria-prima usada no fabrico de géneros alimentícios. Os estudos experimentais de toxicidade em animais e culturas de tecidos atribuem à patulina efeitos mutagénicos, genotóxicos, imunossupressores, imunotóxicos, neurotóxicos, e eventualmente carcinogénicos (2). Torna-se assim importante o controlo da presença de patulina e, sempre que possível, a sua remoção dos géneros alimentícios, em particular de sumos e purés de frutos. Os sumos e derivados de frutos devem obedecer a boas práticas de agricultura e de fabrico impostas pelo *Codex Alimentarius* com o intuito de reduzir os níveis de patulina inicialmente presentes (3).

No processamento industrial comum inclui-se, entre outras etapas, a lavagem e seleção da fruta, descaroçamento, trituração, tratamento (como a pasteurização, concentração ou clarificação) e enchimento. A remoção da fruta danificada e a eliminação das partes apodrecidas provaram ser um fator importantíssimo que contribui para a diminuição dos níveis de patulina nos sumos e produtos derivados (4). Janotová e colaboradores (2011), num estudo em que analisaram o efeito do processamento industrial sobre a patulina em amostras de puré de maçã provenientes de 4 fases diferentes (homogeneização, lavagem, pasteurização e enchimento asséptico), verificaram que todas as fases de processamento contribuíram para a redução de patulina, sendo a lavagem a fase que apresentou o maior nível de redução (de 29 a 80% do teor original de patulina) (5).



artigos breves\_ n. 11

## \_Objetivo

O presente estudo teve como objetivo avaliar os teores de patulina em amostras de fruta e polpa, colhidas em 2011 e 2013, ao longo de diferentes fases de processamento industrial. Para a realização deste estudo foi estabelecida uma parceria com a empresa Portuguesa Sumol+Compal, localizada em Almeirim, Portugal.

## \_Material e métodos

As amostras analisadas foram cedidas pela empresa Sumol+Compal e incluíram fruta e polpa utilizadas no fabrico de sumos. Foram analisadas 50 amostras: 10 de ameixa, 16 de pêssago, 12 de pera e 12 de maçã. De cada tipo de fruta foram recolhidas amostras após as diferentes fases de processamento: descarga da fruta, 1ª e 2ª lavagem da fruta e enchimento (polpa). Para cada fruta foram recolhidos três lotes (sendo um lote equivalente a uma colheita individual aleatória nas diferentes fases de processamento) com exceção do pêssago em que se efetuaram cinco colheitas. As amostras, com aproximadamente 1 Kg cada, foram recolhidas a vácuo em sacos assépticos (enchimento asséptico – pêssago e maçã) e em sacos de amostragem de plástico (enchimento a quente – ameixa e pera), de acordo com o tipo de fruta. As condições analíticas para a determinação de PAT foram as descritas por Barreira e colaboradores (2010), utilizando uma metodologia de extração em fase sólida com determinação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência e deteção por ultravioleta (SPE-HPLC-UV) (6).

As amostras foram analisadas em duplicado e os valores médios de PAT foram expressos em  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ . A metodologia analítica apresentou um limite de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) de  $0.9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  e  $2.9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ , respetivamente, e um coeficiente de variação de 3%. As amostras com resultados iguais ou superiores ao limite de deteção foram consideradas positivas.

## \_Resultados e discussão

Relativamente às 50 amostras analisadas por SPE-HPLC-UV, 12 (24%) foram positivas, apresentando 8 (16%) valores entre o LOD e o LOQ e 4 (8%) valores superiores ou iguais ao LOQ ( $2,9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ). No caso das amostras com valores superiores ou iguais ao LOQ, três foram de pera ( $7,8 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ,  $8,4 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  e  $18 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) e uma de maçã ( $40 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) (tabela 1).

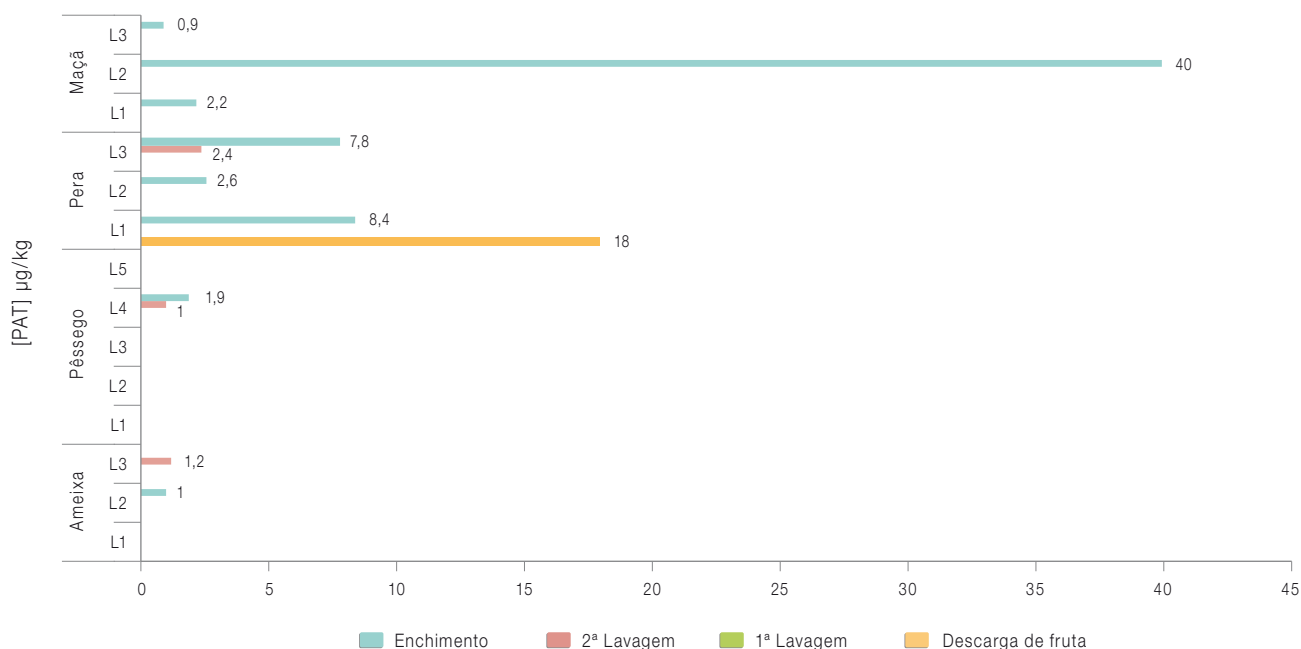
Conforme se pode verificar no gráfico 1, a fase de enchimento foi a que apresentou maior número de amostras positivas, o que poderá ser atribuído a eventuais perdas de água durante o processamento. O maior número de amostras positivas foi registado nas amostras de pera e poderá ser atribuído ao facto de este ser um fruto sensível que pode ser facilmente danificado com pequenos toques ocorridos durante o transporte. Esta poderá ser também a justificação para o facto da pera apresentar o teor de patulina mais elevado na fase de descarga de fruta ( $18 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ).

Tabela 1: Ocorrência de patulina em amostras de fruta e polpa de ameixa, pêssago, pera e maçã.

Fruta	Amostras n	Positivas n (%)	LOD - LOQ n	> LOQ n	Teores máximos PAT $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
Ameixa	10	2 (20)	2	0	1,2*
Pêssago	16	2 (6)	2	0	1,9*
Pera	12	5 (42)	2	3	18
Maçã	12	3 (25)	2	1	40
Total	50	12	8	4	

LOD – Limite de Deteção ( $0,9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ); LOQ – Limite de Quantificação ( $2,9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ); \* Inferior ao LOQ.

Gráfico 1: Ocorrência de patulina em amostras de fruta e polpa de ameixa pêsego, pera e maçã ao longo do processamento industrial (n=50).



Esta figura revela também, à semelhança do que ocorreu com outros estudos (5), a eficiência da etapa da lavagem na redução de patulina nas amostras contaminadas, como se evidencia com a redução de teores de toxina na amostra L1 de pêra que passa de 18  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , na amostra recepcionada (descarga fruta) para valores inferiores ao limite de deteção após a 1ª e 2ª lavagem. Para além da pera e maçã, as amostras de ameixa e pêsego também apresentaram contaminação por patulina o que revela a possibilidade de ocorrência em diferentes frutos.

Os teores de patulina encontrados neste estudo foram inferiores ao limite máximo legislado de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  para sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos, no entanto, as amostras analisadas correspondem a fruta e polpa, matrizes que não se encontram abrangidas pelas especificações do Regulamento (CE) nº 1881/2006 (7) pelo que não poderão ser comparadas neste âmbito. Para além dos sumos, a mesma legislação só inclui referência à contaminação por patulina em produtos à base de maçã (bebidas espirituosas, sumos e produtos sólidos) e não abrange outros frutos como a pêra, ameixa ou pêsego.

## \_Conclusões

Os dados obtidos no presente estudo permitiram concluir que a qualidade das matérias-primas, bem como o controlo dos teores de potenciais contaminantes ao longo do processo industrial, são fundamentais para a obtenção de produtos seguros.

A baixa percentagem de amostras positivas no universo amostrado (24%) e o facto de somente 8% apresentarem valores iguais ou superiores ao LOQ revela a existência de qualidade no processamento industrial.

A descarga da fruta e a fase de enchimento deverão ser etapas em que se deve efetuar a monitorização da ocorrência de patulina. Relativamente à pera, a etapa de lavagem da fruta revelou ser um ponto importante na redução de teor de patulina.

Estes dados alertam também para a necessidade de se efetuar a monitorização dos teores de patulina em frutas que não estão incluídas na legislação, uma vez que a fragilidade inerente poderá potenciar a degradação e conseqüente ocorrência de patulina.



artigos breves\_ n. 11

Estes são os primeiros estudos sobre ocorrência de paulina em amostras de diferentes frutos colhidas em diferentes fases do processamento industrial em Portugal.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 2003;16(3):497-516. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164220/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164220/)
- (2) International Programme on Chemical Safety. International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations: Patulin [Em linha] (IARC/vol. 40 (1986), p. 83). [consult.13/12/2016] [www.inchem.org/documents/iarc/vol40/patulin.html](http://www.inchem.org/documents/iarc/vol40/patulin.html)
- (3) Codex Alimentarius Commission CODEX. Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. FAO/WHO, 2003. (CA/RCP 50). [www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/)
- (4) Marín S, Mateo EM, Sanchis V, et al. Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. Food Chem. 2011;124(2): 563-8.
- (5) Janotová L, Čížková H, Pivoňka J, et al. Effect of processing of apple puree on patulin content. Food Control. 2011;22(6), 977-81.
- (6) Barreira MJ, Alvito PC, Almeida CMM. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. Food Chem. 2010;121(3):653-8.
- (7) Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006, 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>



## **Monitorização microbiológica em produtos de charcutaria cozidos, fatiados em talhos** *Microbiologic survey in sliced cooked meat products, purchased at butcheries*

Isabel Soares Sousa, Conceição Costa Bonito, Maria Manuel Toscano, Teresa Teixeira Lopes, Isabel Bastos Moura, Isabel Campos Cunha, Cláudia Pena, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau

rosa.sousa@insa.min-saude.pt

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

### **\_Resumo**

Foram monitorizados níveis microbiológicos em produtos cárneos cozidos fatiados, vendidos em 18 talhos na cidade do Porto, num total de 86 amostras. Não foram detetados microrganismos patogénicos em níveis significativos. Os resultados obtidos revelaram 13% das amostras com resultado  $>10^7$  ufc/g para a contagem de microrganismos a 30 °C, 14% (5/35) com contagem de leveduras  $>10^5$  ufc/g e 100% das amostras com contagem de *Enterobacteriaceae*  $<10^3$  ufc/g. De forma a garantir a qualidade e segurança do produto até ao momento do consumo é importante avaliar como é estabelecido, pelo operadores de retalho, o período de vida útil secundário das peças que fatiam.

### **\_Abstract**

*Microbiological evaluation of sliced cooked meat products, purchased in 18 butcheries of Porto, in a total of 86 samples, was performed. No pathogens were detected at significant levels. The results obtained revealed 13% of the samples with counts  $>10^7$  cfu/g for the enumeration of microorganisms at 30 °C, 14% (5/35) with yeasts counts  $>10^5$  cfu/g and 100% of the samples with *Enterobacteriaceae* counts  $<10^3$  cfu/g. In order to assure the quality and safety of the product until the moment of consumption it is important to evaluate how retail operators establish the secondary shelf-life of the pieces they slice.*

### **\_Introdução**

Os produtos cárneos transformados como o fiambre e afins são cada vez mais utilizados na alimentação, devido à sua fácil utilização e preparação, o que predispõe a uma grande competitividade entre as empresas agroalimentares e uma enorme variedade na oferta. Todos os operadores alimentares, incluindo os da venda a retalho, devem assegurar a qualidade dos géneros alimentícios que colocam no mercado, tendo em atenção o tempo de vida útil secundário, caso tenha havido abertura da embalagem (1-3).

### **\_Objetivo**

Monitorizar níveis de microrganismos em produtos cárneos cozidos, fatiados em talhos, nomeadamente fiambre, mortadela e fiambriño. As 86 amostras analisadas foram adquiridas em 18 talhos da cidade do Porto, em dois períodos distintos. A 1ª fase do estudo decorreu no 1º trimestre de 2015 e incidiu em 51 amostras, adquiridas entre as 7 e as 10 horas. A 2ª fase decorreu entre maio e junho de 2016, incidindo em 35 amostras colhidas entre as 12 e as 16 horas.

### **\_Material e métodos**

Os produtos de charcutaria foram adquiridos em talhos e fatiados no momento da compra. As amostras foram transportadas para o laboratório num período máximo de 30 minutos após a compra e conservadas no laboratório a  $3 \pm 2$  °C, até à realização dos ensaios, efetuados no dia da compra. Na 1ª fase do estudo, foram analisadas 51 amostras: 25 de fiambre, 24 de mortadela e 2 de fiambriño. Na 2ª fase, o número total de amostras analisadas foi de 35: 16 de fiambre, 16 de mortadela e 3 de fiambriño.

Os ensaios microbiológicos e respetivos métodos, efetuados às amostras na 1ª e 2ª fases foram: contagem de microrganismos a 30 °C (ISO 4833-1:2013), contagem de estafilococos coagulase positiva (ISO 6888-1:1999/Amd.1:2003), contagem de *Escherichia coli* (ISO 16649-2:2001) e contagem de *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004). Apenas nas amostras da 2ª fase foram realizados: contagem de bolores e leveduras a 25 °C (ISO 21527-1:2008), contagem de *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2004) e pesquisa de *Listeria monocytogenes* (VIDAS LMO2-AFNOR BIO 12/11-/03/04, com confirmação de resultados positivos pela ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004).



## Resultados

Os resultados obtidos para a contagem de microrganismos a 30 °C demonstraram que 35% das amostras analisadas apresentaram contagens  $>10^6$  unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g) e 13% apresentaram contagens  $>10^7$  ufc/g. (gráfico 1).

O resultado para a contagem de *Listeria* spp. foi  $<10$  ufc/g, em todas as amostras. A pesquisa de *L. monocytogenes* em 25g foi realizada apenas na 2ª fase, tendo sido detetada a presença deste microrganismo numa das 35 amostras. A contagem de *E. coli* foi realizada nas duas fases do estudo (n=86), tendo sido obtidos resultados inferiores ao limite de deteção (LD) (10 ufc/g) em 85 amostras e um baixo número (Presente  $<4 \times 10^1$  ufc/g), numa das amostras analisadas.

A contagem de estafilococos coagulase positiva foi efetuada em todas as amostras na 1ª fase e apenas em 17 amostras na 2ª fase. Foram detetados baixos números (Presente  $<4 \times 10^2$  ufc/g) em 13% das amostras (9/68).

Na 2ª fase foi efetuada a contagem de *Enterobacteriaceae*, obtendo-se um resultado  $<10^3$  ufc/g em 100% das amostras, 74% das quais com valores  $<10^2$  ufc/g e, destas, 34% com valores  $<10$  ufc/g. Ainda na mesma fase do estudo, efetuou-se a contagem de bolores e leveduras a 25 °C. Em 37% das amostras (13/35), obteve-se uma contagem de leveduras  $>10^4$  ufc/g e em 14% (5/35)  $>10^5$  ufc/g. Em 86% das amostras analisadas a contagem de bolores foi inferior ao LD ( $<10^2$  ufc/g), tendo sido detetados baixos números (Presente  $<4 \times 10^2$  ufc/g) em 5 amostras (gráfico 2).

Gráfico 1: Contagem de microrganismos a 30 °C (ufc/g), distribuição por classe de resultados.

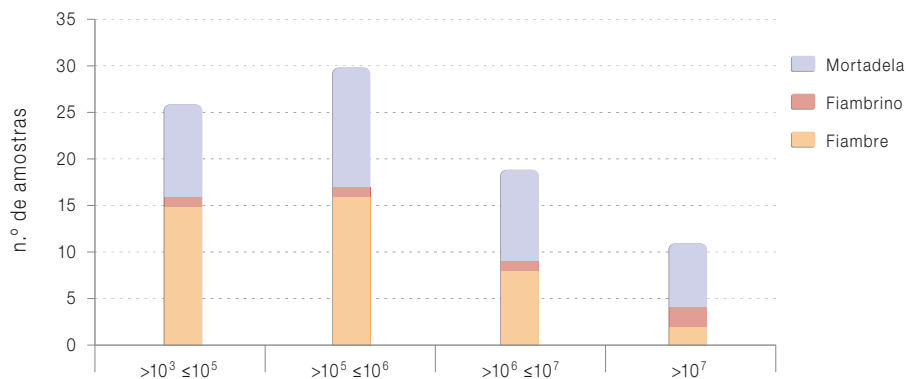
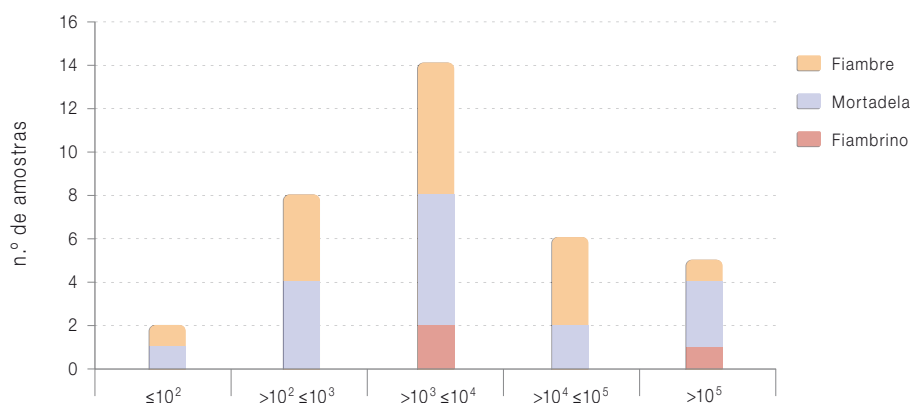


Gráfico 2: Contagem de leveduras a 25 °C (ufc/g), distribuição por classe de resultados.





## **\_Discussão e conclusão**

Não foram detetados microrganismos patogénicos em níveis significativos.

A presença de microrganismos patogénicos, ainda que em baixos números, e indicadores de deterioração elevados em 14% das amostras, torna premente o controlo do tempo de vida útil e da temperatura de conservação dos géneros alimentícios pelos operadores e pelo consumidor final **(3,4)**.

De forma a garantir a qualidade e segurança do produto até ao momento de consumo, pode ser importante avaliar como é estabelecido, pelos operadores de retalho, o período de vida útil secundário nas peças que fatiam e se há sobrestima do mesmo. Do mesmo modo, o consumidor final deve ser informado da temperatura de conservação e do período de vida útil de todos os géneros alimentícios.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. JO. 22.11.2011:L 304/18-63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (2) Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. JO. 22.12.2005:L 338/1-26. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>
- (3) Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. JO. 30.4.2004:L 139/1. <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/852/oj>
- (4) Organização Mundial da Saúde; Amorim J, Novais MR, Correia MJF (trad). Cinco chaves para uma alimentação mais segura: manual. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2008. <http://repositorio.insa.pt//handle/10400.18/75>



## **Challenge tests para avaliar o período de vida útil secundário em fiambre fatiado pré-embalado**

### *Challenge tests to evaluate secondary shelf-life of pre-packed sliced ham*

André Sousa, Conceição Costa Bonito, Isabel Sousa, Maria Manuel Toscano, Isabel Bastos Moura, Teresa Teixeira Lopes, Cláudia Pena, Isabel Campos Cunha, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau

margarida.saraiva@insa.min-saude.pt

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

#### **\_Resumo**

O período de vida útil de um género alimentício corresponde ao intervalo de tempo em que, respeitando as condições de conservação e manipulação, os atributos de segurança e qualidade do produto se mantêm. O período de vida útil secundário é o período de tempo durante o qual, após abertura da embalagem de origem, o produto se mantém conforme. Realizou-se a avaliação do período de vida útil secundário em duas marcas de fiambre fatiado pré-embalado, 1 lote da marca A e 1 lote da marca B, aplicando *Challenge Tests*, através do cálculo do potencial de crescimento ( $\delta$ ) de *Listeria* spp. em diferentes momentos do seu período de vida útil primário. Após a abertura das embalagens, os produtos foram inoculados com baixas concentrações de *Listeria* spp. ( $2 \log_{10}$  ufc/g) e conservados a uma temperatura de refrigeração abusiva,  $12 \pm 1$  °C, durante 3 dias. Aproximadamente a um mês do fim do seu período de vida útil e no fim deste, o fiambre da marca A não permitiu o crescimento de *Listeria* spp. ( $\delta < 0,5 \log_{10}$  ufc/g). Assim, para este produto, o período de vida útil secundário de três dias foi validado. Um mês antes do seu período de vida útil primário expirar, o fiambre da marca B apresentou um  $\delta > 0,5 \log_{10}$  ufc/g, 24 horas após abertura da sua embalagem, pelo que o período de vida útil secundário de três dias não é válido, se conservado a uma temperatura de refrigeração de  $12 \pm 1$  °C. As bactérias ácido-láticas representaram a flora dominante do fiambre nas duas marcas. As elevadas concentrações de bactérias ácido-láticas ( $> 7 \log_{10}$  ufc/g), no fiambre da marca A, a um mês do fim do prazo de validade e no fim do período de vida útil primário do fiambre da marca B, podem ter sido a causa da ausência de desenvolvimento de *Listeria* spp. O cumprimento da temperatura de conservação é fundamental para a manutenção da qualidade e segurança microbiológica dos géneros alimentícios, ao longo dos seus períodos de vida útil.

#### **\_Abstract**

A food product shelf-life is the period over time during which a food product maintains its safety and quality under well-defined storage and manipulation conditions. Secondary shelf-life is defined as the period after package opening during which a food product maintains an acceptable quality level. Challenge tests assessing *Listeria* spp. growth potential ( $\delta$ ) were performed on two brands of pre-packed ready-to-eat sliced ham (1 batch of brand A and 1 batch of brand B) in order to evaluate its secondary shelf-life at different stages of its primary shelf-life. After pack opening, the products were inoculated with low levels of *Listeria* spp. ( $2 \log_{10}$  cfu/g) and stored under an abusive refrigeration temperature,  $12 \pm 1$  °C, during 3 days. About a month before

the end of the shelf-life and at the end of it, the brand A sliced ham did not support the growth of *Listeria* spp. at both stages of the study ( $\delta < 0,5 \log_{10}$  cfu/g). For this product, the secondary shelf-life of 3 days was validated. One month before the primary shelf-life expires, brand B sliced ham showed a  $\delta > 0,5 \log_{10}$  cfu/g, 24 hours after pack opening. The 3 days secondary shelf-life could not be validated if stored at temperature of  $12 \pm 1$  °C. Lactic acid bacteria were the dominant microflora of the sliced ham. High numbers of lactic acid bacteria ( $> 7 \log_{10}$  cfu/g) may have been the cause for the inhibition of *Listeria* spp. growth in brand A sliced ham and in brand B sliced ham at the end of its primary shelf-life. The fulfilment of storage temperature is a fundamental condition for the maintenance of the food products microbiological quality and safety, during their shelf-life periods.

#### **\_Introdução**

O período de vida útil de um género alimentício corresponde ao intervalo de tempo em que, respeitando as condições de conservação e manipulação, os atributos físicos, químicos, microbiológicos e sensoriais do produto se mantêm (1). O período de vida útil secundário é o período de tempo durante o qual, após a abertura da embalagem de origem, o produto se mantém conforme.

Após a abertura da embalagem, alterações ambientais (atmosfera e humidade), erros de manipulação e modificação da temperatura de conservação, podem comprometer a segurança do produto, especialmente quando se trata de géneros alimentícios prontos para consumo perecíveis (2). Neste sentido, os consumidores devem ser informados das condições de conservação e do prazo de utilização dos géneros alimentícios, após a abertura das embalagens (3).

Para géneros alimentícios prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, o



Regulamento (CE) n.º 2073/2005 determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g, antes da sua colocação no mercado e o limite de 100 ufc/g durante o seu período de vida útil. Com o objetivo de garantir o cumprimento dos critérios microbiológicos de segurança ao longo de todo o período de vida útil de um género alimentício, o artigo 3º do referido regulamento prevê a realização de testes destinados a determinar a capacidade de um microrganismo alvo, devidamente inoculado, crescer ou sobreviver nesse produto em condições de armazenamento razoavelmente previsíveis – *Challenge Tests* (4).

### \_Objetivo

Avaliar o período de vida útil secundário em fiambre fatiado pré-embalado, em condições de conservação semelhantes às que o consumidor sujeita este género alimentício (5), através do cálculo do potencial de crescimento ( $\delta$ ) de *Listeria* spp., aplicando *Challenge Tests*.

### \_Materiais e métodos

Um lote de cada uma das duas diferentes marcas (A e B) de fiambre fatiado pré-embalado foi adquirido em estabelecimentos comerciais e conservado a  $3 \pm 2$  °C para realização de *Challenge Tests*: aproximadamente a um mês do fim do seu período de vida útil e no fim do mesmo.

Inicialmente, foi verificada a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g nos lotes analisados, de acordo com a ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004 (5).

Posteriormente, foram preparadas subunidades de 10 g de cada amostra. Realizou-se a contaminação de uma parte das subunidades, tendo outras, não inoculadas, constituído subunidades controlo. A contaminação das subunidades da amostra foi efetuada através da inoculação por espalhamento à superfície de 1µl de um inóculo com  $3 \log_{10}$  ufc de *Listeria* spp., constituído por 2 estirpes de *L. monocytogenes* e 1 estirpe de *L. innocua*. Os ensaios foram iniciados em 3 subunidades de cada amostra imediatamente após a inoculação (T0).

As subunidades inoculadas não analisadas foram mantidas a  $12 \pm 1$ °C, até ser realizada a contagem de *Listeria* spp. de acordo com a ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Este ensaio foi efetuado diariamente, em subunidades selecionadas, durante um período máximo de 3 dias (T1, T2, T3). Nas subunidades controlo, conservadas de forma idêntica às inoculadas, foi realizada a contagem de microrganismos totais a 30 °C (ISO 4833: 2002), bactérias ácido-láticas (ISO 15214: 1998) e bolores e leveduras (ISO 21527-1: 2008).

O potencial de crescimento microbiano ( $\delta$ ) foi calculado através da diferença entre a mediana da contagem de *Listeria* spp., no início e no fim do estudo (5).

### \_Resultados e discussão

Nas duas fases do estudo, o fiambre fatiado da marca A apresentou um  $\delta < 0,5 \log_{10}$  ufc/g de *Listeria* spp. durante o período de 3 dias de conservação (tabelas 1 e 3).

Um mês antes do período de vida útil primário expirar, o fiambre fatiado da marca B permitiu o crescimento de *Listeria* spp. ( $\delta > 0,5 \log_{10}$  ufc/g), 24h após a abertura da embalagem. Apresentou ainda contagens iniciais de microrganismos totais e bactérias ácido-láticas inferiores a  $5 \log_{10}$  ufc/g, valores inferiores aos encontrados no fiambre fatiado da marca A. No fim do seu período de vida útil, o fiambre fatiado da marca B também não apresentou crescimento de *Listeria* spp. (tabelas 2 e 3).

As subunidades controlo de ambos os fiambres, submetidas a ensaios microbiológicos a um mês do fim do período de vida útil, apresentaram um crescimento exponencial de aproximadamente  $3 \log_{10}$  ufc/g de microrganismos totais a 30 °C, bactérias ácido-láticas e leveduras, sugerindo uma taxa de deterioração rápida destes produtos, após abertura das suas embalagens (tabelas 1 e 2).



Tabela 1: Resultados dos ensaios realizados no fiambre fatiado da marca A.

Dia do ensaio (T) (após inoculação com <i>Listeria</i> spp.)	Subunidades inoculadas (n=3)*	Subunidades controlo (n=1)*			
	<i>Listeria</i> spp. (log <sub>10</sub> ufc/g)	Microrganismos totais a 30 °C (log <sub>10</sub> ufc/g)	Bactérias ácido-láticas (log <sub>10</sub> ufc/g)	Leveduras (log <sub>10</sub> ufc/g)	Bolores (log <sub>10</sub> ufc/g)
A um mês do fim do período de vida útil					
T0	2,23 ± 0,14	5,94	5,00	1,70	Presente <1,60
T1	2,25 ± 0,24	> 7	> 7	2,08	Presente <1,60
T2	2,42 ± 0,19	> 7	> 7	3,76	<1
T3	2,48 ± 0,03	8,57	8,66	4,49	<1
No fim do período de vida útil					
T0	2,54 ± 0,04	8,69	7,46	Presente <1,60	<1
T1	2,19 ± 0,16	8,69	8,04	1,90	<1
T2	2,29 ± 0,18	8,49	8,34	2,46	<1

\* n=número de subunidades analisadas.

Tabela 2: Resultados dos ensaios realizados no fiambre fatiado da marca B.

Dia do ensaio (T) (após inoculação com <i>Listeria</i> spp.)	Subunidades inoculadas (n=3)*	Subunidades controlo (n=1)*			
	<i>Listeria</i> spp. (log <sub>10</sub> ufc/g)	Microrganismos totais a 30 °C (log <sub>10</sub> ufc/g)	Bactérias ácido-láticas (log <sub>10</sub> ufc/g)	Leveduras (log <sub>10</sub> ufc/g)	Bolores (log <sub>10</sub> ufc/g)
A um mês do fim do período de vida útil					
T0	2,10 ± 0,21	4,43	3,08	Presente <1,60	<1
T1	3,01 ± 0,18	5,99	5,04	2,11	<1
T2	3,62 ± 0,26	> 7	> 7	3,69	<1
No fim do período de vida útil					
T0	2,63 ± 0,04	7,65	7,87	<1	<1
T1	2,62 ± 0,12	8,00	8,04	<1	<1
T2	2,56 ± 0,01	8,32	8,62	<1	<1

\* n=número de subunidades analisadas.

Tabela 3: Potencial de crescimento de ( $\delta$ ) *Listeria* spp.

Fase do estudo	$\delta$ <i>Listeria</i> spp. (log <sub>10</sub> ufc/g)	
	Fiambre fatiado da marca A	Fiambre fatiado da marca B
A um mês do fim do período de vida útil	0,20 <sup>a</sup>	0,91 <sup>c</sup>
No fim do período de vida útil	-0,14 <sup>b</sup>	-0,08 <sup>b</sup>

a)  $\delta$  calculado ao fim de 3 dias; b)  $\delta$  calculado ao fim de 2 dias; c)  $\delta$  calculado ao fim de 1 dia.



## \_Conclusão

Quando conservado a uma temperatura de refrigeração abusiva,  $12 \pm 1^\circ\text{C}$ , o fiambre fatiado da marca A nas duas fases do estudo apresentou um período de vida útil secundário de 3 dias, quanto ao potencial de crescimento de *Listeria* spp., válido. O período de vida útil secundário de 3 dias indicado no rótulo não é válido se conservado a  $12 \pm 1^\circ\text{C}$  para o fiambre fatiado da marca B a um mês do fim do seu período de vida útil, devendo este produto ser consumido num prazo máximo de 24 horas, após abertura da sua embalagem. No entanto, no fim do seu período de vida útil, o fiambre da marca B é seguro relativamente ao potencial de crescimento de *Listeria* spp..

As bactérias ácido-láticas representaram a flora dominante nos dois produtos. A capacidade destes microrganismos se desenvolverem numa ampla gama de temperaturas, de promoverem uma redução de pH (resultante da produção de ácido láctico) e de algumas estirpes produzirem bacteriocinas, tem sido relacionada com um efeito inibitório no desenvolvimento de microrganismos patogénicos (6). Concentrações iniciais de bactérias ácido-láticas superiores a  $7 \log_{10}$  ufc/g podem ser indicadoras de que estes produtos já se encontravam deteriorados, podendo também ser a causa da ausência de desenvolvimento de *Listeria* spp. no fiambre fatiado da marca A e no fiambre fatiado da marca B, no fim do seu período de vida útil primário.

A temperatura de conservação selecionada ( $12 \pm 1^\circ\text{C}$ ) representa uma temperatura de conservação refrigerada com abusos de temperatura, passível de ser praticada pelo consumidor (5,7). O cumprimento da temperatura de conservação,  $5^\circ\text{C}$ , indicada pelos fabricantes de ambos os fiambres deverá ser fundamental para a manutenção da sua qualidade e segurança microbiológica, ao longo do seu período de vida útil.

## Referências bibliográficas:

- (1) Man D. Shelf Life. 2nd ed. Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2015.
- (2) Nicolli MC (ed). Shelf life assessment of food. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012.
- (3) Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. JO. 22.11.2011: L 304/18-63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (4) Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. JO. 22.12.2005:L 338/1-26. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>
- (5) European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* Anses-Food Safety Laboratory. EURL Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (Version 3). Maisons-Alfort, France, 2014. <https://eurl-listeria.anses.fr/en/minisite/listeria/eurl-lm-technical-guidance-document-conducting-shelf-life-studies-listeria>
- (6) NACMCF Executive Secretariat, US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. Parameters for Determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols (adopted 20 March 2009), Washington, D.C. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. [www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/3b52f9c0-0585-4c0a-abf2-b4fc89a9668c/NACMCF\\_Inoculated\\_Pack\\_2009F.pdf?MOD=AJPERES](http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/3b52f9c0-0585-4c0a-abf2-b4fc89a9668c/NACMCF_Inoculated_Pack_2009F.pdf?MOD=AJPERES)
- (7) Azevedo I, Regalo M, Mena C, et al. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. Food Control. 2005;16:121-4.



## Tratamento de águas para consumo humano: um episódio de sobrevivência de cianobactérias

### Treatment of water for human consumption: a case of cyanobacterial survival

Carina Menezes<sup>1</sup>, Olga Martins<sup>2</sup>, Elsa Dias<sup>1</sup>

elsa.dias@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) AgdA – Águas Públicas do Alentejo, S.A.

#### \_Resumo

No verão de 2015 ocorreu um episódio de mau odor/sabor na água de abastecimento proveniente da albufeira do Roxo. Este episódio foi atribuído à presença de um *bloom* cianobacteriano que incluía espécies produtoras de compostos voláteis (geosmina, MIB). De facto, foi detetada a presença de cianobactérias na água tratada, à saída da ETA, ainda que em densidades relativamente baixas. No entanto, desconhecia-se se estes organismos mantinham a viabilidade celular e a capacidade de se desenvolver na rede de distribuição, a jusante da ETA e, desta forma, contaminar a água para consumo humano. Assim, amostras de água colhidas à saída da ETA e no Reservatório de abastecimento público foram inoculadas em meio de cultura e o crescimento celular foi seguido por microscopia ótica. Após 30 dias, verificou-se o crescimento algal, o que demonstra que algumas espécies resistiram ao tratamento na ETA e mantiveram a capacidade de se reproduzir. Curiosamente, uma dessas espécies foi o *Cylindrospermopsis raciborskii*, considerada até há pouco tempo uma espécie tropical. Irá proceder-se à caracterização molecular e toxigénica desta espécie. Atualmente está a decorrer um protocolo de colaboração entre o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e a AgdA, com o objetivo de se estudar a distribuição de cianobactérias, cianotoxinas e compostos voláteis na albufeira do Roxo.

#### \_Abstract

In the summer of 2015 an unpleasant odour/taste occurred in the water for human consumption supplied from Roxo Reservoir. This episode was attributed to the presence of a cyanobacterial bloom composed by species producing volatile compounds (geosmin, MIB). In fact, cyanobacteria were detected in treated water, at the exit of Water Treatment Plant (WTP), although at relatively low densities. However, it was unknown if these organisms maintained their viability and the growth capacity in the distribution network and, as such, to contaminate the drinking water. Thus, treated water samples collected at the WTP and at the water deposit were inoculated in culture medium and cell growth was followed by optical microscopy. Algal growth was observed 30 days after culturing, which shows that some species resisted the treatment in the WTP and maintained the capacity to reproduce. Interestingly, one of those species was *Cylindrospermopsis raciborskii*, considered until recently a tropical species. Molecular and toxigenic characterization of this species will be carried out. A collaboration protocol between INSA I.P. and AgdA, is currently being carried out with the aim of studying the distribution of cyanobacteria, cyanotoxins and volatile compounds in the Roxo reservoir.

#### \_Introdução

O desenvolvimento massivo de cianobactérias (florescências) em reservatórios de água doce superficial é um fenómeno muito comum em Portugal <sup>(1)</sup>. Trata-se de um problema de saúde pública, uma vez que é frequente a ocorrência de espécies produtoras de toxinas. As cianotoxinas predominantes são as microcistinas <sup>(1)</sup>, heptapéptidos cíclicos que induzem hepatotoxicidade aguda e que são potencialmente cancerígenos para o Homem <sup>(2)</sup>. Por outro lado, algumas espécies de cianobactérias produzem compostos orgânicos voláteis (COVs) que alteram as características organoléticas da água, uma vez que conferem um mau odor e sabor (a terra/mofo) à água. Na albufeira do Roxo ocorreu, no verão de 2015, um denso *bloom* cianobacteriano composto por uma grande diversidade de espécies. Inclusivamente, foi detetada a presença de algumas cianobactérias nas amostras de água tratada à saída da Estação de Tratamento (ETA). A água fornecida às populações abastecidas por essa albufeira apresentava um odor desagradável e a análise dos COVs (geosmina, MIB), foi positiva. As cianobactérias predominantes na albufeira (*Planktothrix* sp., *Aphanizomenon* sp. e *Cylindrospermopsis* sp.) estão descritas como produtoras desses compostos.

#### \_Objetivo

Foi objetivo do presente trabalho, determinar a viabilidade de cianobactérias sujeitas a processos de tratamento de água e avaliar a sua potencial capacidade de desenvolvimento massivo a jusante da ETA, podendo contaminar e alterar as características organoléticas da água distribuída à população.

## \_Materiais e métodos

Procedeu-se à colheita de amostras de 5 L à saída da ETA e no reservatório que serve a população afetada. As amostras foram transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), onde foram fixadas (100 mL) com uma solução de Lugol para identificação/quantificação das espécies fitoplanctónicas presentes (3). Para concentração e cultivo *in vitro* da biomassa, 100 mL de amostra foram filtrados sob vácuo ligeiro e os filtros (MF-Millipore) foram inoculados em placas de 6 poços com meio Z8 (4). Em paralelo, e porque a filtração poderia interferir com a viabilidade celular, 100 mL das amostras foram inoculados diretamente em frascos de cultura com 500 mL de meio Z8. As culturas foram mantidas em condições de temperatura e luz controladas

( $20 \pm 1$  °C;  $20 \pm 4$   $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; ciclo 14 h luz/10 h escuridão) e o crescimento algal foi seguido por microscopia ótica (Olympus CK 40) de forma a proceder-se ao isolamento/identificação das estirpes que se mantiveram viáveis.

## \_Resultados

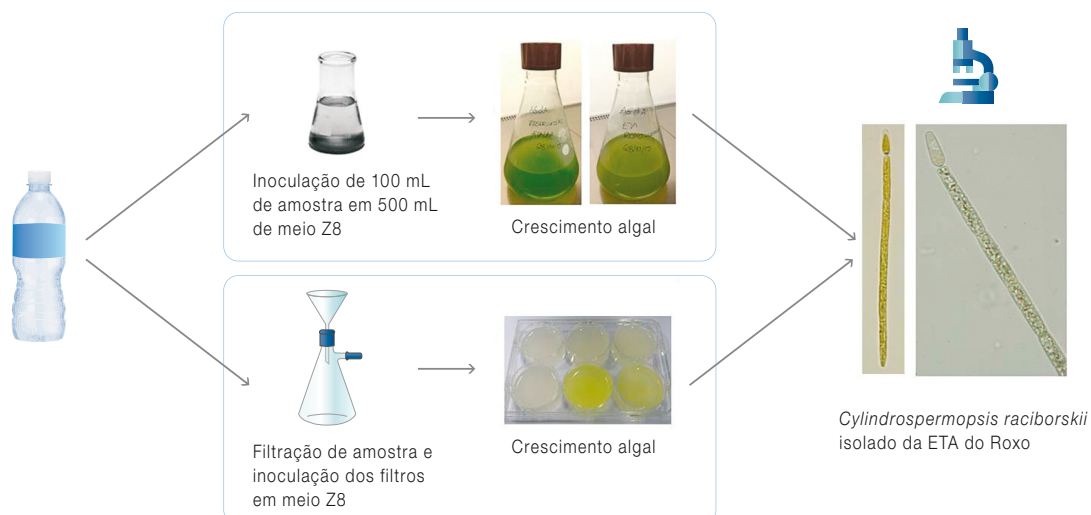
Na **tabela 1** indicam-se as espécies fitoplanctónicas presentes nas amostras fixadas com Lugol.

Cerca de 30 dias após a inoculação em meio Z8 (com ou sem filtração prévia), registou-se crescimento de diatomáceas e clorófitas nas culturas das amostras da ETA e do Reservatório (**figura 1**). Adicionalmente, observou-se o crescimento de *C. raciborskii* nas culturas da ETA (**figura 1**).

Tabela 1: ⚡ Espécies fitoplanctónicas presentes nas amostras recolhidas.

	Amostra	
	Saída da ETA	Reservatório
<b>Cianobactérias</b>		
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	1472	651
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	1042	383
<i>Aphanizomenon gracile</i>	–	579
<b>Diatomáceas</b>		
<i>Nitzschia acicularis</i>	30	13
<b>Clorófitas</b>		
<i>Scenedesmus ellipticus</i>	26	–
<b>Total</b>	<b>2570</b>	<b>1627</b>

Figura 1: ⚡ Representação das etapas realizadas para confirmação da viabilidade das cianobactérias presentes nas amostras.





## \_Discussão

O presente trabalho demonstra que alguns organismos fitoplanc-  
tónicos, designadamente cianobactérias, podem sobreviver  
aos processos de tratamento na ETA, mantendo a sua capaci-  
dade de reprodução. Este facto pode significar que a habitual  
monitorização da água bruta e da água à saída da ETA pode  
subestimar eventuais riscos, uma vez que os organismos que  
sobrevivem ao tratamento, mesmo em concentrações muito re-  
duzidas na água tratada, podem potencialmente desenvolver-  
se a jusante, nos reservatórios ou rede de distribuição, e por  
em causa a qualidade da água fornecida às populações.

A ocorrência de cianobactérias na albufeira do Roxo esteve  
associada à degradação da qualidade hídrica devido à produ-  
ção de COVs, responsáveis pela alteração das características  
organolépticas da água. Os *blooms* cianobacterianos densos e  
persistentes, como neste caso, podem interferir com a eficiên-  
cia dos tratamentos na ETA, pondo em causa a qualidade da  
água para consumo humano. O problema agrava-se quando  
as espécies cianobacterianas que resistem aos tratamentos  
são potencialmente tóxicas, podendo constituir riscos para a  
saúde pública.

A espécie *C. raciborskii* manteve-se viável após o tratamento  
na ETA, facto que constitui um motivo de preocupação em  
termos de saúde pública. Para além de poder contribuir para  
a alteração das características organolépticas da água, esta  
espécie pode produzir alguns tipos de cianotoxinas, desig-  
nadamente cilindrospermopsina (hepatotoxina potencialmen-  
te carcinogénica) (5). A legislação nacional não contempla  
qualquer limite máximo relativamente a esta cianotoxina. De  
facto, o *C. raciborskii* foi considerado até há pouco tempo  
uma espécie tropical, mas atualmente está a disseminar-se  
para regiões temperadas (6), designadamente na Europa.  
Esta disseminação tem sido associada às alterações climáti-  
cas, bem como à grande plasticidade e resistência desta es-  
pécie (6). Em Portugal, nunca foi confirmada a presença de  
*C. raciborskii* tóxico. Desta forma, estamos a proceder ao  
isolamento de estirpes a partir de amostras de água bruta  
e tratada, de forma a identificar e confirmar, com base nas  
caraterísticas morfológicas e por métodos de biologia mo-

lecular, a variação e densidade de *C. raciborskii* na albufeira,  
a sua persistência na água tratada, bem como a sua capaci-  
dade toxigénica. Caso os resultados das análises de toxinas  
sejam positivos, estamos perante a primeira descrição de *C.*  
*raciborskii* tóxico em águas doces superficiais portuguesas.

## \_Conclusão

As cianotoxinas podem ser transmitidas ao Homem através das  
águas balneares e de consumo, bem como através de alimentos  
contaminados com água de rega contendo estes compostos.  
Está a decorrer um protocolo entre o INSA e a AgdA, com o ob-  
jetivo de estudar a distribuição de cianobactérias, cianotoxinas  
e COVs na albufeira do Roxo, utilizada para abastecimento públi-  
co e irrigação. Este projeto visa identificar as zonas de maior  
risco de ocorrência destes organismos e compostos, bem como  
perceber se estas ocorrências estão relacionadas com algum  
fator físico-químico associado à albufeira e/ou algum fator clima-  
térico. Pretende-se, portanto, identificar a eventual causa destes  
*blooms* persistentes. Em particular, a albufeira do Roxo constitui  
um interessante caso de estudo relativamente à ocorrência de  
*C. raciborskii*. Espera-se que esta colaboração entre as duas  
instituições permita resolver um problema que afeta o dia-a-dia  
das populações e que pôde por em causa a saúde pública.

## Agradecimentos:

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pela bolsa SFRH/BPD/  
77981/2011 atribuída a Elsa Dias.

## Referências bibliográficas:

- (1) Vasconcelos VM. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32(3):249-54.
- (2) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2006: Lyon, France). Cyanobacterial peptide toxins. In: *Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins.* Lyon: IARC, 2010, pp. 329-412. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; 94).  
<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/mono94.pdf>
- (3) BS EN 15204:2006. Water quality. Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermoehl technique)
- (4) Skulberg R, Skulberg OM. *Forskning Med Algekulturer NIVAs Kultursampling av Alger.* Norway: NIVA, 1990.
- (5) de la Cruz AA, Hiskia A, Kaloudis T, et al. A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environ Sci Process Impacts.* 2013;15(11):1979-2003.
- (6) Antunes JT, Leão PN, Vasconcelos VM. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Front Microbiol.* 2015;6:473. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435233/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435233/)



## ficha técnica

**\_ Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_ Periodicidade:** Quadrimestral

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

**\_ Numeração:** 2ª série

Volume 5, número especial 8 2016  
Alimentação e Nutrição

**\_ 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 Infecciosas  
**Manuela Caniça**, Conselho Científico do INSA  
**Manuela Cano**, Departamento de Saúde Ambiental  
**Peter Jordan**, Departamento de Genética Humana  
**Silvia Viegas**, Departamento de Alimentação e Nutrição

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

**\_ Composição e paginação** **Francisco Tellechea**, Biblioteca da Saúde  
(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2016.

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).

**Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge**  
Av. Padre Cruz, 1649-016 **Lisboa, Portugal**

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

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

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

**www.insa.pt**