



Observações

Boletim Epidemiológico

editorial

A Saúde Ambiental no século XXI

A saúde é “um estado dinâmico de bem-estar caracterizado pelo potencial físico, mental e social que satisfaz as necessidades vitais de acordo com a idade, cultura e responsabilidade pessoal”. Se o potencial é deficiente para satisfazer essas necessidades, o estado é de doença. Esta definição permite responder, de forma pragmática e razoavelmente clara, se uma pessoa pode ser considerada saudável ou doente, contrastando com a definição da Organização Mundial de Saúde, que vigora desde 1948 e não permite tal distinção. Esta definição de saúde revela a importância da medicina preventiva, sendo compatível com a Carta de Ottawa, segundo a qual a promoção da saúde consiste no “processo que visa criar condições para que as pessoas aumentem a sua capacidade de controlar os factores determinantes da saúde, no sentido de a melhorar”.

A Saúde Ambiental, enquanto especialidade da Saúde Pública, tem por objeto de estudo a Saúde do Ser Humano, nos aspectos em que esta é influenciada por factores de risco de natureza ambiental. Juntamente com os factores genéticos, os comportamentos individuais, os estilos de vida e a qualidade dos cuidados de saúde, o Ambiente é um dos grandes determinantes da Saúde de uma população.

Estima-se que 24% do peso das doenças, em anos de vida saudáveis perdidos, e 23% de todas as mortes (mortalidade prematura) na população mundial, são atribuíveis a factores de risco contidos na matriz ambiental. Entre as crianças, no grupo dos 0-14 anos de idade, a percentagem das mortes atribuíveis aos factores ambientais é superior a 36%. A análise dos riscos no Ambiente é assim fundamental, estudando em primeiro lugar a relação entre a exposição e o efeito e calculando posteriormente os graus de exposição para uma população e para

um indivíduo, para depois relacionar essas observações com os diagnósticos das doenças efetuados no exercício da clínica médica. A prestação de cuidados de saúde deve integrar, portanto, na sua prática as relações entre o Ambiente e as doenças.

Também os locais de Trabalho podem conter factores de risco para a saúde humana, sendo necessário medi-los, intervir sobre eles, seleccionar os equipamentos mais adequados à protecção da saúde dos trabalhadores, em suma, tornar estes locais, também eles, promotores de saúde.

Os esforços para prevenir as doenças são sempre preferíveis aos esforços para as curar. Contudo, verifica-se que são sempre atribuídos orçamentos mais importantes ao tratamento da doença e muito menos recursos são disponibilizados para a sua prevenção. Para se informar e proteger convenientemente as populações, em particular as pessoas mais vulneráveis, através de uma adequada comunicação do risco, as ações preventivas têm necessariamente de se basear num diagnóstico abrangente e preciso da situação dos determinantes da Saúde.

É neste âmbito que o Departamento de Saúde Ambiental (DSA) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) desenvolve a sua atividade, trabalhando as matrizes ambientais e os factores de risco para a saúde. É o caso das águas, da qualidade do ar, designadamente o ar interior, e da Saúde Ocupacional. Há um aspecto que convém realçar e que se imbrica muito estreitamente com a atividade do DSA. O facto dos laboratórios contribuírem para a análise e o diagnóstico de situações de saúde, tal não significa que haja uma atitude de desresponsabilização por parte do público em geral e das instituições em particular, partindo de um pressuposto erróneo de que assim os problemas de saúde estão acautelados. Há que haver uma maior motivação para

primeiro lugar no nosso lar e no nosso local de Trabalho, locais onde o Ser Humano passa mais de 80 por cento do seu tempo. E estes ambientes residenciais e profissionais integram-se noutros que lhe são concêntricos – os ecossistemas urbano e rural. Não se pode enfatizar os riscos ambientais mais globais (como o efeito de estufa ou o buraco de ozono) e esquecer os riscos imediatos a que estamos expostos e que estão presentes no nosso Ambiente diário. Nesta perspectiva, o DSA cumpre o seu objetivo – com uma abordagem técnica e científica fundamenta o processo de decisão em matéria de Saúde Ambiental, designadamente contribuindo para que os poderes instituídos, desenvolvam as ações que lhes competem em termos de Saúde Ambiental. Assim, podem ser referidos quatro tipos de ações necessárias e urgentes: uma regulamentação adequada, a alocação de meios de coordenação e controlo (especificamente do controlo laboratorial), a formação e sensibilização de todas as pessoas, incluindo os governantes e realizar a consulta às populações sempre que tal se revele como necessário. Neste âmbito, há que lançar um olhar crítico sobre a contribuição das Autoridades Locais para o Bem-Estar da população. E há que manter sempre presente a seguinte interrogação: em que medida a agenda moderna dos poderes instituídos inclui a Saúde Ambiental e afeta os seus destinos?

O caminho para que o Ambiente e o local de Trabalho sejam promotores de saúde passa por se reduzirem as desigualdades, congregando a vontade política, encorajando a participação comunitária, envolvendo as Organizações Não-Governamentais e influenciando a comunidade empresarial. Este tipo de ações potencializará a atividade do INSA, possibilitando que o Departamento de Saúde Ambiental contribua também decisivamente para “*um estado dinâmico de bem-estar caracterizado pelo potencial físico, mental e social que satisfaça as necessidades vitais de acordo com a idade, cultura e responsabilidade pessoal*”.

António Tavares

Ex-Coordenador do Departamento de Saúde Ambiental do INSA,
atual Delegado de Saúde Regional de Lisboa e Vale do Tejo
e Professor da Escola Nacional de Saúde Pública

Bibliografia:

Orme J, Powell J, Taylor P, et al. Public Health for the 21st Century: new perspectives on policy, participation and practice. 2nd ed. Berkshire: Open University Press/McGraw-Hill Education, 2007. [LINK](#)

Prüss-Üstün A, Corvalán C. Preventing disease through healthy environments: towards an estimate of the environmental burden of disease. Geneva: World Health Organization, 2006. [LINK](#)

WHO Guidance to protect health from climate change through health adaptation planning. Geneva: World Health Organization, 2014. [LINK](#)

neste número

Editorial

A Saúde Ambiental no século XXI

p 01

António Tavares (Delegado de Saúde Regional de Lisboa e Vale do Tejo, Professor da Escola Nacional de Saúde Pública)

Artigos Breves

Fatores de Risco em Ambientes Hídricos

1_ Avaliação da qualidade da água de piscinas: estudo de alguns parâmetros bacteriológicos e físico-químicos

p 03

Helena Rebelo, Raquel Rodrigues, José Grossinho, Cristina Almeida, Manuela Silva, Cecília Silva, Clélia Costa

2_ Impacto das microcistinas no crescimento de bactérias aquáticas

p 06

Diana Miguéns, Daniel Salvador, Elisabete Valério

3_ Serotipos de *Salmonella enterica* em amostras ambientais, 2002-2013

p 09

Leonor Silveira, Adelaide Marques, Patrícia Conde, João Santos, Jorge Machado

4_ Parasita fúngico de cianobactérias isolado de uma albufeira portuguesa: possíveis implicações no controlo de florescências

p 12

Catarina Churro, Paulo Pereira

5_ Avaliação das vias potenciais de exposição humana num estuário contaminado: o caso do Estuário do Sado

p 15

Susana Pereira Silva, Ausenda Machado, Eleonora Paixão, Sandra Caeiro, Carlos Matias Dias

6_ Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de contaminantes de sedimentos do Estuário do Sado numa linha celular humana

p 18

Miguel Pinto, Pedro Manuel Costa, Henriqueta Louro, Maria Helena Costa, João Lavinha, Sandra Caeiro, Maria João Silva

Qualidade do Ambiente Interior

7_ Contaminação do ambiente interior de creches e jardins-de-infância por ácaros do pó doméstico: estudo ENVIRH

p 22

Manuela Cano, Susana Azevedo, Fátima Aguiar, Ana Sofia Mendes, Nuno Rosa

8_ O impacto do ambiente interior na saúde respiratória dos idosos: resultados preliminares do projeto GERIA

p 27

Ana Mendes, Ana Luísa Papoila, Pedro Martins, Iolanda Caires, Teresa Palmeiro, Livia Aguiar, Cristiana Pereira, Paula Neves, Amália Botelho, Nuno Neuparth, João Paulo Teixeira

Exposição Profissional a Agentes Químicos

9_ Estudo do potencial genotóxico do formaldeído em contexto profissional: projeto GenFA

p 32

Solange Costa, Carla Costa, Patrícia Coelho, Susana Silva, Livia Aguiar, Beatriz Porto, João Paulo Teixeira

10_ Avaliação de dano genético em agricultores: agricultura biológica e tradicional

p 36

Carla Costa, Susana Silva, Solange Costa, João Paulo Teixeira

Toxicidade de Nanomateriais

11_ Avaliação integrada dos efeitos genotóxicos de nanomateriais manufacturados no ratinho transgénico LacZ

p 39

Henriqueta Louro, Ana Tavares, Nádia Vital, Pedro M Costa, Elsa Alverca, João Lavinha, Maria João Silva

12_ Avaliação *in vitro* da neurotoxicidade de nanopartículas de magnetite revestidas por sílica

p 42

Carla Costa, Fátima Brandão, Gözde Kiliç, Natalia Fernández-Bertólez, M João Bessa, Solange Costa, Vanessa Valdiglesias, Blanca Laffon, João Paulo Teixeira

Segurança Alimentar

13_ Ocorrência e avaliação da exposição a mercúrio total em alimentos para crianças em Portugal

p 45

Carla Martins, Elsa Vasco, Eleonora Paixão, Paula Alvito

14_ A cultura *in vitro* tem impacto nas diferenças encontradas entre os alimentos transgénicos e seus controlos

p 48

Cátia Fonseca, Sébastien Planchon, Tânia Serra, Subhash Chander, Nelson JM Saibo, Jenny Renaut, M Margarida Oliveira, Rita Batista

Notícias

4º Congresso Ibérico de Cianotoxinas – Lisboa, 8-10 julho 2015

p 53

INSA disponibiliza modelo de relatório para uniformização de metodologias face à presença de materiais contendo amianto em edifícios

p 53

Avaliação da qualidade da água de piscinas: estudo de alguns parâmetros bacteriológicos e físico-químicos

Helena Rebelo, Raquel Rodrigues, José Grossinho,
Cristina Almeida, Manuela Silva, Cecília Silva, Clélia Costa

helenarebelo@insa.min-saude.pt

Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

Introdução

A água das piscinas pode estar na origem de algumas doenças, nomeadamente, otites, conjuntivites, faringites, dermatoses e irritação da pele e mucosas, pelo que é essencial garantir a sua qualidade química e microbiológica.

Os principais fatores relacionados com uma deficiente qualidade da água prendem-se com uma desinfeção inadequada, temperatura elevada (no caso das piscinas cobertas), insuficiente renovação da água e/ou sobre utilização. A contaminação microbiológica tem fundamentalmente origem humana enquanto a contaminação química tem origem nos produtos utilizados no tratamento, em particular nos desinfetantes.

Em Portugal não existe legislação específica que regulamente a qualidade da água de piscinas de uso público, constituindo os únicos referenciais o Decreto Regulamentar nº 5/97 de 31 de março, do Ministério do Equipamento, do Planeamento e da Administração do Território (1) que regula as condições técnicas e de segurança dos recintos com diversões aquáticas e a Circular Normativa nº 14/DA, de 21/08/2009 da Direção-Geral da Saúde (DGS) (2) que estabelece o programa de vigilância sanitária de piscinas.

Objetivo

Com este estudo pretendeu-se caracterizar a qualidade físico-química e bacteriológica da água de piscinas cobertas de utilização pública com vista a reunir informação relevante para uma adequada gestão do risco para a saúde dos utilizadores através da implementação de medidas corretivas para melhoria/proteção da qualidade da água.

Materiais e métodos

Este trabalho foi realizado a partir de um total de 2068 amostras provenientes de 148 tanques cobertos de utilização pública, localizados em vários concelhos do distrito de Lisboa, durante os anos de 2011 a 2013 e analisadas na Unidade de Água e Solo do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) em Lisboa.

Os parâmetros analíticos efetuados foram, na análise físico-química, pH, desinfetante residual (cloro ou bromo), condutividade elétrica, turvação, cloretos e carbono orgânico total (COT) ou oxidabilidade, e na análise bacteriológica, coliformes totais, *E. coli*, Enterococos, estafilococos totais e produtores de coagulase, microrganismos cultiváveis a 37°C e *Pseudomonas aeruginosa*.

Resultados

Verifica-se que na generalidade das amostras os resultados analíticos estão de acordo com os requisitos de qualidade definidos na Circular Normativa nº 14/DA, de 21/08/2009 da DGS para os parâmetros: desinfetante residual (96%), considerando o intervalo de pH entre 6,9 e 8,0; turvação (~100%); pH (92%); condutividade elétrica (82%); cloretos (89%); oxidabilidade (93%); coliformes totais (98%); *E. coli* (98%); estafilococos totais e produtores de coagulase (89% e 96% respetivamente); *Pseudomonas aeruginosa* (93%); enterococos (97%) e microrganismos cultiváveis a 37°C em 24h (95%) (tabela 1).

Observa-se também, com exceção da turvação e pH, uma grande amplitude e variabilidade de resultados o que reflete variações nas características físico-químicas das águas de alimentação dos vários tanques estudados, mas sobretudo, variações resultantes da deterioração da qualidade da água em função da sua utilização, particularmente ao nível dos valores de condutividade e cloretos. Esta afirmação é corroborada pelo teor de COT que, de todos os parâmetros, é o que apresenta maior percentagem de inconformidades (29%).

De referir que para o cálculo da média e desvio padrão, os resultados bacteriológicos >80 e >300 foram considerados respetivamente de 81 e 301 o que naturalmente fez encurtar estes valores. Na possibilidade de dispormos de valores reais para estes parâmetros, a média e o DV seriam seguramente mais elevados (tabela 1).

Tabela 1: Avaliação geral dos resultados obtidos por parâmetro analítico, de acordo com a Circular Normativa nº 14/DA da DGS.

| | N | Amplitude | Média | Desvio Padrão | VI | Incumprimentos (%) |
|---|------|-------------|-------|---------------|--------------------|--------------------|
| Desinfetante residual (mg/L) | 1959 | < 0,1 - 24 | 1,3 | 1,1 | 0,5 - 2 | 4 |
| Turvação (UNT) | 1522 | < 0,5 - 8,7 | 0,6 | 0,3 | ≤ 4 | ~ 0 |
| pH | 1966 | 6,4 - 8,4 | 7,4 | 0,3 | 6,9 - 8,0 | 8 |
| Condutividade (µS/cm) | 1108 | 64 - 9300 | 1192 | 1299 | ≤ 1500 | 18 |
| Cloretos (mg/L) | 861 | 15 - 2983 | 274 | 347 | ≤ 500 | 11 |
| Oxidabilidade (mg O ₂ /L) | 582 | < 0,8 - 14 | 3,0 | 1,8 | ≤ 6 | 7 |
| COT | 520 | < 3 - 48 | 5,7 | 4,6 | ≤ 6 | 29 |
| Coliformes totais | 2067 | 0 - > 80 | 0,9 | 7,1 | ≤ 10 ¹ | 2 |
| <i>E. coli</i> | 2064 | 0 - > 80 | 0,3 | 3,8 | 0 ¹ | 2 |
| Estafilococos totais | 2068 | 0 - > 80 | 8,2 | 20 | ≤ 20 ² | 11 |
| Estafilococos coagulase + | 2067 | 0 - > 80 | 0,7 | 6,6 | 0 ¹ | 4 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2067 | 0 - > 80 | 1,8 | 11 | 0 ¹ | 7 |
| Enterococos | 2066 | 0 - > 80 | 0,5 | 7,8 | 0 ¹ | 3 |
| Microrganismos cultiváveis a 37°C (24h) | 2036 | 0 - > 300 | 16 | 58 | ≤ 100 ¹ | 5 |

COT – Carbono Orgânico total; VI - Valor indicativo, ¹ Valor limite, ² Valor recomendado (Circular Normativa nº 14/DA da DGS)

O estudo da distribuição do número de Estafilococos, *Pseudomonas aeruginosa* e Microrganismos cultiváveis a 37°C em função do teor de cloro revela não existir uma correlação entre estas duas variáveis ($R^2 < 0,05$). Contudo, observa-se que a partir de 2,0 mg/L

de desinfetante residual, o número destes microrganismos decresce acentuadamente tendendo para zero quando o teor de desinfetante é de 3 mg/L (gráficos 1-3).

Gráfico 1: Distribuição do número de Estafilococos em função do teor de desinfetante residual.

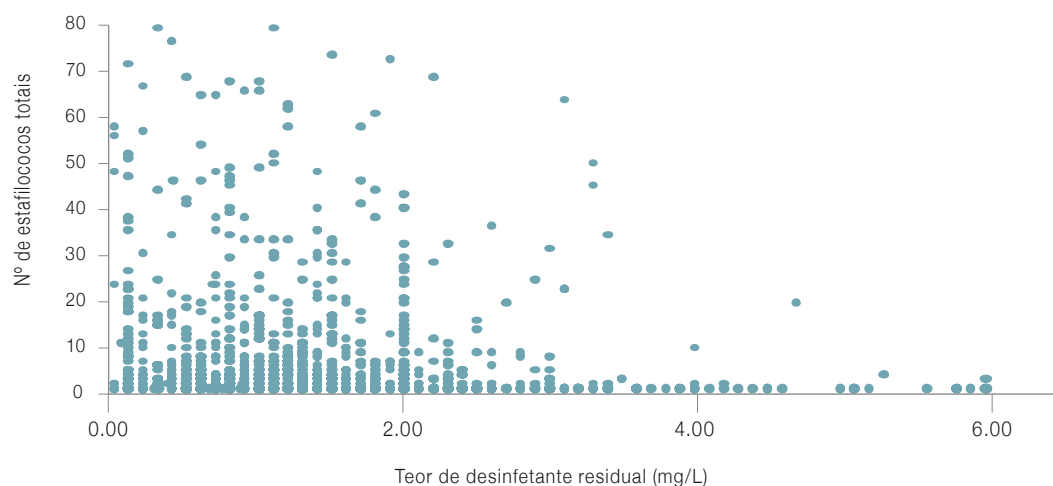


Gráfico 2: ▾ Distribuição do número de *Pseudomonas aeruginosa* em função do teor de desinfetante residual.

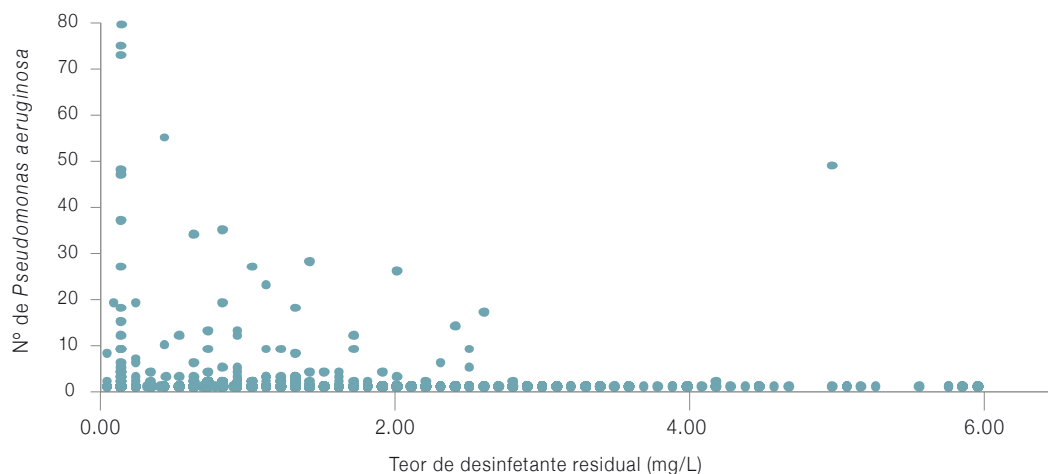
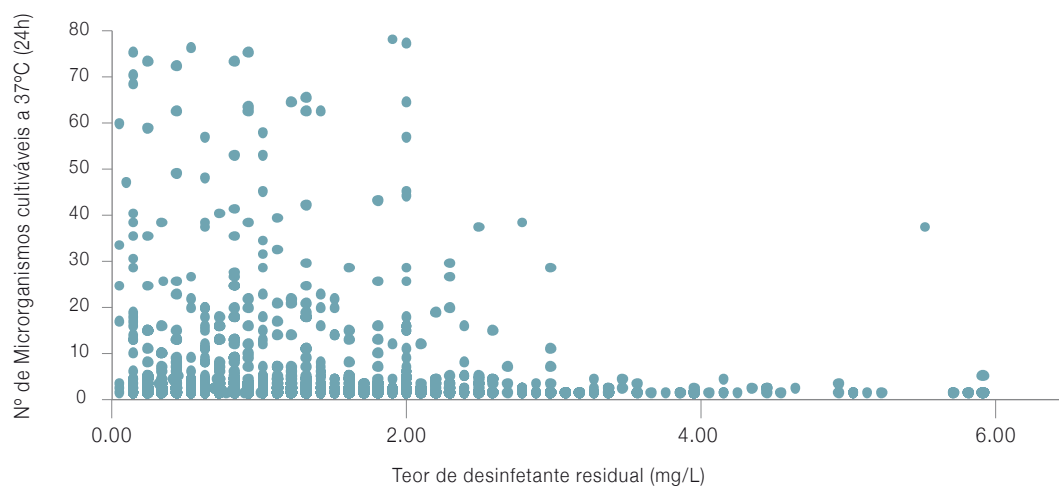


Gráfico 3: ▾ Distribuição do número de Microrganismos cultiváveis a 37°C (24 h) em função do teor de desinfetante residual.



Conclusões

Embora em número reduzido, foram identificadas neste estudo algumas amostras de água de piscina com deficiente qualidade o que se poderá traduzir em risco potencial para a saúde dos utilizadores. O controlo da deterioração da qualidade destas águas depende fundamentalmente de uma gestão adequada que combine desinfecção e renovação da água ajustadas ao número de utilizadores.

A fim de assegurar a qualidade microbiológica da água, realça-se a necessidade de garantir os teores adequados de desinfetante residual, de manter os valores de pH preferencialmente entre 6,9 e 7,4 a fim de proporcionar maior eficácia da desinfecção e de implementar um conjunto de boas práticas por parte dos utilizadores como sejam o duche antes de entrar na piscina.

O desinfetante de uso mais generalizado é o cloro, embora possam também ser utilizados o bromo, o dióxido de cloro e o peróxido de hidrogénio associado a iões de prata e cobre. O ozono e a radiação ultravioleta também podem ser utilizados como adjuvantes da desinfecção com um composto oxidante (cloro ou bromo) (3).

Referências bibliográficas:

- (1) Ministério do Equipamento, do Planeamento e da Administração do Território. Decreto Regulamentar nº 5/97, 31 de março. DR, 1ª Série B, nº 75: 1397-1422. Regulamento das Condições Técnicas e de Segurança dos Recintos com Diversões Aquáticas. [LINK](#)
- (2) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa nº 14/DA, de 21/08/2009. Programa de Vigilância Sanitária de Piscinas. [LINK](#)
- (3) World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 2, Swimming pools and similar environments. Geneva: WHO, 2006. [LINK](#)



Impacto das microcistinas no crescimento de bactérias aquáticas

Diana Miguéns, Daniel Salvador, Elisabete Valério

elisabete.valerio@insa.min-saude.pt

Unidade de Água e Solo. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

Introdução

As cianobactérias são organismos ubíquos, existindo principalmente em ambiente aquáticos, onde geralmente coocorrem com outros microrganismos, como bactérias heterotróficas (1). Em condições favoráveis de luz e nutrientes, as cianobactérias podem crescer rapidamente e atingir populações com elevadas densidades celulares designadas por florescências ou *blooms* (2). Estes fenómenos estão frequentemente associados à produção de toxinas causando assim problemas ecológicos, económicos e de saúde pública. As microcistinas (MC) são o tipo de hepatotoxinas mais abundantemente produzidas pelas cianobactérias. Existem cerca de 80 variantes destas toxinas, sendo a microcistina-LR, -RR e -YR as mais comuns.

Alguns estudos mostraram que muitas espécies de cianobactérias formadoras de *blooms* preferem crescer na presença de outras bactérias (3). Além disso, Giaramida *et al.* (1) relataram que a exposição à microcistina tem contribuído significativamente para a definição da estrutura das comunidades bacterianas e fisiologia microbiana dos corpos de água estudados. Isso atribui um papel de relevo às cianobactérias tóxicas no controlo da diversidade fitoplanctónica e abundância das espécies microbianas. Por outro lado, existem bactérias capazes de degradar as cianotoxinas, como por exemplo a microcistina (1, 3), tendo já sido levantada a hipótese de que a presença de bactérias heterotróficas na água pode desempenhar um papel importante na limpeza natural dessas hepatotoxinas quimicamente estáveis (3). Apesar destas evidências, o verdadeiro papel de cianobactérias e suas interações com bactérias heterotróficas ainda é pouco conhecido.

Objetivos

Por forma a colmatar o desconhecimento que existe relativamente ao impacto das microcistinas em bactérias heterotróficas de

água doce, pretendeu-se neste trabalho isolar algumas bactérias de água doce, algumas coexistindo com cianobactérias tóxicas. Após a confirmação da identificação de isolados, estas bactérias foram expostas a três concentrações diferentes de cada uma de três variantes (MC-LR, -RR, -YR) e o efeito sobre as suas curvas de crescimento foi avaliado.

Materiais e métodos

Amostragem

As amostragens decorreram primeiramente na Albufeira de Matos, Açude de Monte da Barca e Albufeira de Patudos, onde se observam frequentemente *blooms* de cianobactérias. A segunda amostragem foi feita na Albufeira de Castelo de Bode, um reservatório onde geralmente não ocorrem *blooms* de cianobactérias. As amostras foram recolhidas em frascos esterilizados de 1 L e transportadas numa mala térmica refrigerada, no escuro.

Isolamento de bactérias

As bactérias foram isoladas através do espalhamento de 100 µL das amostras de água de cada reservatório, usando esferas de vidro esterilizadas, em meio não seletivo Reasoner'2A (R2A). Todas as placas inoculadas foram incubadas a 20 ± 2°C no escuro, para impedir o crescimento de cianobactérias, durante quatro dias. Após este período, selecionaram-se duas a três colónias individualizadas diferentes que foram purificadas em meio Nutriente Agar (NA).

Caracterização e identificação dos isolados

A forma bacteriana foi avaliada microscopicamente, e os isolados classificados de acordo com o seu grupo Gram. Para identificar molecularmente os isolados, amplificou-se o gene do rRNA 16S, por PCR usando *primers* universais: 104F e 907R (4) ou o par 8F e 1492R (5). Os produtos de PCR foram purificados e enviados para sequenciar, em ambas as direções, na unidade UTI-INSA.

Crescimento bacteriano

As bactérias isoladas foram expostas a três concentrações diferentes de cada variante da MC (MCLR e MCRR: 1 nM, 10 nM e 1000 nM; MCYR: 1 nM, 10 nM e 300 nM), e os efeitos nas curvas de crescimento bacteriano foram avaliados em microplacas de 96 poços. As concentrações escolhidas situam-se em valores próximos dos normalmente encontrados em ambientes naturais.

_ Resultados e discussão

Tem-se pesquisado intensamente qual o impacto das microcistinas em animais e plantas, no entanto o seu impacto em bactérias, que coabitam com cianobactérias de água doce encontra-se ainda por esclarecer.

Neste trabalho avaliou-se o impacto de três variantes da MC (-LR, -RR, -YR) no crescimento de bactérias heterotróficas isoladas em três albufeiras portuguesas, onde frequentemente se observam *blooms* de cianobactérias, algumas produtoras de MC, assim como em bactérias isoladas de uma albufeira onde estes fenómenos geralmente não acontecem.

Primeiramente procedeu-se à caracterização morfológica das bactérias isoladas e à determinação do seu tipo de coloração Gram (figura 1).

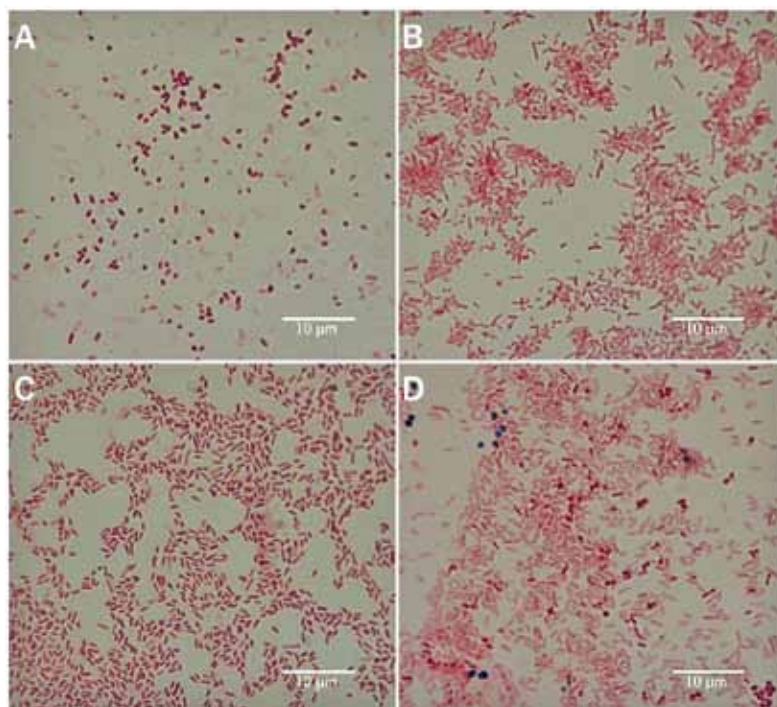
Os isolados foram de seguida identificados pelo seu posicionamento filogenético construído com base no gene rRNA 16S. Os isolados distribuíram-se por três filós: Firmicutes (*Bacillus*

sp.), β - proteobacteria (*Vogesella indigofera*), e γ - proteobacteria (*Raoultella terrigena*, *Aeromonas hydrophila*, e *Shewanella putrefaciens*). A diversidade e o tipo de bactérias heterotróficas isoladas neste estudo está de acordo com o que já foi descrito anteriormente, em habitats onde estas bactérias coabitam com cianobactérias (3,6,7).

De seguida, os isolados foram expostos a três concentrações diferentes de cada variante da MC, e os efeitos nas curvas de crescimento bacteriano foram avaliados (tabela 1). Verificou-se que as MC podem reduzir o crescimento da maioria das seis bactérias testadas (B6, P1 e P6), sendo que algumas bactérias cresceram sem efeito algum induzido (C4), enquanto outras reagiram de forma diferente consoante a variante e a concentração usada no mesmo isolado (M1 e M5).

Em relação às curvas de crescimento dos seis isolados testados, estas só apresentaram diferenças significativas entre as células expostas às microcistinas e as células controlo no final da fase exponencial/início da fase estacionária. Contudo, observou-

Figura 1: Imagens representativas dos isolados testados.



(A) *Aeromonas hydrophila* B6; (B) *Bacillus* sp. M1; (C) *Shewanella putrefaciens* P6; (D) *Vogesella indigofera* C4 (são visíveis os grãos de indigotina).

Tabela 1: Alterações observadas na fase final da curva de crescimento bacteriano, na presença de microcistinas, relativamente ao controlo.

| | <i>Aeromonas hydrophyla</i> B6 | <i>Bacillus sp.</i> M1 | <i>Aeromonas hydrophyla</i> M5 | <i>Raoultella terrigena</i> P1 | <i>Shewanella putrefaciens</i> P6 | <i>Vogesella indigofera</i> C4 |
|--------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| | % | % | % | % | % | % |
| 1 nM MCLR | -9,5* | -3,4* | -6,8 | -4,9* | -6,3* | 0 |
| 10 nM MCLR | -7,4* | -5,3* | -8,7 | -4,4* | -7,4* | 0 |
| 1000 nM MCLR | -6,5* | -2,0* | -3,1 | -5,1* | -6,8* | 0 |
| 1 nM MCRR | -6,1* | -2,0 | -11,1* | -5,5* | -6,5* | 0 |
| 10 nM MCRR | -7,1* | -1,4 | -12,5* | -5,8* | -4,9* | 0 |
| 1000 nM MCRR | -6,7* | -5,1 | -6,8* | -4,3* | -4,7* | 0 |
| 1 nM MCYR | -8,1* | -3,4* | -8,8 | -5,2* | -6,2* | 0 |
| 10 nM MCYR | -8,3* | -4,1* | -11,3 | -7,5* | -8,2* | 0 |
| 300 nM MCYR | -6,2* | -3,1* | 1,6 | -3,7* | 1,1 | 0 |

* Significativamente diferente do controlo ($P < 0,05$).

-se maioritariamente uma diminuição do crescimento bacteriano. Não foi observada uma inibição como descrito por Yang *et al.* (8) quando expuseram *Escherichia coli* a 1000 e 5000 nM de MCRR. Porém, as concentrações de toxinas usadas neste estudo, foram mais próximas das concentrações inferiores testadas por Yang *et al.* (8), em que não observaram um efeito marcado da exposição da *E.coli* a MCRR. A inibição do crescimento bacteriano pelas MCs está de acordo com o que Giaramida *et al.* (1) sugeriram, em que as cianobactérias produtoras de microcistinas aparentam ter um papel no controlo da população de bactérias heterotróficas nos corpos de água doce.

O isolado de *Vogesella indigofera*, isolado a partir da albufeira onde geralmente não se observam blooms, não sofreu qualquer tipo de efeito na presença de cada uma das três variantes de MC (tabela 1). Perante este comportamento coloca-se a hipótese de que este isolado possa ser capaz de degradar as MC e por isso não manifestar nenhum efeito no seu crescimento na presença das mesmas.

Conclusões

Este estudo mostrou que as microcistinas-LR, -RR e YR podem induzir uma redução no crescimento dum grupo diversificado de

bactérias heterotróficas, não patogénicas, isoladas a partir de albufeiras. Este impacto induzido pelas microcistinas pode levar ao desequilíbrio da comunidade microbiana existente nos corpos de água doce, o que pode ter implicações ambientais e na qualidade da água para uso recreativo.

Referências bibliográficas:

- (1) Giaramida L, Managed PM, Edwards C, et al. Bacterial communities response to microcystins exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2013; 84:111-17.
- (2) Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;203(3):264-72. Review.
- (3) Berg KA, Lyra C, Sivonen K, et al. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J.* 2009;3(3):314-25. Epub 2008 Nov 20.
- (4) Chaves S. Diversidade de procaríotas sulfato-redutores e desnitrificantes em amostras ambientais. [SI, s.n.], 2005. Tese de doutoramento-Universidade de Lisboa.
- (5) Turner S, Pryer KM, Miao VP, et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol.* 1999;46(4):327-38.
- (6) Parveen B, Ravet V, Djediat C, et al. Bacterial communities associated with Microcystis colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(5):716-24.
- (7) Eiler A, Bertilsson S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol.* 2004;6(12):1228-43.
- (8) Yang CY, Xia C, Zhou SW, et al. The permeability effect of microcystin-RR on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Chin. Sci. Bull.* 2010;55(18):1894-98.



Serotipos de *Salmonella enterica* em amostras ambientais, 2002-2013

Leonor Silveira, Adelaide Marques, Patrícia Conde,
João Santos, Jorge Machado

jorge.machado@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

As infeções por *Salmonella* spp. constituem um problema de saúde pública com impacto económico significativo em todo o mundo. O género *Salmonella* inclui duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Ao contrário da espécie *S. bongori*, a espécie *S. enterica* apresenta seis subespécies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (1).

Como qualquer enterobactéria, a transmissão de *Salmonella* é feita através da via oral-fecal. O seu aparecimento no meio ambiente está direta e indiretamente associado à contaminação por fezes humanas ou animais infetadas, permitindo a entrada na cadeia alimentar, através do consumo água contaminada ou da sua utilização na produção alimentar, designadamente na irrigação de vegetais (1).

Apesar de a origem mais comum das salmoneloses humanas ser alimentar, também é possível contrair uma infeção através do consumo de água contaminada ou pelo contacto com superfícies contaminadas. A presença de *Salmonella* no ambiente deve-se à sua enorme resistência e capacidade de formação de biofilmes. Contudo, os procedimentos atuais de desinfecção do meio ambiente são bastante eficazes na sua eliminação, sendo prova disso a baixa frequência de casos de febre tifóide em países desenvolvidos (1).

O Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), recebe várias estirpes isoladas a nível ambiental, sendo a principal origem amostras de água de diferentes proveniências.

Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever os serotipos de *Salmonella enterica* provenientes de amostras ambientais, que foram identificados no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do INSA entre 2002 e 2013.

Métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos serotipos de *Salmonella enterica* isolados a partir de amostras ambientais e caracterizados no INSA entre 2002 e 2013, conforme apresentado na tabela 1. Os serotipos foram determinados de acordo com o esquema de classificação Kauffmann-White-de Minor (2).

Tabela 1: Tipo e número de amostras ambientais analisadas, 2002-2013.

| Tipo de amostra | Nº de amostras |
|--------------------------|----------------|
| Água de zona balnear | 172 |
| Água superficial | 105 |
| Água de piscina | 14 |
| Água para consumo humano | 9 |
| Superfície | 9 |
| Desconhecida* | 111 |
| Total | 420 |

* Informação não facultada ao INSA aquando do envio das estirpes.

Resultados

Entre 2002 e 2013 foram serotipadas 420 estirpes de *Salmonella enterica* isoladas a partir de amostras ambientais, 347 (82,6%) das quais pertenciam à subespécie *enterica*, 46 (11,0%) à subespécie *salamae*, 24 (5,7%) à subespécie *diarizonae*, 2 (0,5%) à subespécie *arizonae* e 1 (0,2%) à subespécie *houtenae* (tabela 2).

Foram detetados 143 serotipos na totalidade, dos quais 44 (30,8%; 44/143) foram também identificados em casos humanos no mesmo período de tempo (3, 4) (tabela 2).

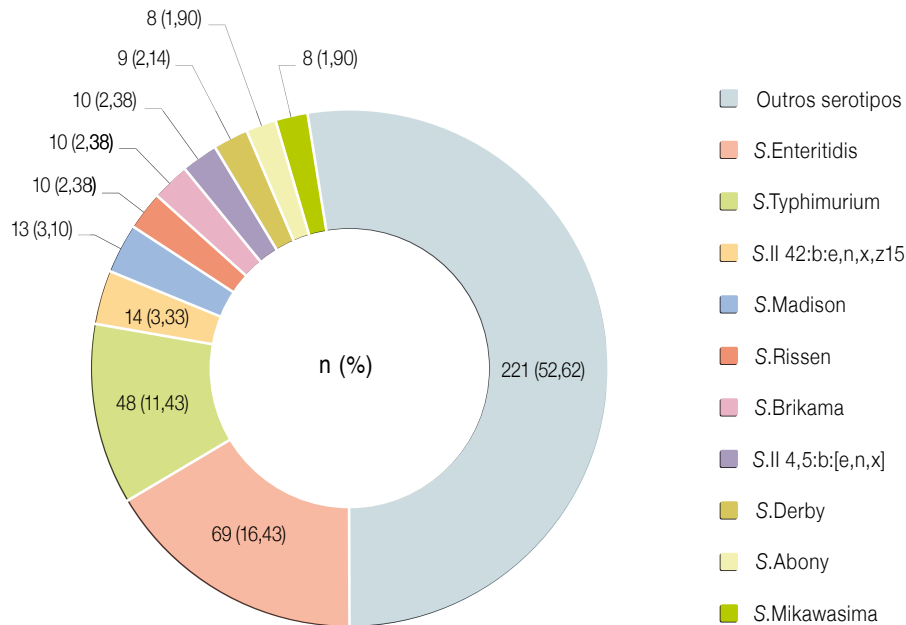
Tabela 2: Subtipos e serotipos de *Salmonella enterica* identificados nas amostras ambientais, 2002-2013.

| enterica | | | | | | salamae | | diarizonae | | | |
|---------------|----|------------------|---|--------------------|---|---------------|---|-------------------------|----|-----------------------|---|
| Serotipo | n | Serotipo | n | Serotipo | n | Serotipo | n | Serotipo | n | | |
| S.Enteritidis | 69 | S.Miami | 2 | S.Moers | 1 | S.Abogame | 1 | S.II 42:b:e,n,x,z15 | 14 | S.IIIb 38:l,v,z | 4 |
| S.Typhimurium | 48 | S.Enugu | 2 | S.Cerro | 1 | S.Elomrane | 1 | S.II 4,5:b:[e,n,x] | 10 | S.IIIb 61:(k):z53 | 2 |
| S.Madison | 13 | S.Virchow | 2 | S.Bordeaux | 1 | S.Inverness | 1 | S.II 17:e,n,x,z15:1,5,7 | 2 | S.IIIb 42:r:z53 | 2 |
| S.Rissen | 10 | S.Brive | 2 | S.Eppendorf | 1 | S.Oranienburg | 1 | S.II 17:e,n,x,z15:1,6 | 2 | S.IIIb 50:z52:1,5,7 | 2 |
| S.Brikama | 10 | S.JuKestown | 2 | S.Bovismorbificans | 1 | S.Grupensis | 1 | S.II 9,12:a:1,5 | 2 | S.IIIb 52:k:z53 | 2 |
| S.Derby | 9 | S.Eastbourne | 2 | S.Coogee | 1 | S.Reading | 1 | S.II 9,12:m,t:e,n,x | 2 | S.IIIb 35:i:e,n,x,z15 | 1 |
| S.Mikawasima | 8 | S.Fyris | 2 | S.Skansen | 1 | S.Ried | 1 | S.II 4,12:z:1,7 | 1 | S.IIIb 47:l,v:1,7 | 1 |
| S.Abony | 8 | S.Antwerpen | 2 | S.Farsta | 1 | S.Alfort | 1 | S.II 42:z10:e,n,x,z15 | 1 | S.IIIb 50:r:1,5,7 | 1 |
| S.Spartel | 7 | S.Nessziona | 2 | S.Duisburg | 1 | S.Roan | 1 | S.II 50:l,z28:z42 | 1 | S.IIIb 50:z52:z35 | 1 |
| S.Braenderup | 7 | S.Jalisco | 2 | S.Wentworth | 1 | S.Haga | 1 | S.II 41:z10:z6 | 1 | S.IIIb 57:z10:z | 1 |
| S.Infantis | 6 | S.Nottigham | 2 | S.Frederiksberg | 1 | S.Sandow | 1 | S.II 6,7:m,t:1,5 | 1 | S.IIIb 6,14:b:e,n,x | 1 |
| S.Newport | 5 | S.Barranquilla | 2 | S.Newholland | 1 | S.Kedougou | 1 | S.II 42:e,n,x:1,6 | 1 | S.IIIb 61:k:1,5 | 1 |
| S.Brandenburg | 5 | S.Saintpaul | 2 | S.Akuafu | 1 | S.Alger | 1 | S.II 1,4,12:z28:- | 1 | S.IIIb 61:l,v:1,5,7 | 1 |
| S.Ndolo | 5 | S.Montevideo | 2 | S.Richmond | 1 | S.Kimuenza | 1 | S.II 17:g,t:z39 | 1 | S.IIIb 53:k:z | 1 |
| S.Bardo | 4 | S.Schwarzengrund | 2 | S.Gatuni | 1 | S.Shangani | 1 | S.II 18:z4,z23:- | 1 | S.IIIb 53:z52:z53 | 1 |
| S.Mbandaka | 4 | S.Agama | 2 | S.Vilvoorde | 1 | S.Kisii | 1 | S.II 4,5:g,s,t:e,n,x | 1 | S.IIIb 38:l,v:z35 | 1 |
| S.Veneziana | 3 | S.Ohio | 2 | S.Agona | 1 | S.Klouto | 1 | S.II 41:z10:1,2 | 1 | S.IIIb 38:z53:- | 1 |
| S.Hadar | 3 | S.Schleissheim | 2 | S.Bulovka | 1 | S.Surat | 1 | S.II 13,22:z10:z6 | 1 | | |
| S.Goldcoast | 3 | S.Sendai | 2 | S.Mapo | 1 | S.Limete | 1 | S.II 4:l,w:e,n,x | 1 | <i>houtenae</i> | |
| S.Corvallis | 3 | S.Wagenia | 2 | S.Brazaveille | 1 | S.Tudu | 1 | S.II 42:z:z6 | 1 | Serotipo | n |
| S.Havana | 3 | S.Stanleyville | 2 | S.Haifa | 1 | S.Bareilly | 1 | | | S.IV 43:z4,z23:- | 1 |
| S.Cremieu | 3 | S.4,5:i:- | 2 | S.Battle | 1 | S.Aragua | 1 | <i>arizonae</i> | | | |
| S.Essen | 3 | S.Uppsala | 2 | S.Molesey | 1 | S.Madras | 1 | Serotipo | n | | |
| S.Newjersey | 3 | S.Boecker | 1 | S.Good | 1 | S.Malmoe | 1 | S.IIIa 48:z4,z23:- | 2 | | |
| S.Istanbul | 2 | S.Massenya | 1 | S.Muenchen | 1 | S.Virginia | 1 | | | | |
| S.Trachau | 2 | S.Pomona | 1 | S.Canada | 1 | S.Zigong | 1 | | | | |

Os dez serotipos mais comuns foram S. Enteritidis (16,4%; 69/420), S. Typhimurium (11,4%; 48/420), S. II 42:b:e,n,x,z15 (3,3%; 14/420), S. Madison (3,1%; 13/420), S. Rissen (2,4%; 10/420), S. Brikama (2,4%; 10/420), S. II 4,5:b:[e,n,x] (2,4%; 10/420), S. Derby (2,1%;

9/420), S. Abony (1,9%; 8/420) e S. Mikawasima (1,9%; 8/420). Os restantes 133 serotipos, representando 52,6% (133/420) dos isolados identificados, apresentaram frequências de isolamento inferiores a 1,7% (gráfico 1).

Gráfico 1: ▾ Frequência dos principais serotipos identificados nas amostras ambientais, 2002-2013.



_Discussão e conclusão

Entre 2002 e 2013 foi identificada *Salmonella enterica* em várias amostras ambientais, principalmente em água recreativa, salgada e doce, e também em águas de superfície (rios, rias, ribeiras, lagos e barragens). Como se desconhece se a pesquisa de presença de *Salmonella* em fontes menos comuns (piscinas, água de consumo, superfícies) é feita com a mesma frequência do que às fontes mais comuns, não se pode inferir qual a principal origem ambiental das infeções por *Salmonella* encontradas neste estudo.

De um total de 143 serotipos identificados em amostras ambientais, 44 (30,8%) foram encontrados também em casos de salmonelose humana no mesmo período de tempo, facto que não exclui a existência dos restantes serotipos em amostras de origem humana ou animal. Apesar de as subespécies *salamae*, *arizonae*, *diarizonae* e *houtenae* serem características de animais de sangue frio e do meio ambiente (1), estes serotipos também podem causar infeção em animais de sangue quente, nomeadamente em humanos, como comprovado pela identificação de dois serotipos da subespécie *salamae* em amostras de água e em doentes com gastroenterite (S. Il 4,12:z:1,7 e S. Il 42:b:e,n,x,z15).

Dos dez serotipos mais comuns observados neste estudo (gráfico 1), verificou-se que S. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Rissen e S. Abony foram dos serotipos mais frequentemente identificados em salmoneloses em humanos no período entre 2000 e 2012 (3).

Apesar da maior parte das infeções por *Salmonella* nos humanos ter origem alimentar e as medidas de controlo de infeção adotadas terem grande efetividade, a existência de fontes ambientais contaminadas não deverá ser menosprezada, uma vez que estas são uma potencial fonte de infeção humana.

Agradecimentos

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Levantesi C, Bonadonna L, Briancesco R, et al. Salmonella in surface and drinking water: occurrence and water-mediated transmission. Food Res. Int. 2012;45(2):587-602. Epub 2011 Jul 1.
- (2) Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. 9th ed. Paris: World Health Organization/Institut Pasteur. Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella France, 2007. [LINK](#)
- (3) Silveira L, Marques A, Machado J. Infeções por *Salmonella enterica* no período entre 2000-2012. Boletim Epidemiológico Observações. 2013;2(Nº especial1):14-16. [LINK](#)
- (4) Silveira L, Marques A, Santos J, et al. *Salmonella enterica*: serotipos menos frequentes com importância em patologia humana, caracterizados no INSA entre 2002-2013. Boletim Epidemiológico Observações. 2014;3(Nº especial 3):44-47. [LINK](#)



Parasita fúngico de cianobactérias isolado de uma albufeira portuguesa: possíveis implicações no controlo de florescências

Catarina Churro, Paulo Pereira

catarina.churro@insa.min-saude.pt

Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia. Unidade de Água e Solo. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

Introdução

Os parasitas fúngicos zoospóricos são ubíquos nos sistemas aquáticos e a infeção de fitoplâncton por estes fungos é um fenómeno comum em águas doces. Os fungos parasitas de fitoplâncton pertencem principalmente ao filo Chytridiomycota (quitrídeos) e distinguem-se de outros fungos por produzirem zoósporos flagelados, o que lhes confere mobilidade e particular adaptação ao meio aquático (1-3). Os quitrídeos são parasitas obrigatórios dependentes do seu hospedeiro para a sua nutrição e desenvolvimento, pelo que após a infeção, as células hospedeiras ficam irreversivelmente danificadas, o que se traduz na morte do organismo infetado (1).

Estes fungos parasitas podem infetar vários tipos de fitoplâncton incluindo espécies de cianobactérias formadoras de florescências (1). Algumas destas florescências são tóxicas para o Homem e daí o impacto que estes fungos podem ter na saúde humana (4). Apesar da sua importância ser reconhecida, existe pouca informação sobre o efeito destas infeções na ocorrência, periodicidade e toxicidade das florescências cianobacterianas. A falta de informação deve-se, em parte, ao facto de a ocorrência destas infeções poder passar despercebida, mas é sobretudo a dificuldade de cultivar estes organismos e de obter culturas puras que impede o estudo aprofundado destas interações (2, 3). Alguns quitrídeos já foram isolados com sucesso (2, 10) mas ainda assim são considerados na sua maioria como um grupo de fungos não cultiváveis.

O desafio no cultivo destes organismos prende-se com o facto de serem parasitas obrigatórios, pelo que têm de ser co-cultivados com o seu hospedeiro sendo imprescindível manter o parasita e o hospedeiro simultaneamente saudáveis.

Objetivo

Neste estudo descrevemos o isolamento e manutenção em cultura monoclonal de um parasita quitrídeo recolhido de uma florescência da cianobactéria *Planktothrix agardhii*.

Material e métodos

Em junho de 2014 foi observada uma infeção fúngica em células de *P. agardhii* em duas amostras provenientes de uma albufeira com uma florescência. Uma pequena quantidade (1mL) de cada amostra foi transferida para culturas puras de *P. agardhii*-Imecya230 isolado da mesma albufeira em maio de 2007 e mantido na coleção de algas Estela Sousa e Silva no Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

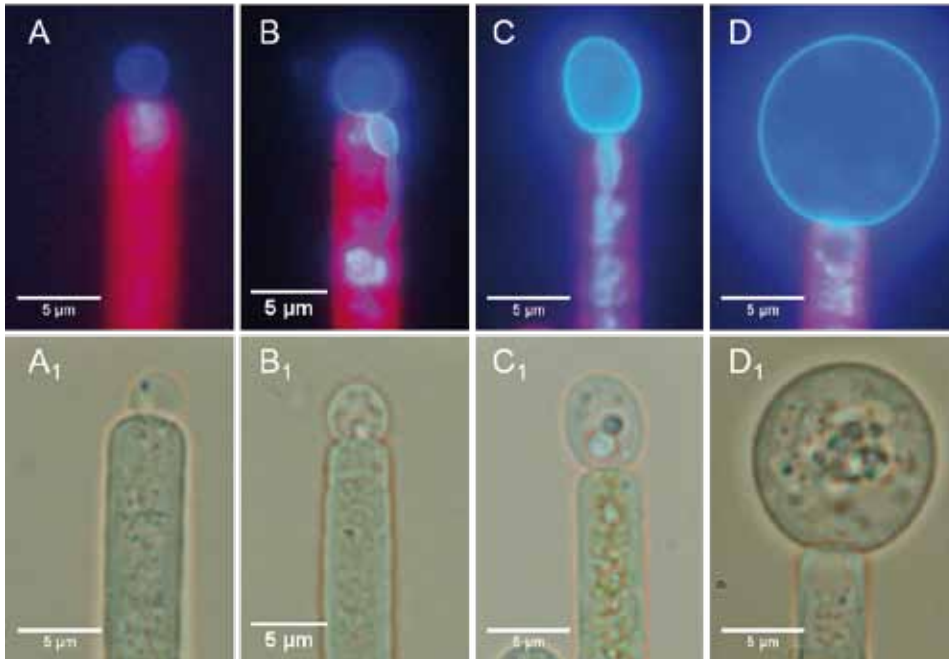
As culturas foram examinadas diariamente para observação da propagação da infeção. Ao fim de sete dias foi isolado, com uma pipeta capilar, um único filamento de *P. agardhii* infetado com apenas um esporângio. Este filamento infectado foi transferido para uma nova cultura pura de *P. agardhii*-Imecya230 para se obter culturas monoclonais deste fungo. As culturas inoculadas com o par parasita-hospedeiro foram mantidas a uma temperatura constante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, com uma intensidade de luz de $20 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e um ciclo de 14 h de luz e 10 h de escuro.

Resultados

Duas culturas monoclonais de fungos quitrídeos foram obtidas com sucesso. De acordo com a descrição morfológica de Letcher e Powell (2012) (12) os quitrídeos isolados pertencem à ordem Rhizophydiales espécie *Rhizophyidium megarrhizum* já descrita como parasita da cianobactéria *P. agardhii*.

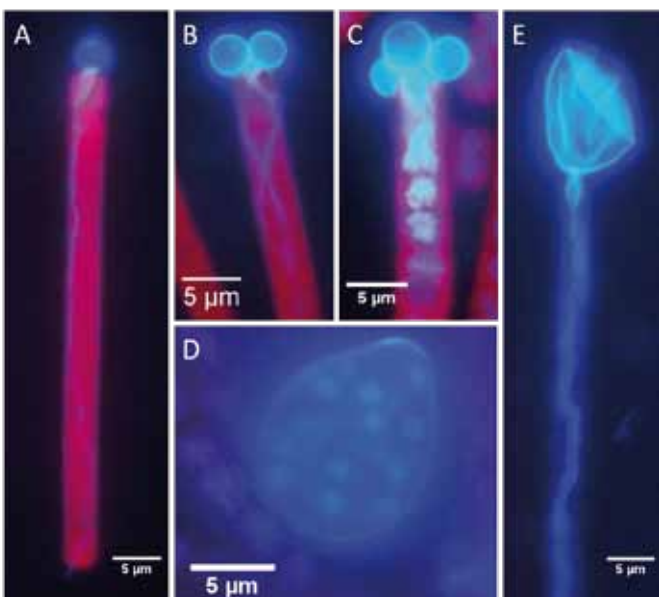
O processo infeccioso está representado na figura 1: os zoósporos ligam-se ao filamento de *P. agardhii* (figura 1A) e desenvolvem os seus rizóides no interior das células penetrando ao longo do

Figura 1: Desenvolvimento do esporângio do parasita *Rhizophydium megarrhizum* em filamentos da cianobactéria *Planktothrix agardhii*.



(A e A₁) zoósporo recentemente ligado ao filamento e início da formação do rizóide; (B e B₁) início da expansão do esporângio e do rizóide que parasita o filamento; (C e C₁) esporângio em expansão já com o rizóide intracelular bem desenvolvido; (D e D₁) esporângio maduro; (A-D) imagens de microscopia de fluorescência sob luz UV que evidenciam a parede quitinosa do esporângio e dos rizóides corados com calcofluor; a cianobactéria é visível através da autofluorescência vermelha; (A₁-D₁) imagens de microscopia óptica de campo claro. Ampliação 1000x, escala de 5 µm.

Figura 2: Parasitismo do fungo quitrídeo *Rhizophydium megarrhizum* em filamentos da cianobactéria *Planktothrix agardhii*.



filamento (figura 1B-D), o esporângio é formado no exterior no qual são produzidos e libertados novos zoósporos (figura 2D). A ligação é feita sempre pelo topo do filamento e os rizóides perfuram todo o filamento (figura 2A), mesmo que o filamento seja longo, podendo os rizóides atingir 140 µm. O mesmo filamento pode ser infetado por vários zoósporos, tendo sido observados até quatro esporângios por filamento (figura 2B,C). A infeção resulta na morte da cianobactéria (figura 2E).

(A) filamento infetado em toda a sua extensão; (B) filamento infetado com dois esporângios; (C) filamento infetado com três esporângios; (D) esporângio maduro com zoósporos no seu interior; (E) esporângio vazio e rizóide num filamento já morto. Imagens de microscopia de fluorescência sob luz UV; a parede quitinosa do fungo foi corada com calcofluor emitindo fluorescência azul; a cianobactéria é visível através da autofluorescência vermelha; os zoósporos foram corados com NucBlue® emitindo fluorescência verde. Ampliação 1000x, escala de 5 µm.

_Discussão

As culturas de *R. megarrhizum* obtidas são provenientes de uma albufeira que é monitorizada relativamente à presença de cianobactérias e toxinas associadas no laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do INSA desde 2003. Esta albufeira tem uma florescência persistente de *P. agardhii* associada à presença de hepatotoxinas (microcistinas) desde 2006. Os isolamentos do fungo parasita foram efetuados em duas amostras colhidas durante o mês de junho de 2014 (dia 4 e 12). As amostras continham uma grande densidade de *P. agardhii* (14.14762 e 22.50476 céls.mL⁻¹ respetivamente) assim como uma elevada concentração de microcistinas (40,05 e 39,32 µg.L⁻¹ respetivamente). Um mês depois, a 23 de julho de 2014, registou-se a concentração de microcistinas mais elevada (134,60 µg.L⁻¹) para esta albufeira desde o início da sua monitorização em 2003. Em junho de 2014 foi a primeira vez que foi observada a infeção fúngica da cianobactéria *P. agardhii* nesta albufeira. Desconhece-se se nesta albufeira as infeções fúngicas de *P. agardhii* já decorrem há algum tempo ou se surgiram agora, assim como, é desconhecida a sua influência na população da cianobactéria *P. agardhii*.

Estudos recentes em parasitismo quitridico em *P. agardhii* indicam que a infeção pode ser dependente do tipo de oligopéptidos produzidos e que a produção de microviridinas, anabaenopeptinas, cianopeptolinas e microcistinas pode prevenir a infeção de *P. agardhii* (10, 11). Os zoósporos encontram o seu hospedeiro por meio de quimiotaxia (13) pelo que os compostos produzidos pelas cianobactérias podem de facto ser importantes na escolha do hospedeiro pelo fungo. Os resultados destes estudos indicam que a infeção pode exercer uma forte pressão seletiva sobre a população e resultar em subdivisão da mesma (10, 11). As florescências cianobacterianas são frequentemente compostas por estirpes produtoras e não produtoras de toxinas, dentro de uma mesma espécie, que competem pelos mesmos recursos. Assim, coloca-se a hipótese de que o facto de as estirpes serem produtoras de microcistinas impede a infeção pelo fungo, pode causar um desequilíbrio na densidade de estirpes tóxicas e não tóxicas podendo conduzir a uma toxicidade mais elevada das florescências. Outro fator ainda pouco estudado é se a presença destes fungos parasitas estimulará as estirpes a produzir maior quanti-

dade de toxina. Do ponto de vista da saúde pública, sendo a albufeira em estudo usada para produção de água para consumo humano, é importante perceber a influência da infeção fúngica na frequência, densidade e toxicidade das florescências da cianobactéria *P. agardhii*.

_Conclusões

As culturas de *R. megarrhizum* obtidas vão possibilitar a realização de trabalho experimental como por exemplo acesso ao ADN fúngico para estudos moleculares e o estudo de diversos fatores envolvidos neste parasitismo. Estes estudos laboratoriais permitirão compreender a influência destes parasitas na população de *P. agardhii* e perceber se a sua presença possibilita o aparecimento de florescências mais tóxicas com um elevado risco para a saúde humana.

Referências bibliográficas:

- (1) Gerphagnon M, Latour D, Colombet J, et al. Fungal parasitism: life cycle, dynamics and impact on cyanobacterial blooms. *PLoS One*. 2013;8(4):e60894. [LINK](#)
- (2) Kagami M, Bruin A, Ibelings B, et al. Parasitic chytrids: their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. *Hydrobiologia*. 2007;578(1):113-29.
- (3) Marano AV, Gleason FH, Bärlocher F, et al. Quantitative methods for the analysis of zoospore fungi. *J Microbiol Methods*. 2012;89(1):22-32.
- (4) Chorus I, Bartram. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Geneva: World Health Organization, 1999. [LINK](#)
- (5) Sime-Ngando T. Phytoplankton chytridiomycosis: fungal parasites of phytoplankton and their imprints on the food web dynamics. *Front Microbiol*. 2012;3:361. [LINK](#)
- (6) Gachon CM, Sime-Ngando T, Strittmatter M, et al. Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends Plant Sci*. 2010;15(11):633-40.
- (7) Grami B, Rasconi S, Niquil N, et al. Functional effects of parasites on food web properties during the spring diatom bloom in Lake Pavin: a linear inverse modeling analysis. *PLoS One*. 2011;6(8):e23273. [LINK](#)
- (8) Kagami M, Miki T, Takimoto G. Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Front Microbiol*. 2014;5:166. [LINK](#)
- (9) Rasconi S, Grami B, Niquil N, et al. Parasitic chytrids sustain zooplankton growth during inedible algal bloom. *Front Microbiol*. 2014;5:229. [LINK](#)
- (10) Sønstebo JH, Rohrlack T. Possible implications of chytrid parasitism for population subdivision in freshwater cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(4):1344-51. Epub 2010 Dec 17. [LINK](#)
- (11) Rohrlack T, Christiansen G, Kurmayer R. Putative antiparasite defensive system involving ribosomal and nonribosomal oligopeptides in cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(8):2642-7. [LINK](#)
- (12) Letcher PM, Powell MJ. A taxonomic summary and revision of Rhizophyidium (Rhizophydiales, Chytridiomycota). Tuscaloosa, AL : University Printing, The University of Alabama, 2012. (Zoospore Research Institute; 1)
- (13) Gleason H, Lilje O. Structure and function of fungal zoospores: ecological implications. *Fungal Ecology*. 2009;2(2):53-9.



Avaliação das vias potenciais de exposição humana num estuário contaminado: o caso do Estuário do Sado

Susana Pereira Silva, Ausenda Machado, Eleonora Paixão,
Sandra Caeiro, Carlos Matias Dias

susana.pereira@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, INSA.

Introdução e objetivo

O Estuário do Sado é um ecossistema com elevada sensibilidade e valor ecológico, e, simultaneamente, com importante valor económico, nomeadamente para as atividades piscatórias, turísticas e industriais. Embora tenham já sido realizados estudos ambientais sobre a contaminação desde estuário por metais pesados e os seus efeitos nos sistemas ecológicos, não foi identificada nenhuma investigação publicada cujo objetivo tenha sido estudar a associação entre a contaminação ambiental e os efeitos na saúde da população humana residente nas margens do estuário do rio Sado (1).

Vários estudos referem que o padrão de consumo de produtos obtidos diretamente do estuário, ou com relação com a utilização de água proveniente do estuário, tal como produtos agrícolas, ou água utilizada em atividades diárias, podem constituir vias de exposição e contaminação potencial para a população humana. Outra possível via de contaminação é o uso de vários tipos de pesticidas - toda a substância ou mistura de substâncias destinada a prevenir, destruir, repelir e mitigar qualquer praga - que podem contaminar alimentos bem como os solos e, através da infiltração nestes, as águas subterrâneas e o estuário (2).

O projeto HERA (Avaliação de risco ambiental de um ambiente estuarino contaminado: um estudo de caso), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT- PTDC/SAU-ESA/100107/2008), consistiu num estudo integrado, multidisciplinar, com o objetivo, de avaliar o risco ambiental, incluindo ecológico e para a saúde

humana no Estuário do Sado. Este projeto incluiu um estudo epidemiológico que pretendeu caracterizar as vias de exposição potencial a produtos do estuário e os seus efeitos na saúde (1-4). No presente artigo serão apresentados os resultados relativos à caracterização das vias de exposição humana.

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo epidemiológico transversal com comparação de duas populações: pessoas de todas as idades e ambos os sexos residentes na Carrasqueira (pequena vila no canal sul do estuário do Sado - população exposta), e em Vila Nova de Mil Fontes (VNMF), que se localiza nas proximidades de outro estuário (rio Mira), a cerca de 100 km da Carrasqueira, da qual não há conhecimento de poluição industrial / outros contaminantes, pelo que foi escolhida como população não exposta.

A amostra de residentes em cada localidade foi selecionada de forma aleatória simples, a partir da lista de utentes do Serviço Nacional de Saúde. Foi aplicado um questionário por entrevista direta e presencial por entrevistadores treinados, assistida por computador CAPI ("Computer Assisted Personal Interview") sobre as seguintes áreas: 1) **efeitos na saúde**: incluindo morbilidade (doença diagnosticada por um profissional de saúde, medicação), efeitos sobre a reprodução; 2) **vias de exposição**: informação sociodemográfica, ocupacional, hábitos de lazer, comportamentos e estilos de vida; 3) **potenciais vias de contaminação do estuário** (incluindo utilização de água para a vida diária, pesca no estuário e consumo de peixe dele proveniente, mesmo que adquirido no mercado local, e agricultura de subsistência com cultivo de hortas locais ou consumo de produtos nelas cultivados). O trabalho de campo decorreu entre junho e julho de 2011.

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do INSA e Comissão Nacional de Proteção de Dados, sendo os participantes incluídos no estudo apenas após assinarem um termo de consentimento informado.

Foi efetuada a descrição estatística das variáveis em estudo e analisadas as possíveis associações relevantes para o objetivo, testadas através do teste de Qui-Quadrado com um nível de significância de 5%.

_Resultados

Foram recolhidos dados de 202 participantes de todas as idades, sendo analisados os seus comportamentos quanto ao consumo de alimentos provenientes de estuário ou mercado local, de hortas locais e o consumo e a utilização de água proveniente de poços, furos, ou canais de irrigação locais (**gráfico 1**).

Os dados revelam que os comportamentos relacionados com vias potenciais de exposição diferem significativamente entre a população exposta e a população não exposta. Os participantes da Carrasqueira referem, com maior frequência, consumir peixe pescado no estuário ou adquirido na loja local, produtos de horta própria ou de familiares ou amigos, assim como a utilização de

água proveniente de furos ou poços para consumo, ou para cozinhar, e água de furos, poços ou canais de irrigação para regar as hortas locais.

As diferenças observadas entre as duas populações são estatisticamente significativas quanto ao cultivo de hortas, mais frequente na população exposta ao Estuário do Sado, sendo não significativas no que respeita ao consumo de produtos de hortas, cultivados ou oferecidos por familiares e amigos (**tabela 1**).

Em ambas as localidades, todos os inquiridos que indicaram cultivar hortas indicaram, igualmente, consumir os produtos delas obtidos.

Gráfico 1: Frequências de consumo e utilização de água auto-reportadas pelos residentes na Carrasqueira e VNMF.

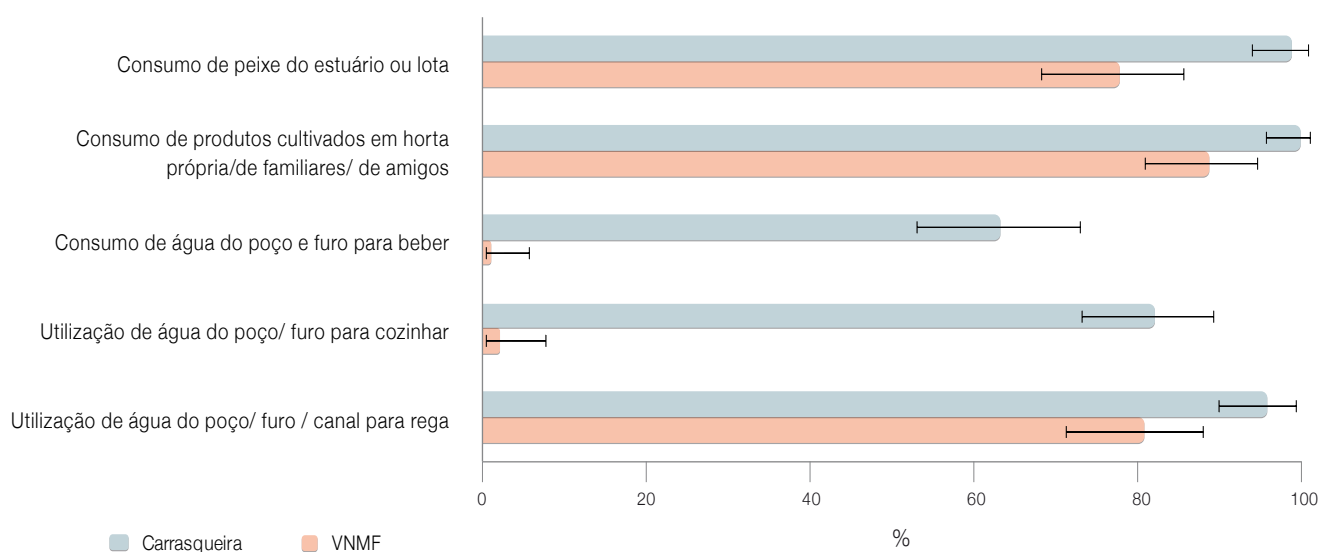


Tabela 1: Distribuição dos participantes da Carrasqueira e VNMF de acordo com hábitos de cultivo e de consumo de produto provenientes de hortas.

| | Local da entrevista | | | | p-value |
|---|---------------------|-------|------|-------|---------|
| | Carrasqueira | | VNMF | | |
| | n | % | n | % | |
| Cultivar alguma horta | 102 | 54,90 | 100 | 20,00 | <0,001 |
| Consumo de produtos de outras hortas, cultivados e oferecidos por familiares e amigos | 102 | 82,35 | 100 | 83,00 | 0,903 |

n - número de registos válidos; p-value - refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável teste Qui-Quadrado de Pearson.

Tabela 2: ↓ Distribuição dos participantes da Carrasqueira e VNMF de acordo tratamentos das hortas com pesticidas e herbicidas.

| | Local da entrevista | | | | p-value |
|---|---------------------|------|------|------|---------|
| | Carrasqueira | | VNMF | | |
| | n | % | n | % | |
| Hortas com tratamento com pesticidas e herbicidas | 97 | 81,4 | 69 | 44,9 | <0,001 |

n - número de registos válidos; p-value - refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável teste Qui-Quadrado de Pearson.

Aos indivíduos que indicaram consumir produtos cultivados em hortas foi questionado se essas hortas tinham tratamentos com pesticidas e herbicidas, tendo-se verificado diferenças significativas entre as duas localidades (81,4% na Carrasqueira vs 44,9% em VNMF) (tabela 2).

A frequência da utilização de pesticidas e herbicidas no tratamento das hortas foi superior na Carrasqueira (2,14 vezes por ano vs 1,45 vezes por ano em VNMF) embora sem significância estatística ($p=0,071$).

Discussão e conclusões

O facto de se tratar de um estudo transversal e de a informação recolhida ser auto-reportada leva a que as conclusões devam ser interpretadas com precaução dada a possibilidade de existência de viéses de memória e de informação (1).

No entanto, foram identificadas vias de contaminação potencial entre o estuário e a população residente na localidade situada nas margens do estuário do Sado. De facto, os hábitos de consumo de peixe com origem no Estuário do Sado, de produtos hortícolas e de água para consumo ou utilização diversa, colocam a população da Carrasqueira com maior probabilidade de exposição aos contaminantes do Estuário do Sado através da via de ingestão de alimentos.

Em resumo, os resultados obtidos indicam que na população exposta (Carrasqueira) existem frequências mais elevadas de:

1. Consumo de peixe do estuário local ou do Mercado, consumo de produtos hortícolas próprios ou locais, utilização de água para consumo proveniente do furo, poço ou canal do rio.
2. Cultivo de hortas com irrigação a partir do estuário ou de poços ou furos locais;
3. Tratamento das hortas com pesticidas e herbicidas.

Referências bibliográficas:

- (1) Machado A, Paixão E, Silva S, et al. Projeto HERA – Avaliação de risco ambiental de um ambiente estuarino contaminado: resultados do estudo epidemiológico (2011-2012). Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. [LINK](#)
- (2) United States. Environmental Protection Agency. About pesticides [Em linha]. [consult. 9/12/2014] [LINK](#)
- (3) Machado A, Paixão E, Silva SP, et al. Comparação da prevalência de doenças não transmissíveis em populações expostas e não expostas a um ambiente estuarino contaminado – Projeto HERA. Boletim Epidemiológico Observações. 2013;2(Nº especial 2):44-45. [LINK](#)
- (4) Paixão E, Machado A, Carvalho C, et al. Potential human exposure pathways in a contaminated estuarine environment: a case study in Sado. In: 2012 International Conference on Environmental Pollution and Public Health: proceeding. Shanghai: Scientific Research Publishing, 2012. [LINK](#)

Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de contaminantes de sedimentos do Estuário do Sado numa linha celular humana

Miguel Pinto¹, Pedro Manuel Costa^{1,2}, Henriqueta Louro¹,
Maria Helena Costa², João Lavinha¹, Sandra Caeiro^{2,3,4},
Maria João Silva¹

m.joao.silva@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Genética Humana, INSA.

(2) Instituto do Mar, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

(3) Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Aberta.

(4) Centro de Investigação em Ambiente e Sustentabilidade, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

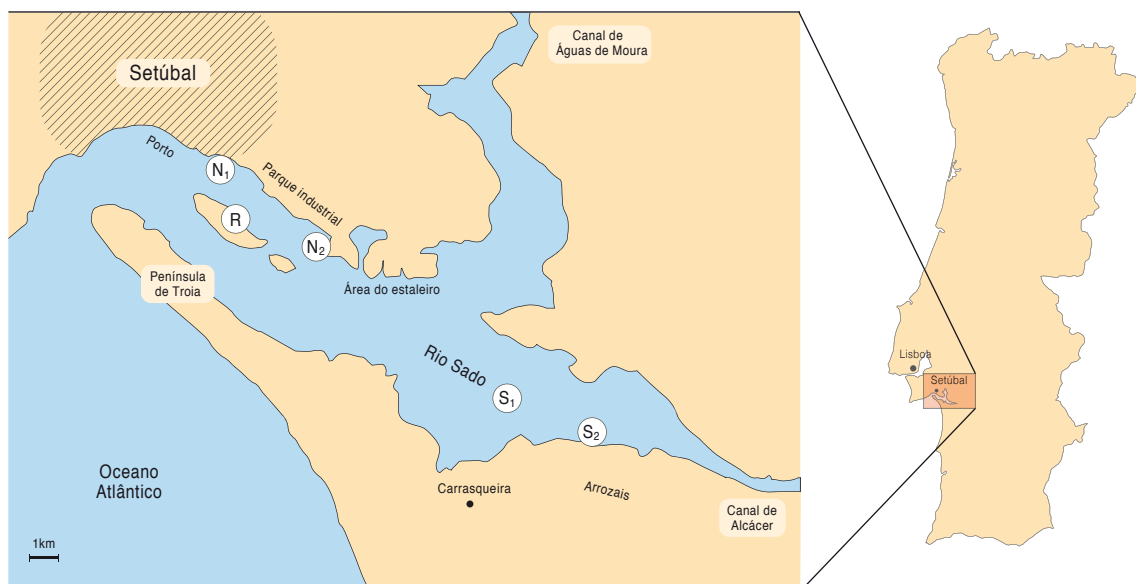
Introdução

O Estuário do rio Sado (sudoeste de Portugal) é o segundo maior do país e caracteriza-se por ter um grande valor ecológico e económico (figura 1). Apesar de ter vindo a ser afetado ao longo dos anos por várias fontes de poluição de origem urbana, industrial e agrícola, ainda continua a ser, para a população local, um lugar privilegiado para atividades piscícolas e agrícolas. A margem norte é caracterizada por uma vasta zona urbana e industrial, localizada em

torno da cidade de Setúbal; a margem sul é conhecida pela presença de pequenas aldeias cuja população se ocupa, essencialmente, em práticas de pesca no estuário e de pequena agricultura, para além da existência da península de Troia, zona de alto valor turístico (1).

Estudos anteriores revelaram a existência de diversas classes de contaminantes nos sedimentos deste estuário, incluindo metais, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), cujos efeitos adversos em organismos vivos são conhecidos e já foram observados neste ambiente (2). Destes conhecimentos prévios surgiu uma preocupação relacionada com a potencial bioacumulação de contaminantes nas partes edíveis de espécies estuarinas, ou de produtos agrícolas de origem local, que poderiam entrar assim na cadeia alimentar humana e representar um problema de saúde pública. Neste contexto, o estudo da toxicidade ao nível genético - tal como a formação de quebras e/ou danos oxidativos no DNA ou de alterações cromossómicas - em modelos celulares ou animais, assumiu-se como particularmente relevante para a caracterização do potencial efeito nocivo dos contaminantes presentes nas águas e nos sedimentos estuarinos. Atualmente, de entre os biomarcadores de um efeito biológico (p.ex., de um efeito genotóxico) disponíveis, o ensaio do micronúcleo (3) e o ensaio do cometa (4) são os mais utilizados.

Figura 1: Mapa da área de estudo, o Estuário do Sado, com indicação dos diferentes locais de amostragem utilizados neste trabalho (N₁, N₂, S₁, S₂ e R).



_Objetivos

O presente estudo integra-se num projeto mais amplo que visa avaliar o risco ambiental – que inclui os riscos ecológicos e para a saúde humana - associado a este ambiente estuarino contaminado. Em particular, este estudo teve como objetivo caracterizar o potencial citotóxico e genotóxico de sedimentos colhidos em vários locais de pesca do Estuário do Sado numa linha celular humana, tendo em vista uma avaliação de eventuais efeitos nefastos para a saúde humana.

_Material e métodos

As amostras de sedimentos foram colhidas em 5 locais de pesca distintos do Estuário do Sado: amostras N_1 e N_2 na margem norte (urbana/industrial), amostras S_1 e S_2 na margem sul (agrícola) e uma amostra de referência R colhida num banco de areia (figura 1). As amostras foram previamente caracterizadas para contaminantes orgânicos e inorgânicos (5,6). Para ensaios celulares, os contaminantes foram extraídos com uma mistura de diclorometano:metanol e recuperados em dimetilsulfóxido (DMSO). Os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos finais foram avaliados na linha celular derivada de um hepatoma humano HepG2, através do ensaio do vermelho neutro e dos ensaios do cometa [modificado com formamido-pirimidina-DNA glicosilase (FPG), para revelar danos oxidativos no DNA] e micronúcleo, respetivamente, após uma exposição de 48 h a diferentes concentrações de extratos de sedimento [de 10 até 200 mg sedimento equivalente (SEQ)/mL de meio de cultura].

_Resultados

Os resultados dos diferentes ensaios encontram-se apresentados no gráfico 1A-D. Após uma exposição de 48 h, os extratos N_1 e N_2 induziram a maior redução na viabilidade celular, até app. 91 e 85% de redução, respetivamente. Em contraste, os extratos S_1 e S_2 mostraram-se menos citotóxicos, com uma redução da viabilidade celular até app. 45%. A amostra de referência R não induziu citotoxicidade.

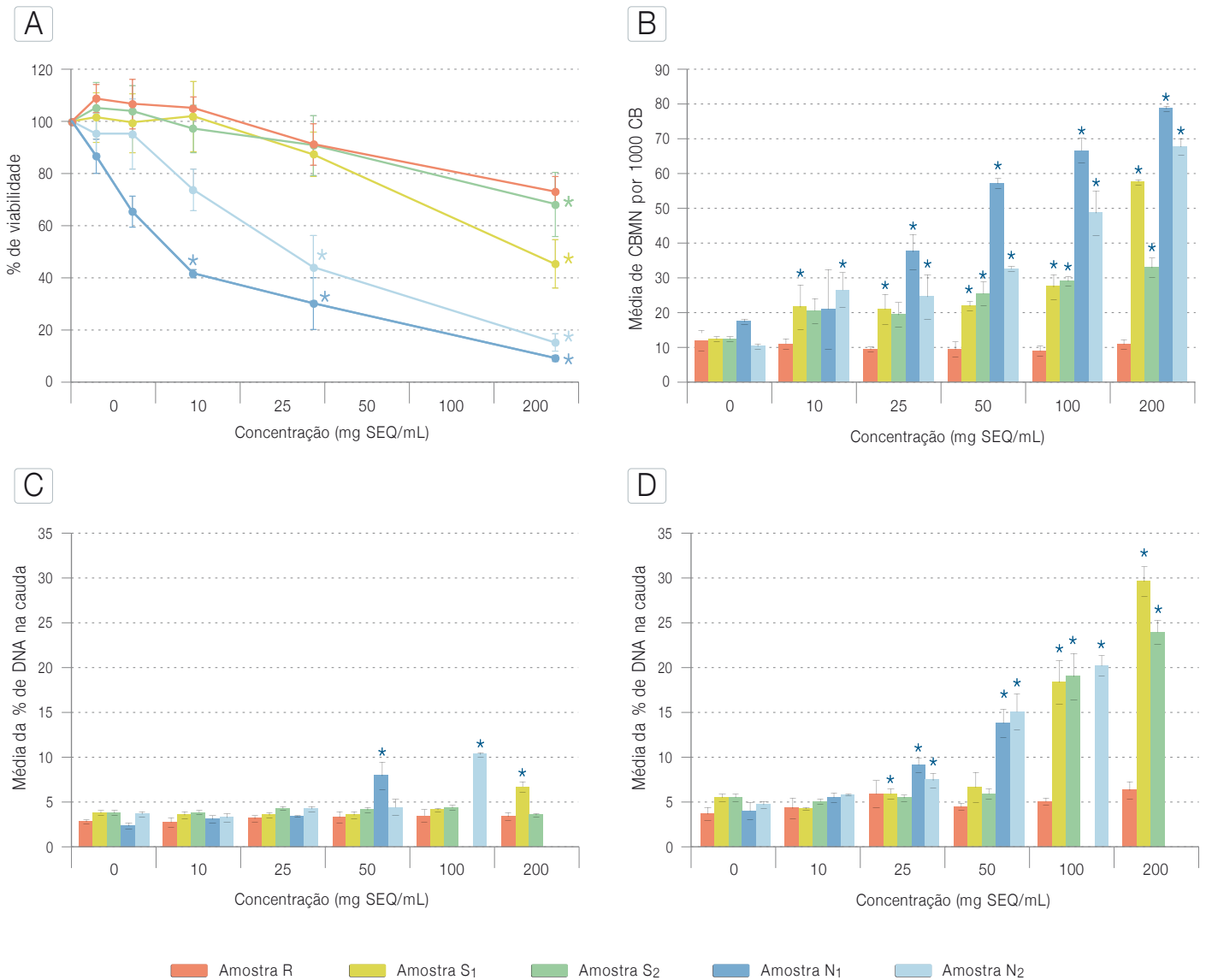
A análise dos resultados dos efeitos genotóxicos, avaliados pelo ensaio do cometa, revelou a indução de quebras ao nível do DNA (sem FPG) e de danos oxidativos no DNA (com FPG), após a expo-

sição a todos os extratos, exceto o R. No geral, os níveis de danos não-oxidativos foram mais elevados em células expostas aos extratos de sedimentos da área norte do estuário, enquanto os níveis de danos oxidativos no DNA foram mais elevados após exposição aos extratos da área sul. Isto é, as amostras N_1 e N_2 induziram um aumento significativo da percentagem de DNA na cauda, sem tratamento com FPG, às concentrações testadas mais elevadas, em comparação com o controlo de solvente. No entanto, as amostras S_1 e S_2 induziram sobretudo danos oxidativos no DNA, sendo que o valor de percentagem de DNA na cauda, aquando do tratamento com FPG, foi 6 vezes superior ao observado sem FPG. Todas as amostras contaminadas induziram também um aumento significativo do número de células binucleadas micronucleadas (CBMN), dependente da concentração, revelando um potencial de induzir danos ao nível cromossómico (gráfico 1B). As amostras N_1 e N_2 causaram um aumento da frequência de CBMN em cerca de 4 a 6 vezes, respetivamente, a 200 mg SEQ/mL, quando comparada à do controlo de solvente. Em contraste as amostras S_2 e S_1 produziram um aumento significativo da frequência de CBMN app. 3 a 4 vezes superior ao controlo de solvente, respetivamente, à concentração testada mais elevada.

_Discussão

Os resultados sugerem que existe uma diferença ao nível do potencial genotóxico dos sedimentos do estuário do Sado, dado que as amostras colhidas na margem norte do estuário (N_1 e N_2) exibem valores mais elevados de indução de quebras de DNA e de micronúcleos do que as amostras colhidas na margem sul do estuário (S_1 e S_2) que exibem, sobretudo, valores mais elevados de danos oxidativos de DNA. Conjuntamente com a análise de contaminantes dos sedimentos (5,6), sugere-se que os resultados obtidos para as amostras N_1 e N_2 serão principalmente devidos à presença de um nível mais elevado de contaminantes orgânicos, tais como HAPs, pesticidas ou bisfenilos policlorados, enquanto os resultados obtidos para as amostras S_1 e S_2 se deverão à predominância de contaminantes de origem inorgânica (metais e metalóides). No que diz respeito à amostra R, a falha na indução tanto de citotoxicidade como de genotoxicidade, nos diferentes ensaios, encontra-se concordante com os valores muito baixos de contaminação observados, confirmando ser uma boa área de referência (6). Assim, apesar

Gráfico 1A-D: ↓ Resultados dos ensaios do vermelho neutro (A), micronúcleos (B), cometa (C) e cometa modificado com FPG (D) em células HepG2, após uma exposição de 48 h aos diferentes extratos de sedimentos (10 a 200 mg SEQ/mL).



Os resultados apresentados são o valor médio (\pm EP) de 3 experiências independentes (para A, C e D), e o valor médio (\pm DP) (para B). A concentração de 0 mg SEQ/mL corresponde ao controlo de solvente (DMSO a 2%, com exceção da amostra N₁ no ensaio do cometa que corresponde a 0,5%). CBMN- Célula binucleada micronucleada; * - Diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o respetivo controlo. No gráfico 1C e 1D, para as amostras N₁ e N₂, as concentrações mais elevadas não foram testadas devido à elevada citotoxicidade observada nestas condições.



do estuário ter sido classificado como moderadamente contaminado, com base apenas na caracterização dos contaminantes dos sedimentos, o presente estudo revela que a mistura desses mesmos contaminantes é capaz de induzir citotoxicidade e genotoxicidade, dependente da concentração, numa linha celular humana. Para além disso, os efeitos observados tiveram também um poder discriminatório capaz de distinguir duas áreas ecogeográficas distintas, a urbana/industrial e a rural/agrícola.

_Conclusões

Os resultados obtidos sugerem que células HepG2 expostas a contaminantes da área norte (urbana/industrial) apresentam os danos genotóxicos mais permanentes, refletidos na forte indução de micronúcleos. Em contraste, a exposição a extratos da área sul (agrícola) resultou, particularmente, na indução de danos oxidativos no DNA. Estes resultados são concordantes tanto com os níveis e natureza da contaminação observada, como com os efeitos genotóxicos dos sedimentos previamente demonstrados *in vivo*, em espécies estuarinas (2).

Este estudo revelou que os resultados integrados dos indicadores de citotoxicidade, genotoxicidade e *stress* oxidativo obtidos em linhas celulares humanas expostas às misturas de contaminantes sedimentares, poderão constituir uma linha de evidência valiosa para a identificação e avaliação do risco para a saúde humana decorrente da exposição a um ambiente estuarino classificado quimicamente como moderadamente contaminado.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através do financiamento plurianual PEst-OE/SAU/UI0009/2011 e do projeto PTDC/SAU-ESA/100107/2008.

Artigo adaptado de: Pinto M, Costa PM, Louro H, et al. Determining oxidative and non-oxidative genotoxic effects driven by estuarine sediment contaminants on a human hepatoma cell line. *Sci Total Environ*. 2014;478:25-35. <http://hdl.handle.net/10400.18/2316>

Referências bibliográficas:

- (1) Caeiro S, Costa MH, Ramos TB, et al. Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: an index analysis approach. *Ecol Indic* 2005;5(2):151-69.
- (2) Costa PM, Caeiro S, Vale C, et al. Can the integration of multiple biomarkers and sediment geochemistry aid solving the complexity of sediment risk assessment? a case study with a benthic fish. *Environ Pollut*. 2012;161:107-20.
- (3) Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084-104.
- (4) Collins AR. Investigating Oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*. 2009;681(1):24-32.
- (5) Costa PM, Neuparth TS, Caeiro S, et al. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: laboratory versus *in situ* studies. *Environ Res*. 2010;111(1):25-36.
- (6) Carreira S, Costa PM, Martins M, et al. Ecotoxicological heterogeneity in transitional coastal habitats assessed through the integration of biomarkers and sediment-contamination profiles: a case study using a commercial clam. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2013;64(1):97-109.



Contaminação do ambiente interior de creches e jardins-de-infância por ácaros do pó doméstico: estudo ENVIRH

Manuela Cano¹, Susana Azevedo², Fátima Aguiar¹,
Ana Sofia Mendes¹, Nuno Rosa¹

manuela.cano@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Qualidade do Ar, Unidade de Ar e Saúde Ocupacional,
Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

(2) Laboratório Nacional de Engenharia Civil.

Introdução

As crianças que frequentam creches e jardins-de-infância são mais suscetíveis a doenças infecciosas que aquelas que são cuidadas em casa (1,2) além de apresentarem um maior risco de desenvolver alergias e asma (3,4).

A exposição aos alérgenos dos ácaros do pó doméstico é um importante fator de risco no despoletar e exacerbar de doenças alérgicas em crianças (5), designadamente na rinite e conjuntivite alérgica, asma e a dermatite atópica (6). Os alérgenos *major* responsáveis pelas reações de hipersensibilidade aos ácaros do pó encontram-se nos seus excrementos e nos fragmentos corporais secos.

Os ácaros do pó doméstico são ubíquos e as duas espécies com maior distribuição geográfica são o *Dermatophagoides pteronyssinus* e o *Dermatophagoides farinae* (7) e, em geral, as duas espécies coabitam no ambiente. Os níveis de ácaros no ambiente variam sazonalmente, verificando-se uma maior produção de alérgenos e a sua deposição no pó doméstico em condições mais húmidas.

Estima-se que entre 5 e 10% da população da Europa Ocidental seja alérgica a ácaros do pó doméstico e que 5% a 20% seja atópica, ou seja, predisposta para desenvolver alergia aos mesmos, apesar de não se encontrar sensibilizada (6).

Sabendo que em Portugal a maioria das crianças começa a frequentar a creche entre os 5 e os 6 meses de idade e sendo este

o local onde, após a sua casa, passa a maior parte do tempo, é fundamental o estudo do ambiente da creche/jardim-de-infância e sua influência na saúde das crianças.

Este trabalho é parte do estudo ENVIRH (*Environment and Health in Children Day Care Centres*) que pretende avaliar a qualidade do ambiente interior em creches/jardins-de-infância de modo a estudar a sua relação com a ventilação dos locais e a saúde das crianças que os frequentam.

Material e métodos

O estudo ENVIRH foi levado a cabo entre março de 2011 e fevereiro de 2012 nas cidades de Lisboa e do Porto, incluiu duas campanhas de avaliação da qualidade do ambiente interior, a primeira na primavera de 2011 em 19 escolas e a segunda em 17 escolas durante o período de inverno 2011/2012.

Em cada creche/jardim-de-infância foram avaliadas de 5 a 9 salas, garantindo o estudo de, no mínimo, uma sala por faixa etária (dos 5 meses aos 6 anos) num total de 125 salas avaliadas na primavera e 97 salas no inverno. As avaliações foram levadas a cabo durante o período de normal ocupação dos espaços (10-17 horas) e no decurso das atividades de rotina.

As creches/jardins-de-infância foram selecionadas de um total de 45 escolas, através de uma análise de *clusters* (método de Ward), considerando a concentração de dióxido de carbono, medições da humidade relativa do ar e da temperatura do ar, por forma a garantir a heterogeneidade das escolas em matéria de qualidade do ambiente interior.

Foi efetuada uma visita preliminar aos espaços e registados dados sobre as áreas das salas, tipo de materiais utilizados nos pavimentos e paredes, tipo de folha móvel das janelas, sistemas de aquecimento/ventilação dos espaços e ocupação dos mesmos. Foi igualmente registada a presença de infiltrações de água ou crescimento visível de bolores, de plantas naturais em vasos e de tapetes.

Para a determinação da concentração de antígenos de ácaros (Der f1 e Der p1) em amostras de pó doméstico efetuaram-se colheitas

artigos breves_ n. 7

de pó em tapetes, pavimento e brinquedos em pano/pelúcia, utilizando filtros de *nylon* (ref.DU-FL_1) adaptados ao coletor *dusts-tream*TM (ref. DU-ST-1) e um aspirador com caudal da ordem dos 45 l/min. (800 Watt), de acordo com a metodologia da *INDOOR Biotechnologies Limited* (Cardiff, UK).

Em tapetes a amostragem de pó teve duração aproximada de 2 minutos, tendo-se aspirado uma área de cerca de 0,25 m². No caso de pavimentos em vinil, mosaico ou madeira aspirou-se o equivalente a 1 m² durante um período de 2 minutos. A determinação dos antigénios de ácaros Der p1 e Der f1 nas amostras de pó doméstico foi efetuada separadamente utilizando *kits* de ELISA (*INDOOR Biotechnologies Limited*, Cardiff, UK), com referências EL DP1 e EL DF1 respetivamente. Os resultados são expressos em microgramas de alergénio por grama de pó doméstico.

_Resultados

Apresentam-se na **tabela 1** as concentrações de alergénios de ácaros do pó doméstico Der p1 e Der f1 obtidas nas creches/jardins-de-infância, durante as duas campanhas (primavera e inverno) e sua comparação com o limiar de sensibilização proposto por Platts-Mills *et al.* (8).

Verifica-se que as concentrações de ácaros obtidas na primavera foram superiores às determinadas no inverno. As concentrações do alergénio Der 1 (Der p1+Der f1) são superiores ao limiar de sensibilização de 2 µg/g de pó em 16% e 6% das salas de atividades estudadas na primavera e inverno, respetivamente.

Analisando os **gráficos 1 e 2** correspondentes aos resultados das campanhas de primavera e verão, respetivamente, verifica-se que em 4 salas de atividades se obtiveram concentrações acima do limiar para o aparecimento de sintomas em indivíduos previamente sensibilizados aos ácaros do pó doméstico (10 µg/g de pó) (8). Destas, duas salas foram estudadas em Lisboa na primavera e as outras duas no Porto durante o período de inverno.

O alergénio isolado com maior frequência foi o Der p1, quantificado em 69% das amostras colhidas, enquanto o alergénio Der f1 foi quantificado em apenas 10% das amostras.

Na campanha de primavera realizada na cidade do Porto, verifica-se a predominância de Der f1 sendo, no entanto, na campanha de inverno que se obtém a concentração mais elevada do referido alergénio (249,12 µg/g de pó).

Tabela 1: Concentrações de alergénios Der p1 e Der f1 dos ácaros do pó doméstico e comparação com o limiar de sensibilização.

| Ácaros do pó doméstico | Mediana ¹ (µg/g pó) | P ₂₅ -P ₇₅ | Limiar de sensibilização Der 1 (µg/g de pó) | Excedências do limiar de sensibilização (% salas) |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---|---|
| Primavera (n=124) | | | | |
| Alergénio Der p1 | 0,67 | 0,46-0,83 | 2 | 16 |
| Alergénio Der f1 | 0,40* | 0,40-0,40 | | |
| Inverno (n=94) | | | | |
| Alergénio Der p1 | 0,40 | 0,40-0,64 | 2 | 6 |
| Alergénio Der f1 | 0,40 | 0,40-0,40 | | |

¹ Distribuição não normal * LQ -Limite de Quantificação

Gráfico 1: ▾ Concentrações de ácaros do pó doméstico Der p 1 e Der f 1 obtidos na primavera em Lisboa (A) e no Porto (B).

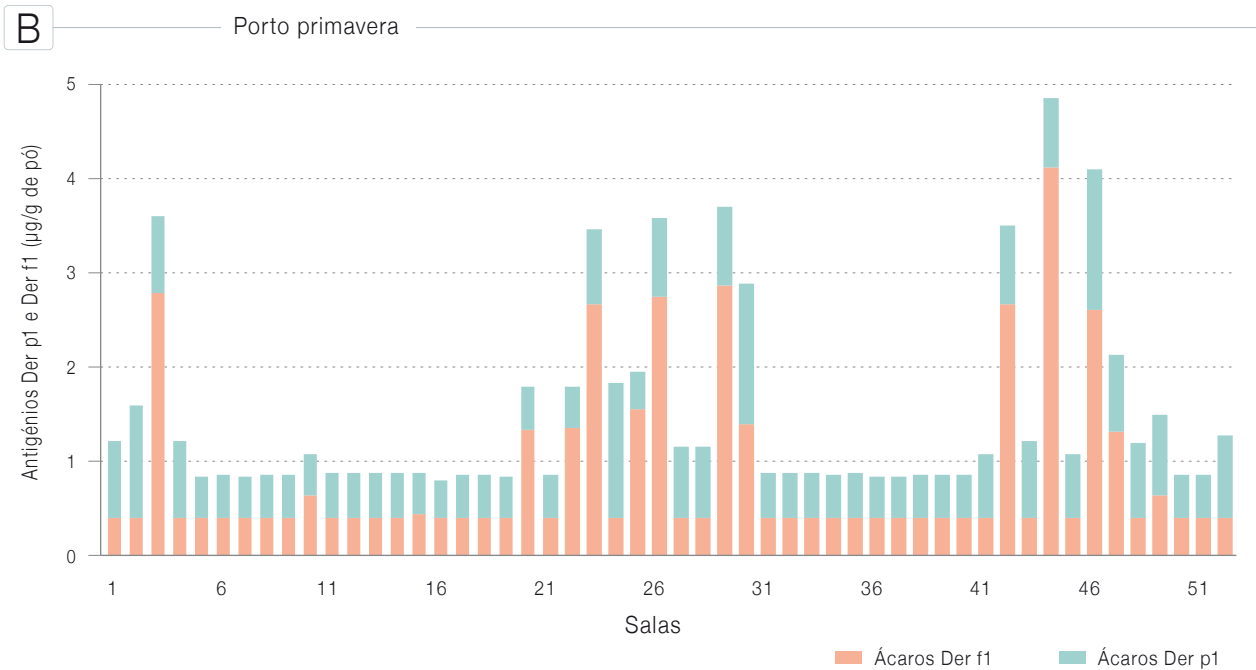
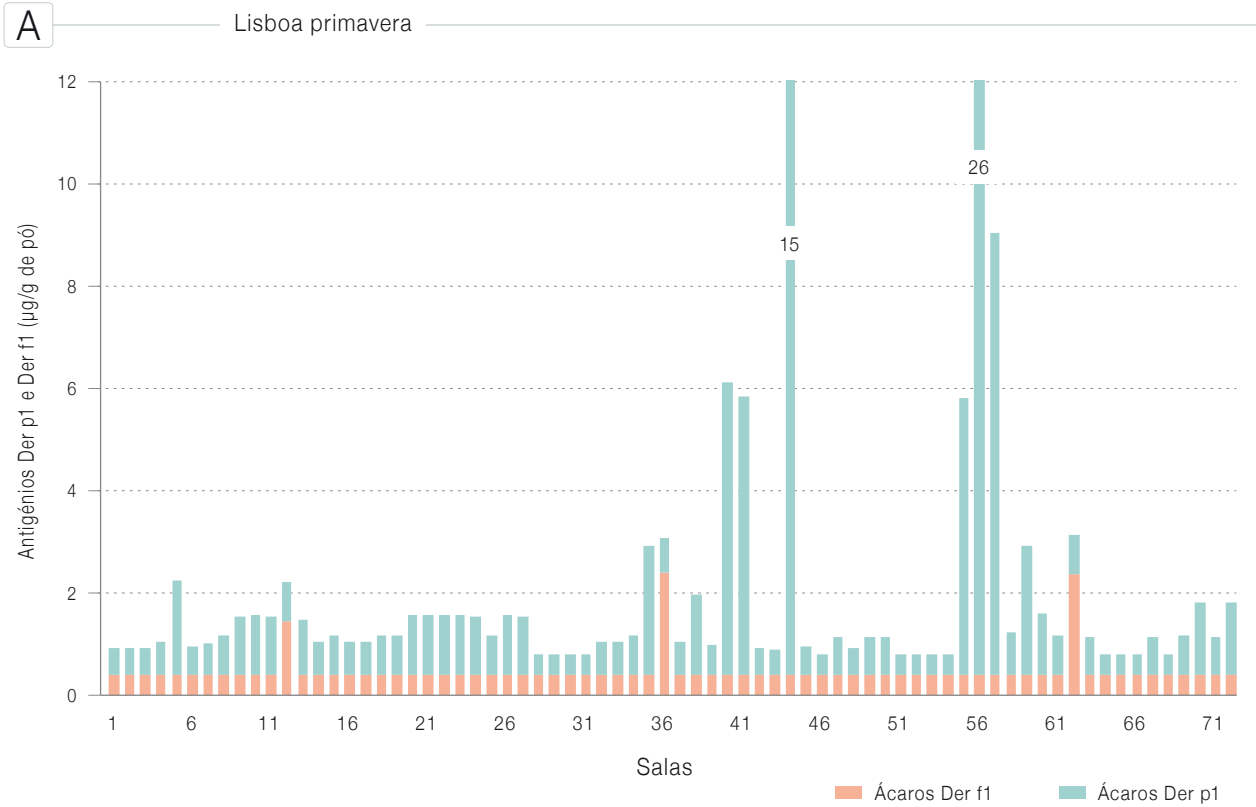
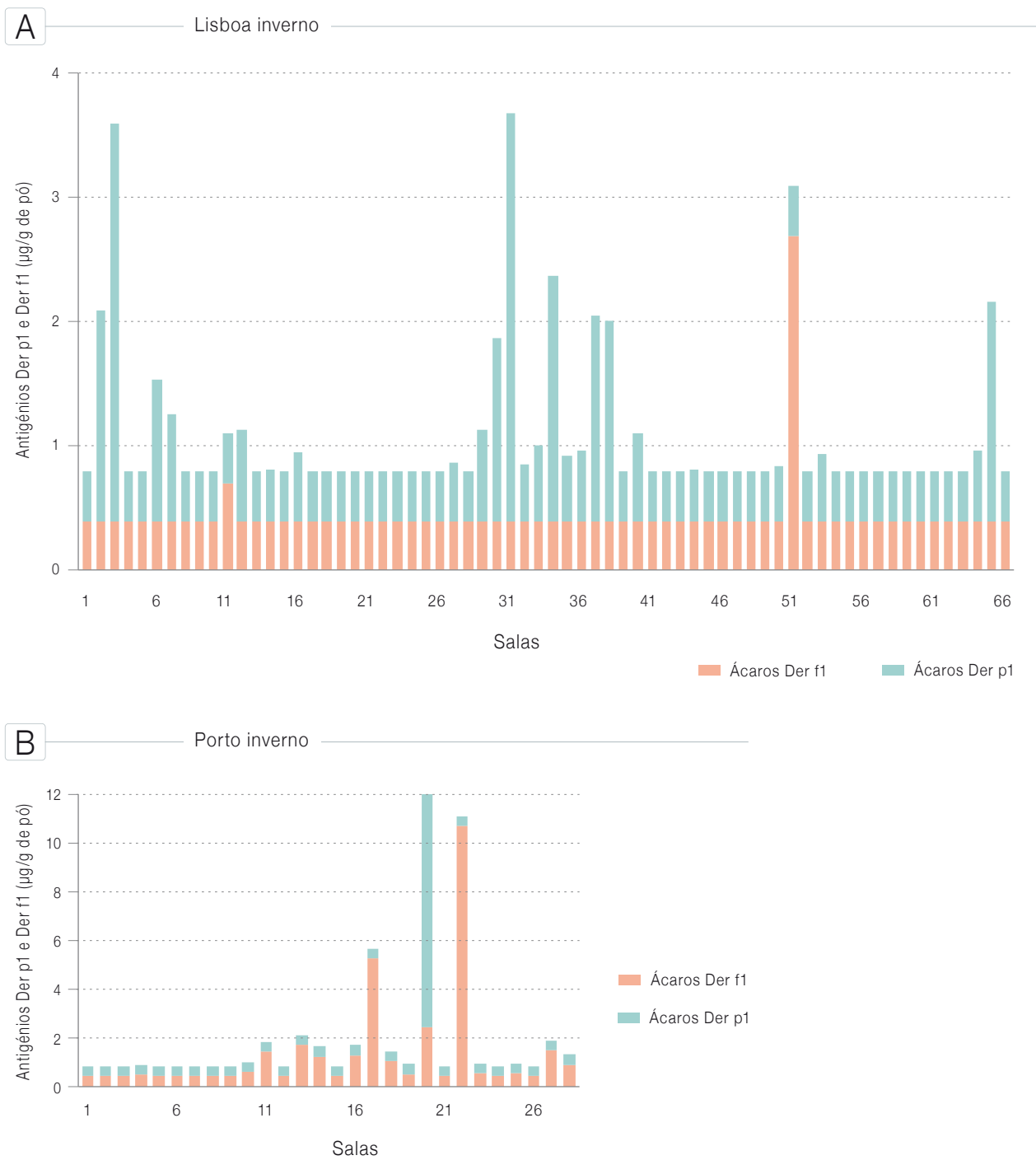


Gráfico 2: ↓ Concentrações de ácaros do pó doméstico Der p1 e Der f1 obtidos no inverno em Lisboa (A) e no Porto (B).





artigos breves_ n. 7

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a concentração de alérgenos de ácaros e as concentrações de fungos, de partículas PM₁₀ em suspensão no ar, o tipo de material do pavimento, humidade relativa do ar e temperatura do ar.

Discussão e conclusões

Em 12% das salas estudadas, em ambas as estações, as concentrações de alérgenos Der 1 foram superiores a 2 µg/g de pó, pelo que as crianças que frequentam as referidas salas se encontram em risco de desenvolver sensibilização aos ácaros do pó doméstico. Em cerca de 2% das salas existe mesmo o risco de aparecimento de sintomas de alergia em crianças previamente sensibilizadas aos ácaros do pó doméstico.

Os resultados da contaminação do ambiente interior por ácaros do pó obtidos no presente estudo são inferiores aos obtidos por Rullo *et al.*⁽⁹⁾ num estudo realizado em S. Paulo (Brasil) onde as concentrações de alérgenos Der 1 (Der p1+Der f1) foram superiores a 2 µg/g em 70% das amostras recolhidas em 30 creches/jardins-de-infância (até 4 anos).

Contudo, um outro estudo levado a cabo em 28 creches/jardins-de-infância situados em Paris obteve concentrações mais baixas de alérgenos Der p1 (0.18-7.30 µg/g pó) com uma única escola a exceder o limiar de sensibilização⁽¹⁰⁾.

A predominância de Der p1 que se verificou no presente estudo está de acordo com estudos prévios⁽¹¹⁾.

Uma vez que a temperatura, a humidade relativa e disponibilidade de alimento são os fatores que determinam o crescimento e multiplicação dos ácaros do pó nos ambientes interiores, as baixas concentrações obtidas na maioria das salas estudadas no âmbito do estudo ENVIRH devem-se, provavelmente, ao clima temperado do nosso país, com humidades relativamente baixas, à utilização de resguardos plásticos nos colchões e almofadas e ao tipo e frequência da limpeza e higienização adotados pelas creches/jardins-de-infância avaliados no estudo ENVIRH, designadamente a regular lavagem dos tapetes.

Financiamento:

Este estudo foi realizado como parte de um projeto de investigação co-financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Projeto PTDC/SAU-ESA/100275/2008 (ENVIRH).

Mais informações em: <http://envirh.fcm.unl.pt/>

Referências bibliográficas:

- (1) Bradley RH; National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) Early Child Care Research Network. Child care and common communicable illnesses in children aged 37 to 54 months. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2003;157(2):196-200.
- (2) Jaakkola JJK. Day-care centers and health. In: Spengler JD, Samet JM, McCaethy JF (eds). *Indoor Air Quality Handbook.* New York: McGraw-Hill, 2001, pp. 69.1-69.20.
- (3) Zuraimi MS, Tham KW, Chew FT, et al. The effect of ventilation strategies of child care centers on indoor air quality and respiratory health of children in Singapore. *Indoor Air.* 2007;17(4):317-27.
- (4) Cartieaux E, Rzepka MA, Cuny D. Qualité de l'air à l'intérieur des écoles. *Arch Pediatr.* 2011;18(7):789-96.
- (5) Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, et al. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(6 Pt 1):S2-24.
- (6) American Conference of Governmental Industrial Hygienists; Macher J (ed.). *Bioaerosols: Assessment and Control.* Cincinnati, Ohio: ACGIH, 2009.
- (7) Thomas KD, Dyer SM, Ciuk J, et al. Domestic exposure of asthmatic and non-asthmatic children to house dust mite allergen (Der p 1) and cat allergen Fel d 1 in Adelaide, South Australia. *Environmental Health.* 2001; 1(1) 52-60.
- (8) Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC, et al. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;89(5):1046-60.
- (9) Rullo VE, Rizzo MC, Arruda LK, et al. Daycare centers and schools as sources of exposure to mites, cockroach, and endotoxin in the city of São Paulo, Brazil. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110(4):582-8.
- (10) Roda C, Barral S, Ravelomanantsoa H, et al. Assessment of indoor environment in Paris child day care centers. *Environ Res.* 2011;111(8):1010-7.
- (11) Podder S, Biswas H, Gupta SK, et al. Life-cycle of house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) under laboratory conditions in Kolkata metropolis. *Acarina.* 2009; 17(2): 239-42.

O impacto do ambiente interior na saúde respiratória dos idosos: resultados preliminares do projeto GERIA

Ana Mendes¹, Ana Luísa Papoila², Pedro Martins³,
Iolanda Caires³, Teresa Palmeiro³, Lívia Aguiar¹,
Cristiana Pereira¹, Paula Neves¹, Amália Botelho³,
Nuno Neuparth³, João Paulo Teixeira¹

ana.sofia.mendes@insa.min-saude.pt

(1) Unidade do Ar e Saúde Ocupacional. Departamento de Saúde Ambiental, INSA, Porto.

(2) Centro de Estatística e Aplicações da Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa.

(3) Centro de Estudos de Doenças Crónicas. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa.

Introdução

Os efeitos na saúde da poluição atmosférica na população geral está bem documentado. Todos os anos são atribuídos à poluição do ar ambiente, cerca de 500.000 mortes em todo o mundo, devido a pneumonias, doença pulmonar obstrutiva crónica entre outras causas combinadas (1). Estudos sobre a poluição do ar interior demonstram também efeitos nocivos na saúde por ação de determinados poluentes. Por exemplo, a poluição atmosférica por matéria particulada está associada a causas de morbilidade e mortalidade cardiovasculares. Contudo, permanece por esclarecer quais os fatores mais críticos e respetivo tempo de exposição passíveis de causar dano à saúde em determinados grupos populacionais (2). Nesse sentido, importa investigar sobre os efeitos adversos na saúde respiratória de populações suscetíveis, tais como, os idosos.

O estudo da qualidade de vida do idoso ocupa um lugar de destaque na nossa sociedade devido às alterações demográficas nos países desenvolvidos. Os avanços da medicina e a melhoria das condições socioeconómicas da população contribuíram para o aumento da esperança média de vida. A idade média da população europeia está a aumentar e as estatísticas apontam para que a população adulta com mais de 65 anos aumente de 16% em 2000 para 20% em 2020. Portugal é o oitavo país no mundo com a população mais envelhecida e o sexto da Europa com 23% dos habitantes com mais de 60 anos de idade (3). Estudos indicam que esta

faixa etária da população despende cerca de 19-20 h/dia em ambientes interiores tornando-se mais vulneráveis a complicações de saúde associadas à poluição do ar interior. Os idosos representam uma população suscetível apresentando um sistema imunológico mais enfraquecido e uma maior prevalência de doenças crónicas e de problemas respiratórios. Vários estudos demonstram que a concentração de poluentes no interior pode ser 10-20 vezes mais elevada do que no exterior, com um impacte crescente sobre a qualidade da vida dos seus ocupantes, podendo originar ou agravar doenças sobretudo do foro respiratório e cardiovascular. Esses efeitos podem resultar no aumento do uso de medicação e visitas ao médico, bem como, mais admissões em hospital e mortes prematuras. As instituições de apoio a idosos tem vindo a incrementar em 49% no nosso país, entre 1998 e 2010 (4), por forma a prestar o apoio e condições técnicas necessárias a este grupo populacional com cada vez mais expressão na nossa sociedade.

Surge assim, o Projeto GERIA - Estudo Geriátrico dos efeitos na Saúde da Qualidade do Ar Interior em lares da 3ª Idade em Portugal, com o objetivo principal de avaliar a relação entre a Qualidade do Ar Interior (QAI) e a saúde respiratória em populações suscetíveis, promovendo a qualidade de vida nos idosos residentes em lares da 3ª idade. Este artigo resulta de um *substudy* inserido no Projeto GERIA realizado em lares da 3ª idade na cidade do Porto.

Material e métodos

Os lares da 3ª idade da cidade do Porto integrantes na 'Carta Social' (<http://www.cartasocial.pt/>) foram convidados a participar no nosso estudo. Num total de 58 lares da 3ª idade, aceitaram participar 36% (n=21, com 685 residentes). Os dados da monitorização ambiental foram recolhidos em duas fases (verão e inverno) desde novembro de 2011 a agosto de 2013 em 135 áreas diferentes dos lares, tais como salas de convívio, salas de refeição, quartos e gabinetes médicos, incluindo a avaliação de agentes químicos [partículas suspensas no ar PM₁₀ e PM_{2.5}, dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO), formaldeído e compostos orgânicos voláteis totais (COVT)], agentes biológicos (bactérias e fungos) e monitorização da temperatura e humidade relativa. Os valores obtidos foram comparados com a legislação nacional (5) e as normativas internacionais em vigor.

artigos breves_ n. 8

O questionário de saúde respiratória aplicado decorreu entre setembro de 2012 e abril de 2013, durante a fase de inverno do estudo da QAI. A versão portuguesa (6) do questionário BOLD ("Burden of Obstructive Lung Disease") (7, 8) foi aplicada, por entrevista, a todos os idosos residentes ($n=143$), que deram o seu consentimento informado e que cumpriam os critérios de inclusão do estudo. Foram estabelecidos como critérios de inclusão no estudo os participantes residentes em lar com idade ≥ 65 anos, a residir na instituição há mais de 2 semanas e possuir capacidades cognitivas e interpretativas de forma a responder ao questionário de saúde. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e pela Comissão Nacional de Proteção de Dados.

Os dados categóricos foram apresentados como frequências e percentagens e as variáveis contínuas como mediana e intervalo interquartil (percentil 25, percentil 75) ou o intervalo (min-max). Devido ao facto de a maioria dos pontos de amostragem não serem os mesmos em ambas as estações, as duas amostras foram considerados independentes. Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para comparar a avaliação de efeitos sazonais, devido à existência de *outliers*, alta variabilidade e distribuição heterogénea. Os principais resultados da saúde foram pieira, tosse, expetoração, asma e rinite alérgica. Modelos mistos de regressão logística foram utilizados para estudar a associação entre os resultados de saúde e os parâmetros ambientais, ajustado para idade, tabagismo, sexo e o número de anos a residir no lar da 3ª idade. Os intervalos de 95% de confiança (IC) foram também calculados sempre que apropriado. Um nível de significância de 0,05 foi utilizado para todas as análises. Os dados foram analisados com o IBM SPSS 21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA) e STATA® 12,0. (StataCorp LP, Stata Statistical Software; TX, EUA).

_ Principais resultados

A **tabela 1** apresenta os resultados da monitorização do ambiente interior nos lares da 3ª idade, por estação do ano. A mediana da concentração de $PM_{2.5}$ nos 21 lares da 3ª idade analisados apresentou-se acima das referências nacionais ($25 \mu\text{g}/\text{m}^3$) (5) em ambas as estações. Estes resultados demonstram como este parâmetro é fundamental para a qualidade do ar, tanto pela sua sensibilidade como pela sua possível influência na saúde humana.

Embora todos os outros poluentes do ar interior apresentem as medianas das concentrações dentro dos níveis de referência, os valores máximos de PM_{10} ($1730 \mu\text{g}/\text{m}^3$) no verão, bem como, COVT ($973 \mu\text{g}/\text{m}^3$; $931 \mu\text{g}/\text{m}^3$), CO_2 ($2313 \text{mg}/\text{m}^3$; $2697 \text{mg}/\text{m}^3$) e bactérias ($2282 \text{UFC}/\text{m}^3$; $996 \text{UFC}/\text{m}^3$) no verão e no inverno respetivamente, ultrapassaram os níveis de referência, o que poderá comprometer o conforto do ar interior e potenciar o agravamento das doenças respiratórias crónicas já existentes. A mediana da concentração de fungos apresentou-se ligeiramente acima das referências na época de inverno ($185 \text{UFC}/\text{m}^3$ interior $> 166 \text{UFC}/\text{m}^3$ exterior). Os valores máximos no ar interior em ambas as estações do ano avaliadas causam também preocupação (verão: $2224 \text{UFC}/\text{m}^3$; inverno: $1218 \text{UFC}/\text{m}^3$), bem como, 4% das amostras apresentaram resultados positivos para *Aspergillus species*, conhecidos como potenciais espécies patogénicas e toxigénicas que podem constituir um risco para a saúde respiratória de populações suscetíveis (9), tais como, os idosos. Os COVT, bactérias, CO e CO_2 apresentaram concentrações significativamente mais elevadas no interior em relação ao exterior, em ambas as estações, o que mostra predominância de fontes internas. Os COVT e CO_2 no ar interior apresentaram também diferenças significativas nas suas concentrações entre estações do ano ($p < 0,001$). Houveram igualmente diferenças significativas, entre as diferentes áreas avaliadas nos lares (salas de convívio, salas de refeição, gabinetes médicos, quartos e quartos de acamados), para os parâmetros COVT ($p < 0,001$), CO_2 ($p < 0,001$) e bactérias ($p < 0,001$). A comparação entre as referências nacionais e internacionais foi explorada num estudo anterior de QAI no âmbito do projeto GERIA (10).

Dos 668 idosos que residiam nos lares da 3ª idade estudados, 21% ($n = 143$) cumpriam os critérios de inclusão e concordaram em responder ao questionário de saúde respiratória. A **tabela 2** apresenta as características gerais dos idosos participantes. A amostra é caracterizada principalmente por mulheres (85%), com a maioria das pessoas na faixa etária acima de 85 anos de idade (47%). Sessenta por cento dos residentes são viúvos e habitam nos lares entre 2 a 10 anos (58%). Em relação à ocupação anterior da maioria dos inquiridos, pertenciam à classe de trabalho manual e indiferenciado (57%) com ensino básico primário e médio (EB2) (65%). Quarenta

Tabela 1: Estatística descritiva do ambiente interior nos lares da 3ª idade, por estação do ano.

| | n | Mediana [P ₂₅ -P ₇₅] | Min-Max | p | Referências | |
|---|-----|---|------------------|--------|---|---|
| | | | | | Internacional | Nacional |
| PM₁₀ (µg/m³) | | | | | | |
| VERÃO | 133 | 40 [20-70] | [20-1730] | 0.01* | 150 ^a | 50 ⁱ |
| INVERNO | 132 | 50 [30-70] | [20-86] | | | |
| PM₂₅ (µg/m³) | | | | | | |
| VERÃO | 120 | 30 [20-68] | [20-2120] | - | 35 ^a | 25 ⁱ |
| INVERNO | 119 | 30 [20-60] | [20-43] | | | |
| COVT (µg/m³) | | | | | | |
| VERÃO | 123 | 48 [30-90] | [14-973] | 0.01* | 200 ^b | 600 ⁱ |
| INVERNO | 132 | 78 [47-134] | [14-931] | | | |
| Formaldeído (mg/m³) | | | | | | |
| VERÃO | 77 | < 42 [$< 42 - < 42$] | [$< 42 - 63$] | - | 100 ^c | 100 ⁱ |
| INVERNO | 84 | < 42 [$< 42 - < 42$] | [$< 42 - 320$] | | | |
| CO (µg/m³) | | | | | | |
| VERÃO | 131 | 0.1 [0.1-0.6] | [0.1-7.1] | - | 10 ^c | 10 ⁱ |
| INVERNO | 131 | 0.3 [0.1-0.9] | [0.1-3.0] | | | |
| CO₂ (µg/m³) | | | | | | |
| VERÃO | 131 | 721 [628-820] | [538-2313] | 0.001* | 1300 ^d | 2250 ⁱ |
| INVERNO | 131 | 975 [762-1321] | [541-2697] | | | |
| Bactérias (CFU/m³) | | | | | | |
| VERÃO | 131 | 254 [142-392] | [6-2282] | 0.01* | - | < Exterior (até 350 CFU/m ³ mais) ⁱ |
| INVERNO | 127 | 182 [102-398] | [14-996] | | | |
| Fungos (CFU/m³) | | | | | | |
| VERÃO | 126 | 211 [119-386] | [6-2224] | - | 500 ^e | 143 |
| INVERNO | 124 | 185 [101-302] | [18-1218] | | | |
| Temperatura (°C) | | | | | | |
| VERÃO | 131 | 24 [22-26] | [14-32] | 0.001* | Verão [22,8 - 26,1] Inverno [20,0 - 23,6] ^f | 230 |
| INVERNO | 131 | 20 [18-22] | [13-27] | | | |
| Humidade relativa (%) | | | | | | |
| VERÃO | 131 | 56 [41-63] | [21-75] | - | [30-65] ^g | [18-22] até 25 ^j [50-70] ⁱ |
| INVERNO | 131 | 53 [39-61] | [5-75] | | | |

^a Environmental Protection Agency (2012); ^b European Collaborative Action (1997); ^c World Health Organization (2010); ^d Finnish Society of Indoor Air Quality in 'The Thade Report' (2004); ^e World Health Organization (2009); ^f ASHRAE 55; ^g IAQA 01-2003; ^h ISO 7730:2005; ⁱ Portaria n.º 353-A/2013 de 4 de dezembro; ^j Decreto-Lei n.º 243/86 de 20 de agosto de 1986. * Diferenças significativas nos parâmetros avaliados por estação do ano (verão e inverno).

artigos breves_ n. 8

por cento dos inquiridos autoconsideraram-se doentes e a maioria deles (61%) apresentava um grau de enfraquecimento físico, mobilidade reduzida ou estavam acamados. Em relação aos não-respondentes (79%) também eram em sua maioria mulheres (62%), onde 53% residiam em lar entre 2 a 10 anos, e 46% tinham mais de 85 anos de idade. As causas conhecidas desta alta taxa de não-resposta foram invalidez e a doença comprometendo as capacidades cognitivas e interpretativas para responder ao questionário (60%).

Tabela 2: Características dos participantes idosos (n=143).

| | n (%) |
|---|------------|
| Género | |
| Feminino | 121 (84,6) |
| Masculino | 22 (15,4) |
| Faixa etária | |
| [65-75] | 19 (13,2) |
| [76-85] | 57 (39,9) |
| > 85 | 67 (46,9) |
| Estado civil | |
| Solteiro | 36 (25,5) |
| Casado | 11 (7,8) |
| Divorciado | 9 (6,4) |
| Viúvo | 85 (60,3) |
| Educação | |
| Analfabeto, ler e escrever | 22 (15,6) |
| Primária (EB1) e/ou EB2 | 91 (64,5) |
| Secundário e/ou Universidade | 28 (19,9) |
| Ocupação (anterior) | |
| Administrativo e científico | 33 (23,1) |
| Serviços e vendas | 29 (20,3) |
| Trabalho manual e indiferenciado | 81 (56,6) |
| N.º de anos a residir em lar | |
| ≤ 1 ano | 37 (25,9) |
| [2-10] | 83 (58,0) |
| > 11 | 23 (16,1) |
| Mobilidade física debilitada e acamados | 85 (61,2) |
| Considerar-se doente | 52 (40,3) |

Entre os idosos inquiridos (tabela 3), a tosse (23%) e expetoração (12%) foram os sintomas respiratórios mais comuns e a rinite alérgica (22%) a principal doença reportada. Os problemas cardíacos foram referidos por 37% dos residentes. As pessoas idosas expostas a PM₁₀ acima dos níveis de referência apresentaram 3 vezes maior probabilidade de ter rinite alérgica (OR = 2,9, IC 95%: 1,1-7,2). Para cada aumento de grau na temperatura há uma diminuição de 20% na probabilidade de ter rinite alérgica (OR = 0,8, 95%: 0,6-1,0). Nenhuma associação foi encontrada entre o ambiente interior e sintomas respiratórios.

Tabela 3: Resultados do questionário BOLD (n=143).

| | n (%) |
|---|-----------|
| Costuma ter Tosse, habitualmente? | 33 (23,1) |
| Costuma deitar fora Expetoração do seu peito? | 17 (11,9) |
| Já alguma vez teve um ataque de Pieira no peito que o tenha feito sentir dificuldade em respirar? | 31 (21,7) |
| Teve alguma vez Pieira nos últimos 12 meses? | 15 (10,5) |
| Já algum médico lhe disse que tinha Enfisema? | 2 (1,4) |
| Já algum médico lhe disse que tinha Asma? | 12 (8,4) |
| Ainda tem Asma? | 7 (4,9) |
| Já algum médico lhe disse que tinha Rinite Alérgica? | 31 (21,7) |
| Já algum médico lhe disse que tinha Problemas de Coração? | 52 (36,6) |
| Alguma vez trabalhou durante um ano ou mais num lugar poeirento? | 30 (21,7) |
| Já alguma vez fumou cigarros? | 28 (19,6) |

_Conclusões

O ambiente interior tem uma potencial influência nos sintomas respiratórios crónicos de pessoas idosas que residem nos lares da 3ª idade, devido à sua suscetibilidade na saúde e a uma diminuição das defesas imunitárias e função respiratória. Nos lares da 3ª idade que participaram deste estudo destacam-se as principais conclusões: (i) a tosse e expetoração foram os principais sintomas respiratórios e rinite alérgica a principal doença reportada; (ii) a mediana da concentração de PM_{2,5} apresentou-se acima dos níveis de referência, tanto no inverno como no verão; (iii) os valores máximos de



artigos breves_ n. 8

PM₁₀, COVT, CO₂, bactérias e fungos ultrapassaram os níveis de referência, o que pode comprometer o conforto do ar interior, agravando as doenças respiratórias crónicas dos idosos; (iv) as pessoas idosas expostas a PM₁₀ acima dos níveis de referência têm maior risco de rinite alérgica.

Tendo em vista a melhoria da QAI dos lares da 3ª idade, sugere-se a implementação de medidas adequadas, tais como, sistemas de exaustão local perto de cozinhas e dispositivos de queima de gás, bem como, a limpeza diária ligeiramente humedecida das superfícies dos diversos locais avaliados, por forma a reduzir a acumulação e ressuspensão de partículas. As baixas temperaturas interiores e respetivo desconforto associado, especialmente no inverno, poderá ser evitado por medidas simples, tais como a implementação de isolamento no teto, paredes e janelas, mantendo a ventilação natural e passiva dos espaços.

_Financiamento

Este projeto é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FTC) PTDC/SAU-SAP/116563/2010 e SFRH/BD/72399/2010, e pelo Programa Operacional Fatores de Competitividade (COMPETE) do Quadro de Referência Estratégico Nacional para Portugal 2007-2013.

Referências bibliográficas:

- (1) Bentayeb M, Simoni M, Baiz N, et al. Geriatric Study in Europe on Health Effects of Air Quality in Nursing Homes Group. Adverse respiratory effects of outdoor air pollution in the elderly. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(9):1149-61. Review
- (2) Wilker EH, Alexeeff SE, Suh H, et al. Ambient pollutants, polymorphisms associated with microRNA processing and adhesion molecules: the Normative Aging Study. *Environ Health.* 2011;10:45. [LINK](#)
- (3) Almeida-Silva M, Wolterbeek HT, Almeida SM. Elderly exposure to indoor air pollutants. *Atmos. Environ.* 2014;85:54-63.
- (4) Ministério da Solidariedade e da Segurança Social. Carta Social e Rede de Serviços e Equipamentos: elatório 2010. Lisboa: MSSS/GEP, 2012. [LINK](#)
- (5) Ministério do Ambiente Ordenamento do Território e Energia, Ministério da Saúde, Ministério da Solidariedade Emprego e Segurança Social. Portaria n.º 353-A/2013, de 4 de dezembro. DR, 1ª Série, nº 235(supl1):6644(2)-(9). Estabelece os valores mínimos de caudal de ar novo por espaço, bem como os limiares de proteção e as condições de referência para os poluentes do ar interior dos edifícios de comércio e serviços novos, sujeitos a grande intervenção e existentes e a respetiva metodologia de avaliação
- (6) Martins P, Rosado-Pinto J, do Céu Teixeira M, et al. Under-report and underdiagnosis of chronic respiratory diseases in an African country. *Allergy.* 2009;64(7):1061-7.
- (7) Buist AS, Vollmer WM, Sullivan SD, et al. The Burden of Obstructive Lung Disease Initiative (BOLD): rationale and design. *COPD.* 2005;2(2):277-83.
- (8) Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: NHLBI/WHO workshop report. Washington: National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute, 2001. (NIH Publication No. 2701). [LINK](#)
- (9) Aguiar L, Mendes A, Pereira C, et al. Biological air contamination in elderly care centers: geria project. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(14-16):944-58.
- (10) Mendes A, Bonassi S, Aguiara L, et al. Indoor air quality and thermal comfort in elderly care centers. *Urban Climate.* 2014. doi:10.1016/j.uclim.2014.07.005. Epub 2014 Aug 2.



Estudo do potencial genotóxico do formaldeído em contexto profissional: projeto GenFA

Solange Costa¹, Carla Costa¹, Patrícia Coelho¹, Susana Silva¹,
Lívia Aguiar¹, Beatriz Porto², João Paulo Teixeira¹

solange.costa@insa.min-saude.pt

(1) Unidade do Ar e Saúde Ocupacional. Departamento de Saúde Ambiental, INSA, Porto.

(2) Laboratório de Citogenética. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.

Introdução

O Formaldeído (FA) é um dos compostos químicos mais utilizados em todo o mundo, apresentando-se, em condições normais de pressão e temperatura, como um gás incolor de odor característico e intenso. A sua aplicação é multifacetada e transversal a praticamente todas as atividades, sendo que a exposição humana a este composto assume particular importância a nível industrial e no sector da saúde, onde é bastante utilizado. Ao longo das últimas duas décadas vários estudos epidemiológicos revelaram uma associação entre a exposição ocupacional a este aldeído e incidência de cancro nasofaríngeo e leucemia (do tipo mieloide) entre trabalhadores do sector industrial e da saúde (1-4). Com base nestes estudos e em dados obtidos em ensaios experimentais com animais, o estatuto de carcinogenicidade do FA foi revisto pelas principais agências mundiais de saúde e recentemente reclassificado como agente carcinogénico humano (5-7). No entanto, alguns investigadores defendem que não há dados biológicos suficientes para assumir uma relação causal entre a exposição a FA e o risco de leucemia, dada a reactividade do composto que limitará o seu efeito ao local de primeiro contacto (nariz e boca) (8-10). O potencial genotóxico do FA está largamente descrito tanto *in vitro* como *in vivo*, de bactérias até roedores (7). No entanto, em estudos de biomonitorização humana, o carácter genotóxico do FA é inconclusivo, e carece de mais investigação em especial no que concerne ao seu efeito em tecidos distantes do local de absorção. Vários estudos, nacionais e internacionais, apontam os laboratórios de anatomia patológica como sendo um dos cenários ocupacionais em que os trabalhadores estão expostos a níveis de FA que exce-

dem os valores limites regulamentados (11-15). Nestes laboratórios decorrem atividades que implicam a libertação de vapores de FA pela utilização de formol (solução aquosa de FA). Este produto é um fixador de tecidos bastante eficiente, sendo, por isso, o eleito em procedimentos de rotina anatomopatológicos. A principal via de entrada do FA no organismo é a inalatória, atingindo sobretudo as vias respiratórias superiores.

Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a exposição ocupacional a FA em profissionais dos Serviços Hospitalares de Anatomia Patológica, utilizando para isso uma abordagem múltipla de modo a relacionar diferentes tipos de biomarcadores de dose e efeito. A integração dos resultados dos diferentes biomarcadores estudados permitir-nos-á investigar a relação entre a exposição ao FA e possíveis efeitos biológicos adversos, consequentes da exposição profissional a este composto. O conjunto de dados reunidos contribui para a caracterização da exposição a FA num contexto profissional específico, podendo, deste modo, revelar-se particularmente útil para reforçar a necessidade de alterar as práticas de trabalho de forma a salvaguardar a saúde dos profissionais. Por outro lado, a informação recolhida será útil para as entidades responsáveis em definir os níveis aceitáveis para a exposição ocupacional a FA e para os serviços que têm a seu cargo a vigilância da saúde dos trabalhadores.

Material e métodos

Foi estudada uma população de 85 profissionais dos Serviços Hospitalares de Anatomia Patológica, expostos ao FA no seu ambiente de trabalho e 87 indivíduos com historial ocupacional de não exposição ao FA e com características demográficas, de idade, sexo, hábitos tabágicos e dieta semelhantes ao grupo exposto.

As características sociodemográficas dos dois grupos estudados, controlo e exposto, estão descritas na **tabela 1**. Todos os indivíduos que aceitaram participar no estudo foram informados e esclarecidos dos objetivos do trabalho em curso e, após terem manifestado o seu consentimento por escrito, respeitando a Declaração de Helsínquia de 1975 revista em 1989 responderam a um inquérito epidemiológico visando a avaliação de factores sociodemográficos e outros

potenciais factores de risco associados com a exposição a compostos reconhecidos como cancerígenos (hábitos tabágicos, Raios X, entre outros). Os indivíduos do grupo exposto responderam, ainda, a um inquérito contendo questões relacionadas com a sua actividade laboral (uso de equipamento de protecção individual, anos de actividade profissional, entre outros).

Tabela 1: Características da população estudada.

| | Controlos (n=87) | Expostos (n=85) | p-value |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Género | | | 0.921 ^b |
| Feminino | 67 (77%) | 66 (78%) | |
| Masculino | 20 (23%) | 19 (22%) | |
| Idade (anos) ^a | 38.9 ± 11.0 | 39.8 ± 9.5 | 0.571 ^c |
| Anos de trabalho ^a | | 12.0 ± 8.2 | |
| Hábitos tabágicos | | | |
| Não-fumadores | 65 (75%) | 64 (75%) | |
| Fumadores | 22 (25%) | 21 (25%) | |
| Anos fumador ^a | 21.7 ± 11.3 | 20.4 ± 11.0 | 0.704 ^c |
| Cigarros/dia ^a | 13.7 ± 6.9 | 11.0 ± 5.8 | 0.160 ^c |
| Maço/ano ^a | 14.8 ± 11.5 | 11.2 ± 8.1 | 0.248 ^c |

^a Média ^b Teste Qui-quadrado (bilateral) ^c Teste t- Student ± Desvio padrão

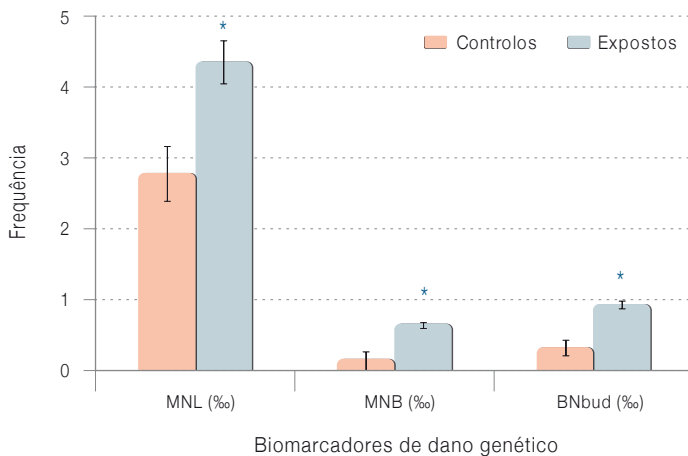
A avaliação da exposição ocupacional a FA foi realizada pela medição da concentração do FA no ar no local de trabalho e pela análise de diferentes indicadores biológicos. Para estimar o nível de exposição do FA nos Serviços de Anatomia Patológica recorreu-se à amostragem contínua de ar no posto de trabalho, representativa do ar inalado pelos trabalhadores e ao cálculo da concentração média ponderada (TWA) expressa em ppm, tendo em conta a jornada de trabalho. Os níveis de ácido fórmico na urina foram quantificados (mg/g creatinina), por forma a estudar a sua potencial aplicação como biomarcador de dose interna de exposição ocupacional a FA. O estudo do dano genético foi avaliado em linfócitos do sangue periférico através de diversos biomarcadores de efeito, nomeadamente alterações citogenéticas, como formação de micronúcleos (MN) avaliada em 1000 células binucleadas/indivíduo (%) e trocas entre cromátídeos irmãos (SCE) analisadas 50 metáfases/indivíduo

e dano a nível do ADN, mediante o teste do cometa (% de ADN na cauda). A frequência de MN em células da mucosa bucal foi contabilizada em 2000 células diferenciadas/indivíduo, a média foi estimada em 1000. A frequência de protusões nucleares (BNbuds) também foi analisada nas células da mucosa bucal. As alterações citogenéticas encontram-se entre os biomarcadores de efeito mais utilizados em estudos de biomonitorização humana, estando largamente documentado o seu papel como preditores de possíveis efeitos nocivos na saúde resultantes da exposição a genotóxicos (16-18), sobretudo do risco de ocorrência futura de cancro, como é exemplo a frequência de MN em linfócitos humanos (19).

_Resultados

Para o grupo de trabalhadores estudados, tendo em conta a jornada de trabalho obteve-se um valor médio de exposição ao FA de 0.38 ± 0.03 ppm. O grupo exposto apresentou em média valores urinários de ácido fórmico (mg/g creatinina) estatisticamente superiores ao grupo controlo (17.46 ± 1.33 vs. 11.53 ± 0.95), no entanto não foi observada associação com os níveis de exposição no ar. Os resultados obtidos para os indicadores biológicos de genotoxicidade revelaram que os indivíduos expostos apresentaram, em média, maior dano genético comparativamente aos indivíduos do grupo controlo. Foi observado no grupo exposto em relação ao controlo um aumento significativo na frequência de SCE/célula (5.08 ± 0.12 vs. 4.01 ± 0.11) e na % de ADN na cauda, indicador de dano no ADN (11.67 ± 0.72 vs. 7.50 ± 0.47). Observou-se ainda, nos trabalhadores, um aumento significativo na frequência de MN% em linfócitos (MNL) e em células da mucosa bucal (MNB) (gráfico 1). Foram encontradas associações (positivas) estatisticamente significativas entre a frequência de MN em ambos os tecidos (r=0.359, p<0.001), a duração (MN em linfócitos; r=0.277, p=0.011) e os níveis de exposição a FA (MN bucais; r=0.407, p=0.001), o que confirma a sensibilidade deste biomarcador para avaliar o efeito genotóxico do FA em indivíduos ocupacionalmente expostos. Nas células bucais dos indivíduos expostos foi também encontrado um aumento significativo de BNbuds comparativamente com os controlos. Dados recentes indicam que a formação de BNbuds está associada ao mecanismo que a célula usa para remover o material genético amplificado ou em excesso; os BNbuds servem por isso de bioindicadores de amplificação genética ou de alteração de carga genética celular (20).

Gráfico 1: ↓ Frequência no grupo controlo e exposto de micronúcleos em linfócitos (MNL) e de micronúcleos (MNB) e protusões nucleares (BNbud) em células epiteliais da mucosa bucal.



* $p < 0.001$, significativamente diferente do grupo controlo, Mann-Whitney U-test.

Discussão e conclusão

No presente estudo constatou-se que os profissionais dos Serviços de Anatomia Patológica estão em média expostos a níveis de FA que excedem valores recomendados internacionalmente (0.3 ppm) e pelo Comité Científico em matéria de Limites de Exposição Ocupacional mandatado pela Comissão Europeia (0.2 ppm) (6, 21). A exposição dos profissionais a vapores de FA ocorre principalmente durante o exame macroscópico das peças cirúrgicas conservadas em formol (registo das peças) e no despejo desse mesmo formol aquando da eliminação das peças para posterior tratamento como resíduos hospitalares (despejo e lavagem das peças).

No grupo estudado foi observado um aumento significativo na frequência de biomarcadores de dano genético comparativamente com o grupo controlo. No caso dos MN, o aumento foi observado quer em células de tecido alvo (boca) quer em células-sentinela (linfócitos de sangue periférico), tendo sido encontrada uma associação positiva e significativa na formação de MN em ambos os tecidos. Significam estes resultados que o FA inalado induziu o mesmo tipo de dano no local de primeiro contacto e em células de circulação sistémica (linfócitos) o que vem reforçar a plausibilidade biológica da exposição humana a FA induzir dano genotóxico em outros tecidos para além do tecido de primeiro contacto, nomeadamente em células-sentinela como os linfócitos.

Face ao exposto, torna-se necessário tomar medidas de controlo. A primeira abordagem no controlo da exposição a um produto químico perigoso é analisar a possibilidade da sua substituição. Na sua impossibilidade, devem adotar-se medidas que reduzam ao mínimo o risco de exposição profissional, nomeadamente a implementação de boas práticas de trabalho e a formação dos trabalhadores nesses princípios. Os trabalhadores deverão também ser informados sobre a correta utilização dos meios de prevenção (coletiva e individual) e sua manutenção, de modo a minimizar os riscos inerentes às suas atividades. Paralelamente deverá proceder-se a melhorias nos locais de trabalho nomeadamente no que diz respeito às condições de exaustão, ventilação e climatização nos laboratórios de registo e despejo de peças bem como nas salas de reservas de peças (caso sejam usados armários recomenda-se que sejam ventilados). No caso da tarefa de despejo de peças é possível reduzir ou mesmo eliminar a exposição por contratação de serviços especializados na eliminação de resíduos hospitalares no qual se procede à entrega dos contentores de reserva. Deve ser também assegurado um programa de vigilância da saúde dos trabalhadores que permita uma avaliação contínua dos riscos na saúde de natureza profissional e subsidie medidas e ações preventivas adequadas ao controle da exposição.

Financiamento

Este projeto foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FTC) (ref: SFRH/BD/46929/2008 e PTDC/SAU-ESA/102367/2008) e pelo Programa Operacional Potencial Humano do Quadro de Referência Estratégico Nacional para Portugal 2007-2013 (tipo 4.1).

Referências bibliográficas:

- (1) Hauptmann M, Lubin JH, Stewart PA, et al. Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *Am J Epidemiol*. 2004;159(12):1117-30. [LINK](#)
- (2) Beane Freeman LE, Blair A, Lubin JH, et al. Mortality from solid tumors among workers in formaldehyde industries: an update of the NCI cohort. *Am J Ind Med*. 2013;56(9):1015-26.
- (3) Hauptmann M, Stewart PA, Lubin JH, et al. Mortality from lymphohematopoietic malignancies and brain cancer among embalmers exposed to formaldehyde. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(24):1696-708. [LINK](#)
- (4) Zhang L, Steinmaus C, Eastmond DA, et al. Formaldehyde exposure and leukemia: a new meta-analysis and potential mechanisms. *Mutat Res*. 2009;681(2-3):150-68.
- (5) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxy-2-propanol. Lyon: WHO/IARC, 2006:39-325 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human; 88). [LINK](#)
- (6) NTP 12th Report on Carcinogens. Washington. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, 2011:195-205 pp.

artigos breves_ n. 9

- (7) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations. Lyon: WHO/IARC, 2012: 401-435 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human; 100F). [LINK](#)
- (8) Heck Hd, Casanova M. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004;40(2):92-106.
- (9) Franks SJ. A mathematical model for the absorption and metabolism of formaldehyde vapour by humans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;206(3):309-20.
- (10) Speit G. The implausibility of systemic genotoxic effects measured by the comet assay in rats exposed to formaldehyde. *J Proteome Res.* 2006;5(10):2523-4.
- (11) Keil CB, Akbar-Khazandeh F, Konecny KA. Characterizing formaldehyde emission rates in a gross anatomy laboratory. *Appl Occup Environ Hyg.* 2001;16(10):967-72.
- (12) Viegas S, Ladeira C, Nunes C, et al. Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: a study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. *J Occup Med Toxicol.* 2010;5(1):25. [LINK](#)
- (13) Ladeira C, Viegas S, Carolino E, et al. Genotoxicity biomarkers in occupational exposure to formaldehyde--the case of histopathology laboratories. *Mutat Res.* 2011;721(1):15-20.
- (14) Shaham J, Gurvich R, Kaufman Z. Sister chromatid exchange in pathology staff occupationally exposed to formaldehyde. *Mutat Res.* 2002;514(1-2):115-23.
- (15) Costa S, Coelho P, Costa C, Silva S, Mayan O, Santos LS, Gaspar J, Teixeira JP. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology.* 2008;252(1-3):40-8.
- (16) Farmer PB, Sepai O, Lawrence R, et al. Biomonitoring human exposure to environmental carcinogenic chemicals. *Mutagenesis.* 1996;11(4):363-81.
- (17) Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett.* 2004;149(1-3):309-34.
- (18) Garaj-Vrhovac V, Durinec M, Kopjar N, et al. A survey on the cytogenetic status of the Croatian general population by use of the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res.* 2008;649(1-2):91-100. Epub 2007 Sep 12.
- (19) Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007; 28(3):625-31. Epub 2006 Sep 14. [LINK](#)
- (20) Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011;26(1):125-32.
- (21) European Commission. Scientific Committee on Occupational Exposure Limit Values. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Formaldehyde. Brussels: SCOEL, 2008. (SCOEL/SUM/125). [LINK](#)



Avaliação de dano genético em agricultores: agricultura biológica e tradicional

Carla Costa, Susana Silva, Solange Costa, João Paulo Teixeira

carla.trindade@insa.min-saude.pt

Unidade do Ar e Saúde Ocupacional, Departamento de Saúde Ambiental, INSA, Porto.

Introdução e objetivo

Os pesticidas são produtos químicos, de origem natural ou sintética, utilizados na eliminação ou controlo de pragas. Ao longo dos anos, os efeitos dos pesticidas tornaram-se um foco de preocupação não só pelas intoxicações agudas pelas quais podem ser responsáveis mas também pelos seus diversos efeitos crónicos observáveis no ambiente, nos animais e também no Homem. Estes compostos são extremamente importantes em diversos sectores económicos mas são maioritariamente utilizados na agricultura (1).

Nos últimos anos, a agricultura biológica tem vindo a crescer em Portugal, assumindo já um papel relevante no panorama da agricultura portuguesa. Neste tipo de agricultura, o uso de produtos fitofarmacêuticos é fortemente restringido pelo que se espera que este tipo de agricultura tenha um impacto diferente não só nos produtos e no ambiente, como também no agricultor. Até agora, foram apenas publicados estudos relativos à qualidade do esperma de indivíduos envolvidos em agricultura tradicional e biológica mas os resultados obtidos mostraram-se contraditórios (2,3).

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o dano genético em trabalhadores de agricultura biológica e de agricultura tradicional recorrendo a biomarcadores de efeito.

Material e métodos

Os indivíduos que constituem os grupos de agricultores (biológica e tradicional) foram contactados através de associações de agricultores. Os indivíduos da população controlo (com características demográficas, de idade, sexo, estilos de vida e hábitos tabágicos, semelhantes aos restantes dois grupos) foram selecionados entre indivíduos com historial ocupacional de não exposição a estes com-

postos. Todos os indivíduos participaram de forma voluntária e manifestaram o seu consentimento informado por escrito.

Os participantes responderam a um questionário visando a avaliação de fatores demográficos e sociais e outros potenciais fatores de risco associados com a exposição a compostos reconhecidos como cancerígenos (hábitos tabágicos, raios X, entre outros). Em simultâneo, foi colhida uma amostra de 10 mL de sangue para o doseamento dos biomarcadores de genotoxicidade. As amostras foram codificadas e imediatamente transportada para o laboratório.

O ensaio de micronúcleo em linfócitos (MNL) foi realizado de acordo com o previamente descrito por Teixeira *et al.*, 2004 (4). Na análise de micronúcleos em reticulócitos (MN-RET) seguiu-se o protocolo descrito em Costa *et al.*, 2011 (5). O teste de aberrações cromossómicas (AC) e teste do cometa foram realizados conforme apresentado por Roma-Torres *et al.*, 2006 (6) e Costa *et al.*, 2008 (7), respetivamente. Na análise de resultados do teste do cometa, foi analisado o indicador intensidade da cauda (IC).

Resultados e discussão

As características sociodemográficas dos três grupos estudados, estão descritas na **tabela 1**. Nos três grupos, a média de idades e a proporção entre homens e mulheres e fumadores e não-fumadores mostrou-se semelhante. Conforme apresentado na tabela, o grupo de trabalhadores incluídos no grupo de agricultura tradicional, embora com idade semelhante à do grupo de agricultura biológica (cerca de 40 anos), apresenta um histórico de trabalho na atividade agrícola muito superior (22.7 anos vs. 9.5 anos). De referir que o grupo de agricultura tradicional era constituído por indivíduos expostos a diferentes pesticidas durante a sua atividade.

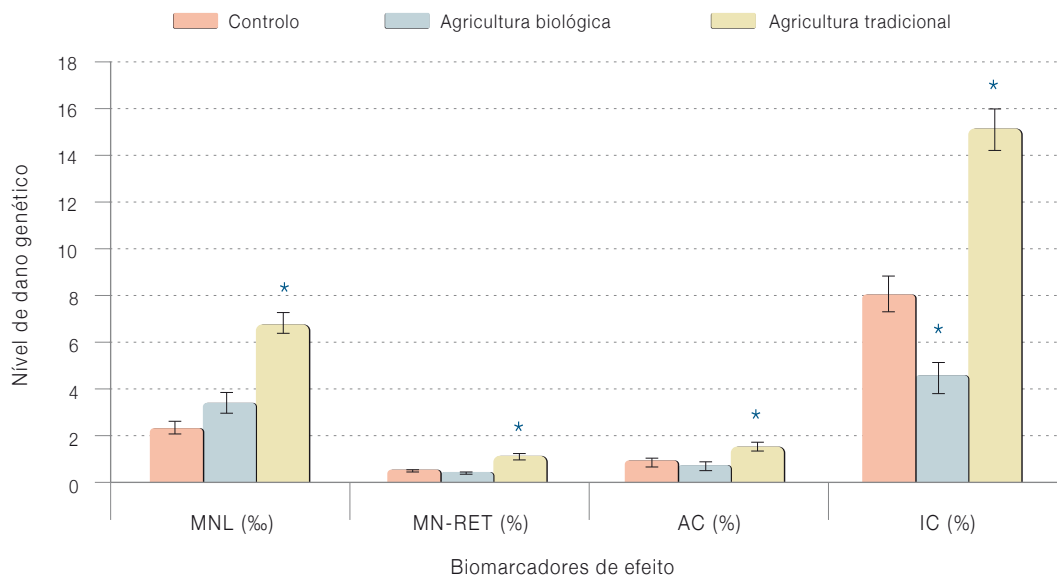
Os resultados obtidos para os indicadores de genotoxicidade estão apresentados na **gráfico 1**. No seu conjunto os trabalhadores da agricultura biológica apresentaram níveis de dano genético similares ao grupo controlo, exceto no teste do cometa. Os dados deste indicador revelaram níveis de dano genético mais elevados em indivíduos controlo do que nos indivíduos do grupo de agricultura biológica. Uma vez que o teste do cometa fornece informação acerca das quebras temporárias nas cadeias de ADN que, em circunstâncias normais, são reparadas em poucas horas antes de se fixarem

Tabela 1: Características da população estudada.

| | Grupo Controlo (n=61) | Grupo Agricultura biológica (n=36) | Grupo Agricultura tradicional (n=85) |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Idade (anos) ^a | 39.5 ± 12.3 (19-61) | 39.6 ± 14.5 (18-68) | 40.0 ± 12.2 (18-63) |
| Sexo | | | |
| Homens | 26 (42,6 %) | 17 (47,2 %) | 43 (50,6 %) |
| Mulheres | 35 (57,4 %) | 19 (52,8 %) | 42 (49,4 %) |
| Hábitos tabágicos | | | |
| Fumadores | 11 (18,0 %) | 5 (13,9 %) | 5 (5,9 %) |
| Não-fumadores | 50 (82,0 %) | 31 (86,1%) | 80 (94,1 %) |
| Tempo de exposição ^a | - | 9.5 ± 12.3 | 22.7 ± 16.2 |

^a média ± desvio padrão (intervalo)

Gráfico 1: Dano genético nos diferentes grupos estudados.



As barras representam o erro padrão da média; * $P < 0.05$, diferença estatisticamente significativa relativamente ao grupo controlo, teste U de Mann-Whitney.

como mutações, estes resultados mostram que, aparentemente, estes indivíduos apresentam menor exposição a compostos genotóxicos do que os indivíduos controlo mesmo que a longo prazo, os níveis de dano genético sejam semelhantes (como evidenciado nos dados obtidos por MN e AC). De facto, os trabalhadores de agricultura biológica não estão expostos a pesticidas de origem sintética e, em geral, apresentam estilos de vida mais saudáveis. Ao longo dos

anos, diferentes estudos têm tentado associar a ingestão de alimentos orgânicos a uma melhoria do estado de saúde do consumidor (8) mas os resultados mantêm-se inconclusivos (9).

Por outro lado, os resultados obtidos confirmam o potencial genotóxico dos pesticidas em contexto ocupacional. O aumento na frequência de MNL, AC e IC aqui observado está de acordo com

artigos breves_ n. 10

o previamente descrito por outros autores (10-14). Os dados obtidos indicam ainda que a exposição a pesticidas pode ser responsável por dano em células hematopoiéticas uma vez que se observou um aumento na frequência de MN em reticulócitos.

_Conclusão

Neste estudo, diversos biomarcadores foram utilizados para avaliar a influência de diferentes tipos de sistemas agrícolas nas alterações genéticas dos trabalhadores. Os resultados obtidos comprovam que os pesticidas são capazes de induzir genotoxicidade e que, em geral, os indivíduos que praticam agricultura biológica apresentam níveis semelhantes de dano genético aos indivíduos controlo não expostos mas significativamente inferiores aos que praticam agricultura tradicional, indicando que o estado de saúde dos trabalhadores agrícolas pode ser influenciado pelo tipo de agricultura que praticam.

Devido ao número de indivíduos incluído em cada grupo, este resultado precisa ser interpretado com cautela, sendo necessária uma investigação mais aprofundada sobre o assunto para confirmar esta conclusão.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através da bolsa de Doutoramento SFRH/BD/37190/2007 de C. Costa.

Referências bibliográficas:

- (1) União Europeia. Comissão Europeia. EUROSTAT. Environment pressure indicators for the EU: Data 1985-98. In: European Commission. Statistical Office of the European Commission Theme 8: Environment and Energy, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2001, 165 pp.
- (2) Jensen TK, Giwercman A, Carlsen E, et al. Semen quality among members of organic food associations in Zealand, Denmark. *Lancet*. 1996;347(9018):1844.
- (3) Juhler RK, Larsen SB, Meyer O, et al. Human semen quality in relation to dietary pesticide exposure and organic diet. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1999;37(3):415-23.
- (4) Teixeira JP, Gaspar J, Silva S, et al. Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. *Toxicology*. 2004;195(2-3):231-42.
- (5) Costa C, Silva S, Neves J, et al. Micronucleus frequencies in lymphocytes and reticulocytes in a pesticide-exposed population in Portugal. *J Toxicol Environ Health A*. 2011;74(15-16):960-70.
- (6) Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, et al. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res*. 2006;604(1-2):19-27.
- (7) Costa S, Coelho P, Costa C, et al. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*. 2008;252(1-3):40-8.
- (8) Dangour AD, Lock K, Hayter A, et al. Nutrition-related health effects of organic foods: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(1):203-10. [LINK](#)
- (9) Załęcka A, Bügel S, Paoletti F, et al. The influence of organic production on food quality - research findings, gaps and future challenges. *J Sci Food Agric*. 2014;94(13):2600-4.
- (10) Bolognesi C, Carrasquilla G, Volpi S, et al. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(15-16):986-97.
- (11) Costa C, Teixeira JP, Silva S, et al. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*. 2006;21(5):343-50. [LINK](#)
- (12) Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res*. 2006;609(1):74-80.
- (13) Ergene S, Celik A, Cavaş T, et al. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Gökusu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ Int*. 2007;33(7):877-85.
- (14) Remor AP, Totti CC, Moreira DA, et al. Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int*. 2009;35(2):273-8.

Avaliação integrada dos efeitos genotóxicos de nanomateriais manufaturados no ratinho transgénico *LacZ*

Henriqueta Louro¹, Ana Tavares¹, Nádia Vital¹, Pedro M Costa^{1,2}, Elsa Alverca³, João Lavinha¹, Maria João Silva¹

henriqueta.louro@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, INSA.

(2) Instituto do Mar, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

(3) Departamento de Saúde Ambiental, INSA (à data).

Introdução

Os nanomateriais manufaturados (NMs), isto é, fabricados deliberadamente para fins específicos, apresentam propriedades físico-químicas únicas como a dimensão, área superficial ou funcionalização, que lhes conferem características mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas muito vantajosas para aplicações industriais e biomédicas. A título de exemplo, salienta-se a utilização crescente de NMs de dióxido de titânio em produtos de cosmética e higiene pessoal (1) (p.ex., em protetores solares e cremes). Contudo, a expansão da utilização destes e de outros NMs contrasta com a insuficiente avaliação de risco para a saúde humana e para o ambiente, sendo ainda considerados como um risco emergente para a saúde pública (2). Uma das principais preocupações relativamente aos efeitos adversos dos NMs é o seu potencial efeito cancerígeno para o Homem.

Num estudo recente, demonstrámos que um nanomaterial de dióxido de titânio na forma cristalina designada anatase, o NM-102 (do repositório do *Joint Research Center*; Ispra, Itália), induziu um aumento significativo de quebras cromossómicas - detetáveis na forma de micronúcleos - em linfócitos humanos expostos *ex vivo* (3) não se tendo, porém, observado um efeito dose-resposta.

Objetivo

No sentido de prosseguir e aprofundar a avaliação da genotoxicidade do NM-102, o presente estudo teve por objetivo caracterizar os seus efeitos genotóxicos, num modelo animal, utilizando uma

abordagem integrada, a qual abrangeu a análise de vários parâmetros de genotoxicidade no mesmo animal (4).

Materiais e métodos

Recorreu-se a um modelo de ratinho transgénico contendo o gene bacteriano *LacZ* inserido em plasmídeo (5). A exposição a NM-102 (10 e 15 mg/kg) realizou-se através de duas administrações sucessivas (com 24 h de intervalo) de cada dose por via intravenosa (i.v.). O desenho experimental combinou a análise integrada de vários parâmetros de genotoxicidade em diversos órgãos dos ratinhos, nomeadamente: anomalias cromossómicas (ensaio do micronúcleo) em reticulócitos de sangue periférico, quebras da cadeia de DNA (ensaio do cometa) e mutações no gene *LacZ* em células do baço e do fígado. Foram ainda efetuadas análises histológicas (microscopia óptica) e ultraestruturais (microscopia eletrónica de transmissão, TEM) de amostras de tecido hepático, com o intuito de demonstrar a ocorrência de exposição desses tecidos e células ao NM em estudo.

Resultados

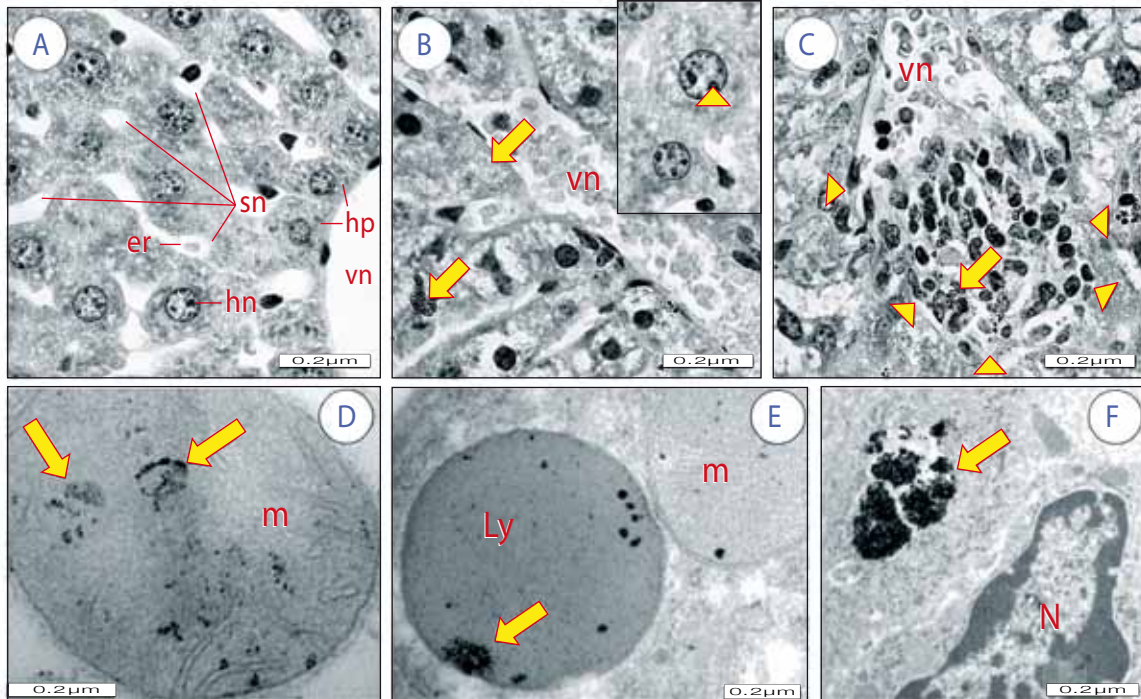
A análise histológica demonstrou, em amostras de tecidos dos animais tratados com a dose mais elevada de NM-102, uma acumulação de nanopartículas no fígado, bem como a presença de um processo inflamatório moderado (figura 1A-C).

A análise ultraestrutural (TEM) revelou a presença de depósitos eletrodensos, compatíveis com a acumulação de NMs no fígado dos animais expostos, independentemente da dose administrada (figura 1D-E).

Por sua vez, os resultados do ensaio do micronúcleo em reticulócitos de sangue periférico dos ratinhos não revelaram alterações cromossómicas significativas, 42 h após a segunda administração intravenosa (i.v.) de NM-102 (gráfico 1A).

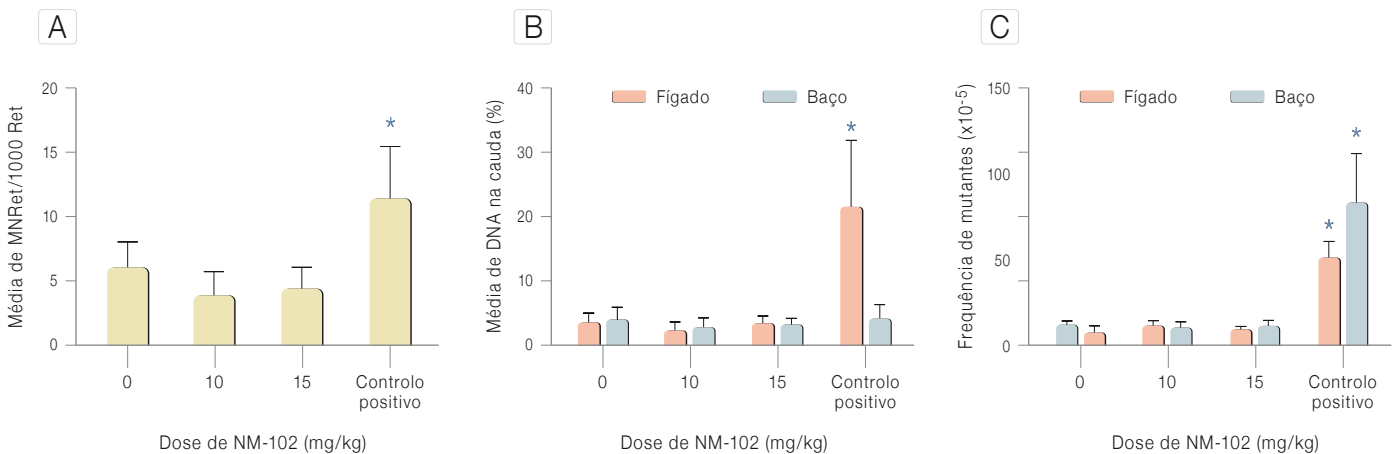
Decorridos 28 dias após a última administração, não se detetou qualquer aumento do nível de quebras de cadeia simples ou dupla de DNA (ensaio do cometa), tanto no fígado como no baço dos ratinhos expostos a 10 ou 15 mg/kg de NM-102 (gráfico 1B). Verificou-se também que não houve indução de mutações no gene *LacZ* nos mesmos órgãos dos ratinhos expostos (gráfico 1C).

Figura 1A-F: Microfotografias do fígado de ratinhos expostos a NMs.



(A) Controlo negativo com hepatócitos normais (hp). (B) Fígado de ratinho exposto a 15 mg/kg de NM-102 exibindo aglomerados de nanomateriais no interior de hepatócitos (setas largas). (C) Fígado de ratinho exposto a 15 mg/kg de NM-102 evidenciando aglomeração de células inflamatórias (entre setas), no interior das quais se podem encontrar aglomerados de nanomateriais (seta larga). Hn: núcleo hepatocítico; vn: vénula; er: eritrócitos. Escala: 25 μ m. (Créditos: Pedro M. Costa, IMAR e INSA). (D a F) Microfotografias de TEM mostrando depósitos de NMs no interior das estruturas celulares de hepatócitos de ratinhos expostos a NMs. m: mitocondria; LY: lisossoma. Escala: 0.2 μ m (Créditos: Elsa Alverca, INSA).

Gráfico 1A-C: Resultados dos ensaios de genotoxicidade em órgãos de ratinhos expostos a NM-102.



(A) Ensaio do micronúcleo em sangue periférico, 42 h após exposição; (B) Ensaio do cometa em células do baço e do fígado, 28 dias após exposição; (C) Ensaio de mutações no transgene *LacZ*, 28 dias após exposição; MNRet - reticulócitos micronucleados; Ret- reticulócitos.



Conclusões

A investigação da genotoxicidade do dióxido de titânio nanoparticulado - NM-102 - recorrendo a uma abordagem integrada num modelo de ratinho transgénico disponível no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, contribuiu para a evidência de que este nanomaterial não induz efeitos genotóxicos a nível sistémico, nas condições experimentais descritas. Salienta-se o facto de ter sido demonstrada a exposição interna e a acumulação do NM no fígado (4). Estes resultados negativos estão em concordância com os da maioria dos estudos publicados sobre a genotoxicidade de NMs de dióxido de titânio na forma cristalina anatase (6,7), embora estejam descritos também alguns resultados positivos para este tipo de NMs (8, 9).

Apesar dos resultados negativos dos estudos de genotoxicidade realizados, a observação de uma resposta inflamatória moderada em tecidos hepáticos sugere a possibilidade de ocorrência de genotoxicidade secundária *in vivo*, envolvendo inflamação. Reconhece-se que esta resposta tecidual leva à produção de espécies reativas de oxigénio que poderão conduzir, ainda que secundariamente, à formação de lesões no DNA, após exposição aos NMs. Assim, considerando a biopersistência do NM no organismo e o efeito inflamatório moderado observado, importa ainda investigar se ocorrerá genotoxicidade secundária, que venha a revelar-se apenas após uma exposição mais prolongada a estes nanomateriais. Para além deste aspeto, a inflamação observada sugere ainda que o eventual desenvolvimento de processos cancerígenos por mecanismos não genotóxicos deverá ser investigado futuramente.

Agradecimentos

Os autores agradecem o contributo de Edwin Zwart, Wim H. de Jong (RIVM, Holanda) e Valerie Féssard (ANSES, França) para este trabalho.

Financiamento

Projeto co-financiado pela EU Grant Agreement 2009 21 01 (NANOGENOTOX), Health Programme e pelo INSA.

Artigo adaptado de: Louro H, Tavares A, Vital N, et al. Integrated approach to the *in vivo* genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 2014 Jul;55(6):500-9. <http://hdl.handle.net/10400.18/2362>

Referências bibliográficas:

- (1) Wijnhoven SWP, Dekkers S, Kooi M, et al. Nanomaterials in consumer products: update of products on the European market in 2010. Bilthoven: RIVM, 2011. (Report 340370003/2010) [LINK](#)
- (2) European Agency for Safety and Health at Work. Expert forecast on emerging chemical risks related to occupational safety and health. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2009. (European risk observatory report, 2009). [LINK](#)
- (3) Tavares A, Louro H, Antunes, S, et al. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro.* 2014;28(1):60-9.
- (4) Louro H, Tavares A, Vital N, et al. Integrated approach to the *in vivo* genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice. *Environ Mol Mutagen.* 2014;55(6):500-9.
- (5) Louro H, Pinto M, Vital N, et al. The LacZ plasmid-based transgenic mouse model: an integrative approach to study the genotoxicity of nanomaterials. In: Sierra LM, Gaivão I (eds). *Genotoxicity and DNA repair: a practical approach.* New York: Humana Press-Springer, 2014. p. 451-77.
- (6) Sadiq R, Bhalli JA, Yan J, Woodruff RS, et al. Genotoxicity of TiO₂ anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. *Mutat Res.* 2012;745(1-2):65-72.
- (7) Naya M, Kobayashi N, Ema M, et al. *In vivo* genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;62(1):1-6.
- (8) Sycheva LP, Zhurkov VS, Iurchenko VV, et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. *Mutat Res.* 2011;726(1):8-14.
- (9) Driscoll KE, Deyo LC, Carter JM, et al. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis.* 1997;18(2):423-30.

Avaliação *in vitro* da neurotoxicidade de nanopartículas de magnetite revestidas por sílica

Carla Costa¹, Fátima Brandão¹, Gözde Kiliç²,
Natalia Fernández-Bertólez², Maria João Bessa¹, Solange Costa¹,
Vanessa Valdiglesias³, Blanca Laffon³, João Paulo Teixeira¹

carla.trindade@insa.min-saude.pt

(1) Unidade do Ar e Saúde Ocupacional. Departamento de Saúde Ambiental, INSA, Porto.

(2) Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade da Corunha.

(3) Grupo DICOMOSA. Departamento de Psicobiologia, Universidade da Corunha.

Introdução

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) são promissoras agentes de contraste em ressonância magnética podendo vir a melhorar significativamente o diagnóstico de diversas doenças entre as quais cancro, doenças cardiovasculares e neurológicas. Diferentes tipos de SPION, tais como, as Feridex IV®, Resovist®, Combidex®, Lumirem® e Clariscan™ chegaram mesmo a ser introduzidas no mercado internacional como agentes de contraste, mas todas foram entretanto retiradas do mercado, exceto as SPION Lumirem®. Para além da utilização como agentes de contraste, as propriedades superparamagnéticas destas nanopartículas potenciam também a sua aplicação para a entrega localizada de fármacos (1,2) e destruição direcionada de tecidos tumorais através de hipertermia (3,4).

Apesar dos possíveis benefícios e promissoras aplicações das SPION, ainda são pouco conhecidos os efeitos destas nanopartículas no sistema nervoso humano, pelo que se considera necessária a avaliação da toxicidade destas nanopartículas em linhas celulares do sistema nervoso humano (5).

Com este estudo, pretende-se avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos de nanopartículas de óxido de ferro (Fe₃O₄, magnetite) revestidas por sílica (ION-S) numa linha celular humana de origem neuronal (SHSY5Y).

Material e métodos

A caracterização físico-química das ION-S foi efetuada por dispersão dinâmica da luz (DLS) para determinação do tamanho e estabilidade da suspensão, e microscopia eletrónica de transmissão (TEM) para análise do tamanho primário. O tamanho hidrodinâmico e potencial zeta foram determinados em suspensões preparadas em água e meio de cultura celular.

O cultivo da linha celular e preparação das células para os tratamentos com ION-S foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Valdiglesias *et al.*, 2013 (6).

As células SHSY5Y foram expostas a diferentes concentrações de ION-S (5-300 µg/mL), preparadas imediatamente antes do tratamento, em meio de cultura, durante três tempos de exposição (3, 6, 24 h). A viabilidade celular foi avaliada após o período de exposição através do ensaio MTT (7); uma solução Triton X-100 a 1% foi utilizada para controlo positivo.

A avaliação da genotoxicidade foi efetuada recorrendo ao teste do cometa, tendo sido analisados 4 níveis de concentração (10, 50, 100 e 200 µg/mL) e dois períodos de exposição (3 e 24 h). O ensaio foi executado de acordo com anteriormente descrito em Costa *et al.* 2008 (8), tendo sido utilizada bleomicina 1 µg/mL como controlo positivo. Para cada condição experimental foram realizadas três experiências independentes (com três replicas por experiência).

Resultados e discussão

Os resultados da caracterização físico-química das suspensões de ION-S estão apresentados na tabela 1. A análise TEM mostrou que as nanopartículas em estudo apresentam um tamanho de cerca de 20 nm. Em dispersão, verificou-se que o tamanho das ION-S em água é semelhante ao seu tamanho em meio de cultura celular (cerca de 100 nm). Relativamente ao potencial zeta, o valor absoluto em meio de cultura é bastante inferior ao valor absoluto obtido em água ultra pura, o que traduz uma diminuição da estabilidade nas ION-S neste meio.

Tabela 1: Caracterização físico-química das nanopartículas em estudo.

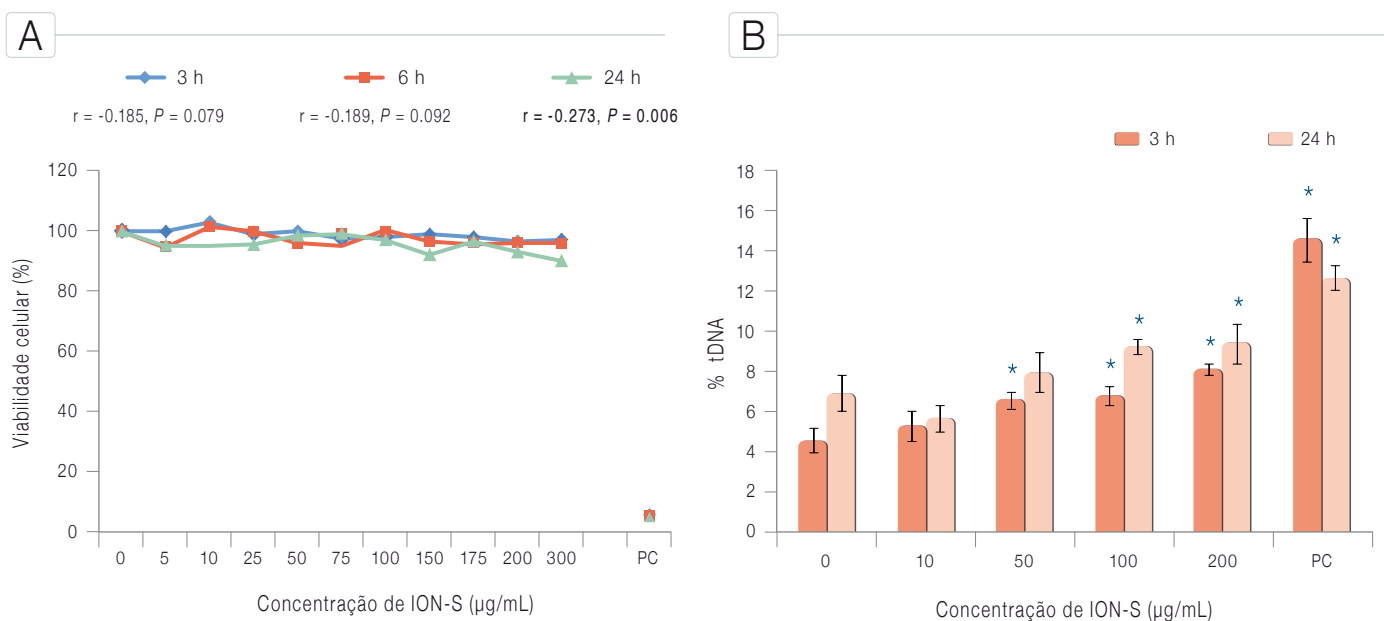
| | | ION-S |
|--|----------------------------|---|
| Tamanho primário (nm)* | | 10.0 ± 2.1 (núcleo) 20.2 ± 2.9 (núcleo e revestimento) |
| ION-S em água (300 µg/mL)* | Tamanho hidrodinâmico (nm) | 93.3 ± 0.5 |
| | Potencial zeta (mV) | -31.8 ± 2.1 (pH=7.73) |
| ION-S em meio de cultura (300 µg/mL)* | Tamanho hidrodinâmico (nm) | 111.1 ± 1.1 |
| | Potencial zeta (mV) | -10.3 ± 1.1 (pH=8.14) |

* média ± desvio padrão

O gráfico 1A apresenta os resultados obtidos no ensaio MTT. A análise da correlação entre a viabilidade celular e a dose de exposição mostra uma diminuição na viabilidade celular estatisticamente significativa apenas para o período de exposição de 24 h. No entanto, mesmo para a dose mais elevada (300 µg/mL), a viabilidade celular manteve-se acima dos 80% confirmando a sua biocompatibilidade, à semelhança do que já foi descrito por outros autores (9).

Tendo em consideração estes resultados, foram selecionadas 4 concentrações e dois períodos de exposição para a avaliação da genotoxicidade pelo teste do cometa. Os resultados obtidos estão representados no gráfico 1B e mostram que doses não citotóxicas de ION-S (100 e 200 µg/mL) induzem um aumento significativo no número de quebras no ADN após 3 h e 24 h de exposição.

Gráfico 1: Toxicidade de ION-S na linha celular SHSY5Y. (A) Viabilidade celular avaliada pelo ensaio MTT (correlação de Spearman) e (B) dano genético avaliado pelo teste do cometa.



Em (B) as barras representam o erro padrão da média; * $P < 0.05$, diferença estatisticamente significativa relativamente ao controlo negativo, teste U de Mann-Whitney; % tDNA: percentagem de ADN na cauda; PC: controlo positivo

artigos breves_ n. 12

A análise da literatura científica relativamente ao potencial genotóxico das SPION (analisado pelo teste do cometa) revela resultados contraditórios (5). À semelhança do que descrevemos, alguns autores apresentam um aumento nos níveis de dano genético em células humanas após exposição a SPION (10, 11) mas a maioria das publicações aponta para resultados negativos (12-14). É importante referir que o teste do cometa deve ser validado para análise da genotoxicidade de cada tipo de nanopartícula antes de se efetuar o ensaio, de forma a excluir possíveis interferências que poderão enviesar os resultados (esta análise foi realizada no presente trabalho, tendo-se verificado que as ION-S não interferiam com a metodologia experimental do ensaio).

Conclusão

Os resultados aqui descritos sugerem que ION-S estudadas são biocompatíveis mesmo nas concentrações mais altas em estudo. No entanto, a análise da genotoxicidade mesmo a concentrações baixas mostra que estas nanopartículas são capazes de induzir dano genético nas células expostas.

Este dado vem reforçar a necessidade de uma análise exaustiva da toxicidade de SPION desenvolvidas para aplicações biomédicas. Futuros estudos devem incluir uma bateria de ensaios biológicos que ofereçam informação relativa aos mecanismos de toxicidade que estão na base dos efeitos aqui observados.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Xunta de Galicia (EM 2012/079) e pela Ação COST TD1204 MODENA. G. Kiliç foi apoiada por uma bolsa da Universidade da Coruña.

Referências bibliográficas:

- (1) Vasir JK, Labhasetwar V. Targeted drug delivery in cancer therapy. *Technol Cancer Res Treat.* 2005;4(4):363-74.
- (2) Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1252-65. [LINK](#)
- (3) Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int J Hyperthermia.* 2002;18(4):267-84.
- (4) Le Renard PE, Jordan O, Faes A, et al. The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia. *Biomaterials.* 2010;31(4):691-705.
- (5) Valdiglesias V, Kiliç G, Costa C, et al. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ Mol Mutagen.* 2014 Sep 11. doi: 10.1002/em.21909. [Epub ahead of print]

- (6) Valdiglesias V, Costa C, Kiliç G, et al. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environ Int.* 2013 May;55:92-100.
- (7) Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983. 65(1-2): p. 55-63.
- (8) Costa S, Coelho P, Costa C, et al. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology.* 2008;252(1-3):40-8.
- (9) Boyer C, Bulmus V, Liu J, et al., The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Mater.* 2010; 2(1): 22-30. [LINK](#)
- (10) Magdolenova Z, Drlickova M, Henjum K, et al. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2013 nov 14. [Epub ahead of print]
- (11) Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:17. [LINK](#)
- (12) Singh N, Jenkins GJ, Nelson BC, et al. The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials.* 2012;33(1):163-70.
- (13) Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett.* 2009;188(2):112-8.
- (14) Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, et al. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(9):1726-32.



Ocorrência e avaliação da exposição a mercúrio total em alimentos para crianças em Portugal

Carla Martins¹, Elsa Vasco¹, Eleonora Paixão², Paula Alvito¹

carla.martins@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(2) Departamento de Epidemiologia, INSA (à data).

Introdução

A alimentação infantil comercial desempenha um papel importante na dieta de lactentes e crianças jovens, dado serem uma das fontes de nutrientes durante os primeiros meses de vida (1). Os lactentes e crianças jovens são um grupo vulnerável relativamente à ingestão de contaminantes químicos através da alimentação, uma vez que têm uma taxa metabólica elevada e uma dieta composta por um número restrito de alimentos. A presença de metais pesados na alimentação infantil pode causar efeitos adversos na saúde de lactentes e crianças jovens. O mercúrio é um contaminante químico cuja acção sobre o sistema nervoso central pode conduzir a danos permanentes (2). É também nefrotóxico e imunotóxico, e a exposição mesmo que em níveis baixos, poderá causar efeitos adversos em qualquer período do desenvolvimento. Em situação ideal nenhuma criança ou adulto deveria estar exposto a mercúrio uma vez que esta substância não traz qualquer benefício fisiológico (3).

Objetivo

O presente estudo teve como objectivo a determinação dos teores de mercúrio total em amostras de alimentação infantil comercial, de produção biológica e convencional e avaliação da exposição de crianças ao mercúrio, através do consumo destes alimentos.

Materiais e métodos

Neste estudo foram analisadas 87 amostras de alimentação infantil comercial, onde se incluíram produtos à base de cereais, fórmulas infantis e refeições preparadas. A determinação de mercúrio total foi

efectuada em analisador directo de mercúrio DMA80 (Milestone®) baseado no princípio da decomposição térmica, amalgamação e deteção por espectrometria de absorção. Foi ainda determinada a ingestão semanal de mercúrio total utilizando os dados de consumo e peso corporal de um grupo de crianças alemãs (4), (na ausência de dados da população portuguesa) e a mediana (P50) e os percentis 90 (P90), 95 (P95) e 99 (P99) dos teores de mercúrio total para cada grupo de alimentos, originando diferentes cenários de exposição, tal como recomendado pela EFSA (*European Food Safety Authority*). Os valores de P90, P95 e P99 correspondem a exposições a elevadas concentrações de mercúrio total. A avaliação da exposição foi efectuada por comparação dos valores de ingestão obtidos relativamente ao valor de ingestão semanal provisória tolerável (PTWI) recomendado pela Comissão Conjunta de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO/WHO (JECFA) que é de 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ peso corporal.semana⁻¹ ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}\text{pc.sem}^{-1}$).

Resultados e discussão

A **tabela 1** apresenta os resultados obtidos para os teores de mercúrio total em alimentação infantil tendo-se verificado valores quantificáveis em 50 das 87 amostras analisadas. A mediana dos teores de mercúrio total determinados para cada grupo foi de 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para produtos à base de cereais, 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para fórmulas infantis e 0,40 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para refeições preparadas. Nos grupos “fórmulas infantis” e “refeições preparadas” não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de produção convencional e as de produção biológica.

Pelo contrário, no grupo dos produtos à base de cereais foram encontradas diferenças estatisticamente significativas relativamente ao modo de produção ($p < 0,005$). No grupo dos produtos à base de cereais verificou-se que as amostras com teores mais elevados de mercúrio total continham arroz como ingrediente predominante. Os produtos à base de cereais de produção biológica continham um maior número de amostras com arroz na sua composição, podendo assim eventualmente considerar-se que a concentração mais elevada de mercúrio total estará relacionada com a presença de arroz e não com o modo de produção.

Tabela 1: Teores de mercúrio total em alimentação infantil, em produtos de origem biológica e convencional comercializados na região de Lisboa (n=87).

| Alimentos infantis | Amostras (n) | | | Mercúrio total ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) | | |
|-----------------------------------|--------------|-------|-------|---|-----------------------|-------|
| | Total | < LOQ | > LOQ | Mediana | Intervalo (Min – Max) | p^a |
| Produtos à base de cereais | | | | 0,50 | | |
| Convencional | 12 | 8 | 4 | 0,29 | 0,15 – 2,20 | 0,001 |
| Biológico | 14 | 1 | 13 | 1,60 | 0,36 – 2,90 | |
| Fórmulas infantis | | | | 0,50 | | |
| Convencional | 13 | 3 | 10 | 0,64 | 0,19 – 0,85 | 0,069 |
| Biológico | 6 | 5 | 1 | 0,29 | 0,15 – 0,81 | |
| Refeições preparadas | | | | 0,40 | | |
| Convencional | 24 | 14 | 10 | 0,29 | < LOD – 13,00 | 0,319 |
| Biológico | 18 | 6 | 12 | 0,50 | < LOD – 19,56 | |

Min - Teor mínimo obtido por análise no DMA80; Max - Teor máximo obtido por análise no DMA80;
n - número de amostras analisadas; LOQ (Limite de Quantificação) - 0,29 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$;
LOD (Limite de Detecção) - 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$; ^a Teste de Mann-Whitney

A **tabela 2** apresenta a estimativa da ingestão de mercúrio total considerando diferentes cenários de exposição. Para P50, foi determinada uma ingestão situada entre 0,010 e 0,014 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}\text{pc.sem}^{-1}$ (0,2% e 0,4% do PTWI recomendado) para produtos à base de cereais, entre 0,017 e 0,064 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}\text{pc.sem}^{-1}$ (0,4% e 1,6% do PTWI) para as fórmulas infantis e entre 0,032 e 0,075 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}\text{pc.sem}^{-1}$ (0,8% e 1,9% do PTWI) para as refeições preparadas. Considerando o P99 dos teores de mercúrio total, ou seja, uma situação de elevada exposição, foi determinada uma ingestão de 3,7 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}\text{pc.sem}^{-1}$ (93% do PTWI), que não excede mesmo assim os valores recomendados.

Tabela 2: Estimativa da ingestão de mercúrio através do consumo de alimentação infantil comercial.

| Produtos à base de cereais | | | | | | |
|----------------------------|--------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| Idade (meses) | Peso corporal (kg) | Consumo médio (g dia ⁻¹) | P50 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P90 2,80 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P95 2,88 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P99 2,90 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ |
| 3 | 5,8 | 23,5 | 0,014 | 0,079 | 0,082 | 0,082 |
| 6 | 7,5 | 26,5 | 0,012 | 0,069 | 0,071 | 0,072 |
| 9 | 8,6 | 30,1 | 0,012 | 0,069 | 0,071 | 0,071 |
| 12 | 9,4 | 26,0 | 0,010 | 0,054 | 0,056 | 0,056 |
| Fórmulas infantis | | | | | | |
| Idade (meses) | Peso corporal (kg) | Consumo médio (g dia ⁻¹) | P50 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P90 0,83 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P95 0,83 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P99 0,85 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ |
| 3 | 5,8 | 105,3 | 0,064 | 0,105 | 0,105 | 0,108 |
| 6 | 7,5 | 67,1 | 0,031 | 0,052 | 0,052 | 0,053 |
| 9 | 8,6 | 46,8 | 0,019 | 0,032 | 0,032 | 0,032 |
| 12 | 9,4 | 44,9 | 0,017 | 0,028 | 0,028 | 0,028 |
| Refeições preparadas | | | | | | |
| Idade (meses) | Peso corporal (kg) | Consumo médio (g dia ⁻¹) | P50 0,40 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P90 4,55 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P95 11,80 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ | P99 19,56 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ |
| 3 | 5,8 | 67,0 | 0,032 | 0,368 | 0,954 | 1,582 |
| 6 | 7,5 | 195,1 | 0,072 | 0,829 | 2,149 | 3,562 |
| 9 | 8,6 | 234,3 | 0,075 | 0,868 | 2,250 | 3,730 |
| 12 | 9,4 | 208,1 | 0,061 | 0,705 | 1,829 | 3,031 |

_Conclusões

Os resultados deste estudo mostram que os produtos destinados a lactentes e crianças jovens apresentam níveis reduzidos de contaminação com mercúrio total. Dada a elevada suscetibilidade dos lactentes e crianças jovens a esta substância é importante manter uma seleção de matérias-primas que permitam reduzir a presença de mercúrio total nos alimentos comercializados, bem como, avaliar a necessidade de estabelecer limites legislados para os teores de mercúrio total na alimentação infantil. Será ainda de todo o interesse avaliar a exposição a mercúrio total com base em dados de consumo reais para crianças obtidos em Portugal.

Artigo adaptado de: Martins C, Vasco E, Paixão E, et al. Total mercury in infant food, occurrence and exposure assessment in Portugal. Food Addit Contam Part B Surveill. 2013;6(3):151-7.

Referências bibliográficas:

- (1) Ikem A, Nwankwoala A, Oduyungbo S, et al. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. Food Chem. 2002;77(4):439-47.
- (2) European Food Safety Authority. Mercury as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal. 2008;654:1-74. [LINK](#)
- (3) Bose-O'Reilly S, McCarty KM, Steckling N, et al. Mercury exposure and children's health. Curr Prob Pediat Adolesc Health Care. 2010;40(8):186-215.
- (4) Kersting M, Alexy U, Sichert-Hellert W, et al. Measured Consumption of commercial infant food in German infants: results from the DONALD study. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1998;27(5):547-52.

A cultura *in vitro* tem impacto nas diferenças encontradas entre os alimentos transgênicos e seus controlos

Cátia Fonseca^{1,2}, Sébastien Planchon⁴, Tânia Serra^{2,3},
Subhash Chander², Nelson JM Saibo², Jenny Renaut⁴,
M Margarida Oliveira^{2,3}, Rita Batista¹

rita.batista@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(2) Laboratório GPlantS, Instituto de Tecnologia Química e Biológica.

(3) Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica.

(4) Department of Environment and Agrobiotechnologies (EVA),
Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann.

Introdução

Atualmente, a estratégia de avaliação de risco das plantas geneticamente modificadas (GM) destinadas à alimentação humana e/ou animal, é focada na identificação das semelhanças/diferenças existentes entre a linha GM, em avaliação, e a linha não geneticamente modificada que lhe deu origem ("conventional counterpart") (1). Um dos pontos mais importantes nesta avaliação é a escolha do controlo mais adequado.

As potenciais diferenças inesperadas encontradas entre uma dada planta geneticamente modificada e o seu controlo podem: a) dever-se à expressão do transgene inserido; b) ocorrer como consequência de alterações epigenéticas ou disrupções/rearranjos na sequência do DNA provocadas pela inserção do transgene; c) dever-se ao stress provocado pelos procedimentos de cultura *in vitro* necessariamente utilizados durante o processo de transformação.

O desafio é encontrar controlos que permitam avaliar os potenciais efeitos inesperados provocados pelos incidentes referidos em a) e b), não tendo em consideração os potenciais efeitos inesperados atribuídos aos procedimentos de cultura *in vitro*, na medida em que esta última é uma ferramenta não controversa, largamente utilizada na propagação clonal e nas estratégias de melhoramento de plantas.

No guia da EFSA (European Food Safety Authority) para a seleção dos controlos a utilizar na avaliação de risco das plantas geneticamente modificadas (2), é considerada a utilização de linhas segregantes negativas, ou seja, linhas homocigóticas que não contém

o transgene, obtidas por auto polinização de linhas transgênicas heterocigóticas ou por polinização cruzada entre estas e as linhas controlo convencionais.

Alguns investigadores sugerem que os segregantes negativos são controlos mais adequados que as plantas convencionais não geneticamente modificadas, na medida em que permitem descontar as diferenças promovidas pela cultura *in vitro*. No entanto, outros alegam que os potenciais impactos da modificação genética não podem ser completamente avaliados utilizando apenas os segregantes negativos como controlos, na medida em que as potenciais alterações genéticas/ epigenéticas promovidas pela inserção do transgene podem persistir nestas linhas.

Resumindo, a utilização dos segregantes negativos como controlos na avaliação de risco das plantas GM poderá conduzir ao desconto das alterações genéticas/epigenéticas promovidas pela inserção do transgene. Neste caso diferenças inesperadas que deveriam ser avaliadas serão impossíveis de analisar. Por outro lado, a utilização das linhas não GM convencionais, como controlos, não permitirá descontar as diferenças promovidas pelo processo da cultura *in vitro*. Estas alterações, apesar de não serem consideradas um risco, não poderão ser excluídas da avaliação.

A questão é saber qual destes fatores, cultura *in vitro* ou inserção do transgene, tem maior impacto nas alterações inesperadas.

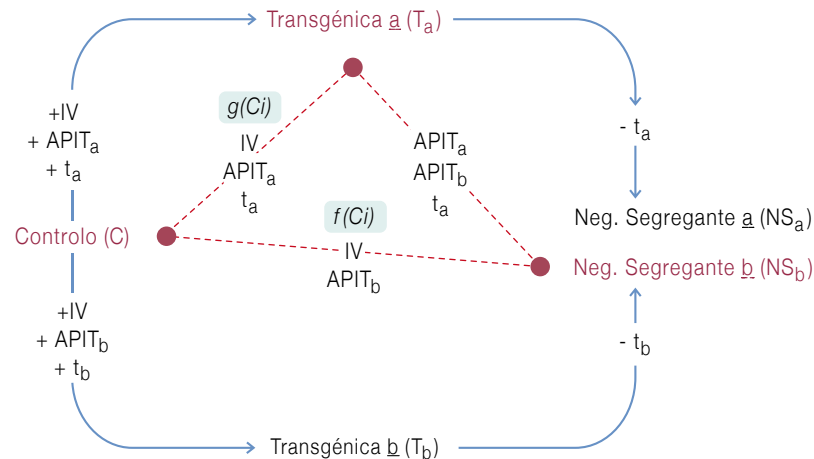
Objetivo

Este estudo teve como objetivo principal compreender a relevância da presença do transgene, das alterações genéticas/ epigenéticas induzidas pela inserção do mesmo e da cultura *in vitro*, nas diferenças inesperadas encontradas entre uma dada planta transgênica e seu controlo.

Métodos

"Multiplex fluorescence 2D gel electrophoresis" acoplada à espectrometria de massa: utilizámos estas técnicas para caracterizar o proteoma de três linhas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare): um controlo convencional, uma linha transgênica T_a e uma linha segregante negativa (NS_b) descendente de uma linha transgênica diferente (T_b) (figura 1).

Figura 1: Representação esquemática das linhas de plantas de arroz em teste e dos potenciais fatores que contribuem para as suas diferenças.



IV-Alterações promovidas pela cultura *in vitro*; APIT_a- Alterações promovidas pela inserção do transgene a; APIT_b- Alterações promovidas pela inserção do transgene b; t_a- Diferenças promovidas pela expressão do transgene a; t_b- Diferenças promovidas pela expressão do transgene b; g(Ci), f(Ci)- Funções que transformam cada um dos elementos dos controlos (Ci-spots proteicos) nos elementos de T_a ou NS_b (spots proteicos), respetivamente. As linhas analisadas neste estudo estão representadas a vermelho. As três linhas em teste (C, T_a e NS_b-*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare) foram crescidas nas mesmas condições por duas gerações antes da experiência.

_Resultados

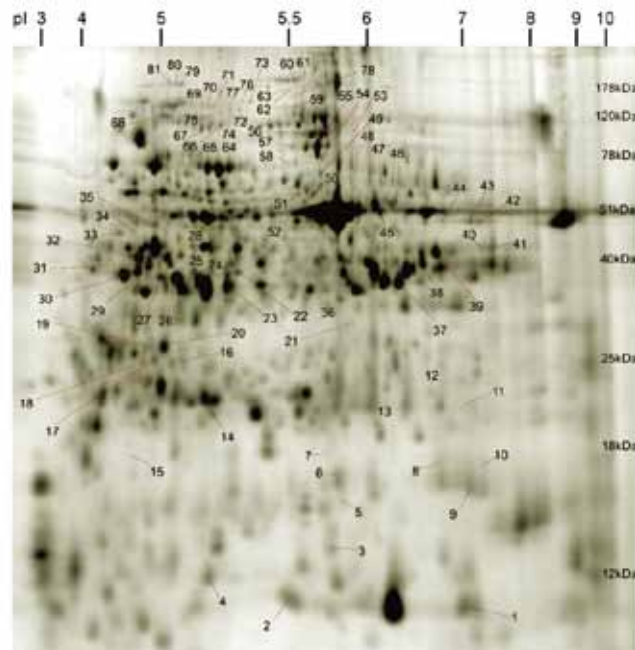
A cultura *in vitro* é o fator que mais contribui para as diferenças entre as plantas transgênicas e os seus controlos

Neste estudo seleccionámos 81 *spots* com abundâncias diferenciais (*spots* com diferenças de abundância relativa >1,5; ANOVA valor de $p < 0,05$ e p - ajustado por "False Discovery Rate" (ou q) <0,05 entre pelo menos dois dos três grupos em teste- **figura 2**).

Destes 81 *spots*, 72 (88,9%) tiveram abundâncias diferenciais, tanto na linha T_a como na NS_b vs. C. Adicionalmente, 49 destes 72 *spots* revelaram também uma alteração de abundância $\geq 1,5$ tanto na linha T_a como na NS_b vs. controlo. Em contraste, apenas 7 *spots* (8,6%) apresentaram abundância diferencial entre as linha T_a vs. NS_b e apenas 1 (1,2%) destes 7 apresentou uma diferença de abundância relativa >1,5 (**quadro 1**). Todos os 81 *v* com abundância relativa alterada apresentaram a mesma tendência quando comparando as linhas T_a e NS_b vs. C (abundância maior ou menor, mas o mesmo perfil em ambos os grupos). Estes dados demonstraram claramente que as linhas T_a e NS_b são quase idênticas, e distintas do controlo. A análise de componentes principais ("Principal Component Analysis") confirmou-o (**gráfico 1**).

Assumindo que cada inserção de DNA origina diferentes alterações genéticas/epigenéticas e, conseqüentemente, diferentes proteomas, seria de esperar que o proteoma da linha NS_b fosse diferente do da linha T_a (devido à ausência do transgene a (t_a) e a diferentes alterações promovidas pelo processo de inserção do transgene) (**figura1**). No entanto, verificámos que o proteoma da linha NS_b é muito mais próximo do da linha T_a, do que do controlo C (**quadro 1, gráfico 1**). Se representarmos g(Ci) como a função que transforma cada um dos *spots* do gel bidimensional representativo da linha C nos *spots* do gel bidimensional da linha T_a e f(Ci) a função que transforma os *spots* do gel bidimensional da linha C nos da linha NS_b, podemos afirmar que estas duas funções têm praticamente o mesmo impacto nos dados de proteómica. Na medida em que o único aspeto em comum entre as linhas T_a e NS_b é que ambas passaram pelo mesmo processo de cultura *in vitro*, os resultados obtidos parecem indicar que as alterações promovidas pela inserção do transgene e a presença/expressão do mesmo, são fatores com menos impacto no proteoma do arroz que as alterações promovidas pelo processo de cultura *in vitro*.

Figura 2: Exemplo de uma imagem de um gel bidimensional (controlo interno).



Os números identificam os 81 spots com abundâncias diferenciais que foram analisados por MS/MS. kDa-Quilodaltons.

Gráfico 1: Análise de componentes principais dos 81 spots selecionados.



Spots com diferenças de abundância relativa >1,5; ANOVA valor de $p < 0,05$ e p - ajustado por "False Discovery Rate" (ou q) <0,05 entre pelo menos dois dos três grupos em teste.

Quadrado rosa- controlo (C); Círculo amarelo- segregante negativo (NS_b); Triângulo azul- linha transgénica (T_a).

Quadro 1: ↓ Distribuição dos spots proteicos em grupos e sua identificação por MS.

| | | Spot nº | Identificação por MS | |
|--|--|--|---|--|
| 81 spots com abundância relativa alterada: ANOVA $p < 0,05$, $q < 0,05$, diferença de abundância relativa $\geq 1,5$, entre, pelo menos, dois dos três grupos em teste (C, NS _b e T _a) | A1 – 23 spots (28,4%): DAR $\geq 1,5$ em apenas um dos grupos T _a ou NS _b vs. C | 4 (↓) 9 (↓) 24 (↓) 30 (↓) 34 (↑) 36 (↓) 38 (↓) 39 (↓) 50 (↑) 52 (↑) 58 (↑) 59 (↑) 64,65 (↓) | "Actin -depolymerizing factor 3" "Peptidyl -propyl cis -trans isomerase" "Glutamine synthetase cytosolic isozyme" "Sedoheptulose - 1,7 - bisphosphate precursor" "Sgt1" "Malate dehydrogenase" "LL - diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic - like" "Aminomethyltransferase, mitochondrial -like" "Pyrophosphate - dependent phosphofructokinase beta subunit" "Rubisco" "Phenylalanine ammonia - lyase" "Alanyl - tRNA synthetase, mitochondrial precursor" "Transketolase 1" | |
| | | A1.1- 4 spots (4,9%) | 20 (↓) 23 (↓) 25 (↑) 37 (↓) | "Oxygen -evolving complex protein 1" "Fructose - 1,6 - bisphosphate, cytosolic" "Caffeic acid 3 - O - methyltransferase" "RNA binding protein, putative, expressed" |
| | A – 72 spots (88,9%): $p < 0,05$, $q < 0,05$ em ambas as linhas T _a e NS _b vs. C A2 – 49 spots (60,5%): DAR $\geq 1,5$ em ambas as linhas T _a e NS _b vs. C | 2 (↑) 17,18 (↓) 19 (↓) 21 (↑) 26,27 (↓) 28 (↓) 31 (↑) 35 (↓) 40 (↑) 41 (↑) 42,43,44 (↑) 45 (↑) 46 (↑) 48 (↑) 49 (↑) 51 (↑) 53,54,55,56 (↑) 60 (↑) 67 (↑) 68 (↑) 79,80,81 (↑) 32 (↓) | A2.1-1 spot (1,2%) A2.2-1 spot (1,2%) | "Rubisco small chain c" "Deoxyglucose - 6 - phosphate phosphatase" "33kDa oxygen evolving protein of photosystem II" "Chain A, Crystal structure of Class I chitinase" "Rubisco activase" "Succinyl - CoA ligase [ADP - forming] subunit beta, mitochondrial" "Phosphoribulokinase precursor" "Acetylornithine deacetylase - like" "Serine -glyoxylate aminotransferase -like" "Peroxisomal (S) - 2 - hydroxy - acid oxidase GLO1" "Alanine aminotransferase" "Rubisco large subunit" "Malate synthase, glyoxysomal" "Chaperonin protein" "NADP dependent malic enzyme" "Pyrophosphate - dependent phosphofrutokinase beta subunit" "Sucrose synthase 1" "Ferredoxin - dependent glutamate synthase, chloroplast precursor" "Chaperone protein ClpC1, chloroplastic" "Cell division cycle protein 48" "Carbamoyl - phosphate synthetase large chain -like" "Rubisco activase" |
| B – 9 spots (11,1%): $p < 0,05$ em apenas um dos grupos (T _a ou NS _b) vs. C | 14 (↑) 22 (↑) 29 (↑) 57 (↓) 66 (↑) 16 (↓) | B1.1-1 spot (1,2%) | "L -ascorbate peroxidase 1, cytosolic" "GLN1_Orysa Glutamine synthetase root isozyme" "Precursor chloroplastic glutamine synthetase" "5 -methyltetrahydropteroyltriglutamate - homocysteine methyltransferase" "Chaperone protein ClpC2, chloroplastic" "Deoxyglucose - 6 - phosphate phosphatase" | |

C - Controlo; T_a - Linha transgénica a; NS_b - Segregante negativo b; DAR - Diferença de abundância relativa; (↑) - Maior abundância; (↓) - Menor abundância; A1.1, A2.1, B1.1- ANOVA $p < 0,05$, $q < 0,05$ em NS vs. T, DAR $< 1,5$; A2.2- ANOVA $p < 0,05$, $q < 0,05$ em NS vs. T, DAR $\geq 1,5$.

O stress provocado pela cultura *in vitro* desencadeou uma resposta nas linhas transgénica (T_a) e segregante negativa (NS_b)

Dos 81 *spots* com abundância relativa alterada, apenas 71 foram possíveis de retirar do gel e analisar por MS. Foram conseguidas identificações para 55 *spots*, correspondendo a 36 proteínas diferentes (quadro 1). A maioria destas proteínas são proteínas já descritas como estando associadas com a resposta a diversos *stresses* ou associadas a vias metabólicas que podem ser ativadas/modificadas como resposta ao mesmo. Estes resultados não são surpreendentes na medida em que é sabido que as plantas sujeitas a técnicas de cultura *in vitro* são inevitavelmente sujeitas a *stress* (3, 4) (corte, choque osmótico, toxicidade por nitrogénio, desregulação hormonal, espaço reduzido, etc.). De forma a se adaptarem a tais condições as plantas desenvolveram uma série de estratégias que passam por ajustarem uma série de processos genéticos e bioquímicos. Neste estudo, parece confirmar-se que estas adaptações podem ser memorizadas ao longo de várias gerações, na medida em que as linhas em teste foram crescidas nas mesmas condições durante duas gerações antes do início da experiência.

É sabido que processos epigenéticos os quais incluem metilação de DNA, modificação de histonas e “small interfering RNAs” (siRNAs) são processos utilizados pelas plantas na memória do *stress* ao longo das gerações (5, 6).

Implicações dos resultados obtidos nas estratégias de análise de risco das plantas geneticamente modificadas

Embora se saiba que a cultura *in vitro* provoca *stress*, o que necessariamente leva a modificações no transcrito e proteoma das plantas, tais alterações nunca foram consideradas diferentes daquelas, por exemplo, provocadas pelo ambiente.

Neste caso particular parece que o *stress* imposto pelas técnicas de cultura *in vitro* (utilizada durante o processo de transformação para obtenção das linhas T_a e T_b , duas gerações antes deste estudo) foi o fator com maior influência sobre as diferenças proteómicas entre as linhas controlo e T_a/NS_b .

Considerando uma situação hipotética em que as linhas T_a e C (utilizadas neste estudo) estariam a ser comparadas, por proteómica, numa análise de risco, diversas diferenças seriam encontradas que provámos aqui não estarem relacionadas nem com a presen-

ça do transgene nem com as alterações epigenéticas provocadas pela sua inserção. Estes resultados reforçam a necessidade de interpretação da relevância biológica e significância toxicológica das diferenças significativas encontradas entre as plantas transgénicas e seus controlos. Para além disso se as alterações promovidas pela inserção do transgene são, de facto, negligenciáveis quando comparadas com as promovidas pelas estratégias de cultura *in vitro* utilizadas no processo de transformação, os segregantes negativos serão, em nossa opinião, controlos mais adequados na análise de risco das plantas geneticamente modificadas. Estes controlos permitirão a análise das diferenças promovidas pela presença do transgene, descontando as promovidas pela cultura *in vitro* (não controversa) e pelo processo de inserção do transgene (provado aqui ter uma influência negligenciável).

_Conclusão

Demonstrámos, neste estudo, que as técnicas de cultura *in vitro*, universalmente utilizadas no melhoramento de plantas, podem originar maiores alterações nas plantas que a engenharia genética. Estes resultados reforçam a ideia de que a existência de diferenças inesperadas entre uma dada planta geneticamente modificada e seu controlo, não implica necessariamente uma preocupação em termos de segurança alimentar. Este trabalho não só contribuiu para desmistificar o uso da engenharia genética no melhoramento de plantas, mas demonstra também a potencial importância da utilização dos segregantes negativos como controlos no processo de avaliação de risco das plantas geneticamente modificadas.

Referências bibliográficas:

- (1) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Journal. 2011;9(5):2150. [LINK](#)
- (2) EFSA Panel on genetically modified organisms (GMO). Guidance on selection of comparators for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed, EFSA Journal. 2011;9(5):2149. [LINK](#)
- (3) Balen B, Tkalec M, Pavokovic D, et al. Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. J Plant Growth Regul. 2009;28(1):36-45.
- (4) Joyce S, Cassells A, Jain S. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. Plant Cell, tissue and organ culture. 2003;74:103-121.
- (5) Molinier J, Ries G, Zipfel C, et al. Transgenerational memory of stress in plants. Nature. 2006;442(7106):1046-9.
- (6) Whittle CA, Otto SP, Johnston MO, et al. Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. Botany. 2009(6):87:650-7. [LINK](#)

4º Congresso Ibérico de Cianotoxinas Lisboa, 8-10 julho 2015

O Congresso Ibérico de Cianotoxinas (CIC) tem a sua quarta edição em 2015 em Lisboa, no Pavilhão do Conhecimento situado no Parque das Nações, tendo como cenário o rio Tejo.

No seu habitual ambiente informal, o CIC tem permitido congrega o conhecimento Ibérico numa área emergente da qualidade hídrica, apoiando a complementaridade e partilha científica entre os dois países e promovendo a divulgação e aproximação deste conhecimento à realidade e à sua aplicação na promoção da qualidade da água, dos ecossistemas e da saúde das populações.

Abordando temas que vão desde a ocorrência, distribuição e dinâmica de episódios tóxicos no ambiente, até à caracterização dos seus efeitos na saúde humana e animal, passando pelas estratégias de deteção, prevenção, tratamento e remediação de situações de risco e pela abordagem a novos compostos bioativos, nesta edição pretendemos dar particular enfoque às novas tendências de investigação e desenvolvimento tecnológico em cianotoxinas. O 4º CIC debaterá os últimos desenvolvimentos técnico-científicos em cianotoxinas ocorridos nos dois países, pondo em contacto agentes de diferentes áreas do conhecimento e de intervenção na qualidade da água, em Portugal e em Espanha.

Encontramo-nos em Lisboa!

4º CONGRESSO IBÉRICO DE CIANOTOXINAS |
www.4cic2015.pro-insa.pt



A Comissão organizadora: Paulo Pereira, Arminda Vilares, Carina Menezes, Catarina Churro, Elisabete Valério, Elsa Dias, Sérgio Paulino

Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

Página web/inscrições: www.4cic2015.pro-insa.pt e-mail: 4cic2015@insa.min-saude.pt

INSA disponibiliza modelo de relatório para uniformização de metodologias face à presença de materiais contendo amianto em edifícios

Na sequência do levantamento de edifícios públicos suspeitos de conter materiais com amianto é imperativo dispor de uma ferramenta única que permita uniformizar modos de atuação face aos materiais em presença e seu risco potencial para a saúde humana.

Com este objetivo a Unidade e Ar e Saúde Ocupacional do Departamento de Saúde Ambiental do INSA criou um modelo de relatório para ser utilizado nas ações de identificação de risco e orientar sobre as medidas a tomar.

Mais informações e modelo de relatório [LINK](#)

Contacto: uaso.lisboa@insa.min-saude.pt

ficha técnica_

_Título: Boletim Epidemiológico Observações

_Periodicidade: Trimestral

_ISSN: 2182-8873, 0874-2928 (em linha)

_Numeração: 2ª série
Volume 3, número especial 4
Dezembro 2014

_Diretor
Fernando de Almeida, Presidente do INSA

_Editores
Carlos Matias Dias, Departamento de Epidemiologia
Elvira Silvestre, Biblioteca da Saúde

_Conselho Editorial Científico
Carlos Matias Dias, Departamento de Epidemiologia
Manuela Cano, Departamento de Saúde Ambiental
Jorge Machado, Departamento de Doenças Infecciosas
Manuela Caniça, Conselho Científico do INSA
Peter Jordan, Departamento de Genética Humana
Silvia Viegas, Departamento de Alimentação e Nutrição
Cláudia Niza, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis

_Revisão Científica
Manuela Cano, Saúde Ambiental | Maria Antónia Calhau, Alimentação e Nutrição | Carlos Matias Dias, Epidemiologia | Cristina Furtado, Doenças Infecciosas | Peter Jordan, Genética Humana

_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 2014.

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